



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

Nathalia Daflon Yunes

**Relação entre a Resistência a Múltiplas
Drogas, a Atividade Ecto-ATPásica e a
Sensibilidade ao ATP e Adenosina
Extracelulares em Células Leucêmicas**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO
A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA BIOLÓGICA

Rio de Janeiro
Março, 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Nathalia Daflon Yunes

**Relação entre a Resistência a Múltiplas
Drogas, a Atividade Ecto-ATPásica e a
Sensibilidade ao ATP e Adenosina
Extracelulares em Células Leucêmicas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Biológica.

Orientadora: Dr^a. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek

Rio de Janeiro
Março, 2009

Daflon-Yunes, Nathalia.

Relação entre a Resistência a Múltiplas Drogas, a Atividade Ecto-ATPásica e a Sensibilidade ao ATP e Adenosina Extracelulares em Células Leucêmicas / Nathalia Daflon Yunes. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBqM, 2009.

xvi, 97 f. : il. ;1 cm.

Orientadora: Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Bioquímica Médica / Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2009.

Referências bibliográficas: f. 85-96.

1. Glicoproteína-P. 2. Resistência a Múltiplas Drogas. 3. Leucemia. 4. ATP Extracelular. 5. Ecto-enzimas. 6. Adenosina. I. Rumjanek, Vivian Mary Barral Dodd. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III. Título.

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

Relação entre a Resistência a Múltiplas Drogas, a Atividade Ecto-ATPásica e a Sensibilidade ao ATP e Adenosina Extracelulares em Células Leucêmicas

Nathalia Daflon Yunes

Orientadora: Dr.^a Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Aprovada em Março de 2009 por:

Orientadora: Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek
Professora Titular do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Antonio Galina Filho
Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Maria Isabel Doria Rossi
Professora Adjunta do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Robson Coutinho Silva
Professor Associado I do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Revisor: José Roberto Meyer Fernandes
Professor Associado I do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Aos meus pais e às minhas irmãs,
por serem tão presentes na minha vida, sempre!

Agradecimentos

“Há momentos em que oferecemos nossa força e nossa proteção, mas a maior bênção que podemos oferecer ao outro é a crença que temos em sua luta pela liberdade, a coragem de apoiá-lo e acompanhá-lo quando ele descobre por si mesmo a força que irá se tornar o seu refúgio e o alicerce de sua vida. Acho que acreditar numa pessoa num momento em que ela não consegue acreditar em si mesma tem uma importância toda especial...” *do livro As Bênçãos do Meu Avô.*

À Vivian, minha orientadora, por ser responsável pela minha escolha dentro da ciência e permitir que eu trabalhe com o que me faz feliz. Pela compreensão, pelo carinho e por se preocupar sempre com o meu bem-estar. Pela confiança (mesmo quando eu peço para ela assinar um cheque em branco!) e pelas histórias que me fazem aprender sempre. Obrigada por ser mais que uma orientadora científica!

À Dra Ottilia, por ser conhecimento, sabedoria, serenidade e exemplo nas nossas vidas. Por fazer parte da minha formação e por colaborar para a realização deste trabalho, aceitando a me ensinar cálculos logarítmicos, revisar “extra oficialmente” o trabalho e me ajudar a tirar todas as minhas dúvidas.

Ao professor José Roberto Meyer Fernandes, em primeiro lugar, por ter aberto as portas do seu laboratório, a sua colaboração foi fundamental para que eu pudesse concretizar esse trabalho! Por ter aceitado a “missão” de ser o revisor desta dissertação, e de continuar participando da realização deste estudo nos próximos anos.

Ao André Luiz, aluno de doutorado do professor José Roberto, pela realização dos experimentos das atividades das ecto-enzimas, pelas conversas do corredor que sempre rendem mais idéias e experimentos, também por me ensinar muito sobre ecto-enzimas e nucleotídeos extracelulares. Pelo fato de estar sempre disposto a me ajudar, a aumentar o “n”, a responder as minhas dúvidas, e sorrindo!

Ao Flavinho, por estar comigo em todos os NOSSOS trabalhos, por me agüentar desde quando eu entrei no laboratório, pela paciência infinita comigo, mesmo quando eu quero tudo do meu jeito. Por ter selecionado a célula mais legal de todas e ter confiado ela a mim! Obrigada por cobrir as minhas ausências e me ensinar a ser mais tolerante.

Aos professores Antonio Galina, Cerli Gattass, Maria Isabel Rossi e Robson Coutinho, por aceitarem participar da banca examinadora da tese e dedicarem parte do seu tempo a ela.

À Clarissa, por ser minha amiga e futura colaboradora, por ser voz e ouvido nos momentos que esses se fazem necessários.

À Andréia, por continuar sendo a minha querida amiga falca, pelo jeito alegre, sereno e guerreiro.

À Fernanda, que eu estou morrendo de saudades, pelo exemplo, a sua determinação é um incentivo na minha formação.

À Juliana, a única que me acompanha, pelas idéias, dicas e conhecimentos informáticos e científicos. Por contribuir e torcer para que tudo desse certo.

À Alessandra, por ter se tornado parte integrante do “grupo”, pela tranqüilidade, pelos “sortings”, e pela disposição de ajudar.

À Cláudia, que sempre para o que estiver fazendo para me ouvir e conversar comigo. Pelo jeito carinhoso, e por me entender tão bem!

À Marina, que está junto comigo nessa caminhada, pelas conversas e por sempre colaborar quando as coisas não estão muito fáceis.

À Bruna, minha aluna (que chique!), por ter aceitado ser seqüestrada por mim, para fazer parte do meu trabalho daqui pra frente, pela dedicação e interesse. Pelas perguntas “bobas” que sempre me fazem pensar muito!!!

Ao Raphael, responsável pela conscientização ambiental, pelos assuntos mais sérios e mais engraçados do laboratório.

Ao Eduardo, que sempre responde todas as minhas perguntas, por me ajudar a resolver vários problemas.

Ao Tião, por me ajudar nas tarefas administrativas e celulares!

À Jack, pelos vários favores que eu peço a ela e que são sempre atendidos com um sorriso!

Ao André e ao Paulinho, pela manutenção do funcionamento do laboratório.

A todos os integrantes do laboratório de Imunologia Tumoral, Gabriel, Graça, Kelly, Luciana, Maria, Mariana, Matheus, Paula, Renata, Tiago, e aos alunos do INES, pela convivência e por todos os momentos divertidos.

Ao Chaquip, ao Vinicius e à Naira, pelas caronas que me fazem ganhar tempo (muito tempo!!!!) e pelos papos que tornam os mega engarrafamentos menos estafantes e mais produtivos!

Aos meus amigos, extra laboratoriais, que estão sempre ao meu lado, (mesmo dentro de uma sala de cirurgia), que fazem parte das minhas aflições e das minhas conquistas.

Ao Leleco, por ouvir e achar lindo tudo o que eu conto, mesmo sem entender muito bem o que é um “repique“, ou “MDR”... Por torcer sempre por mim e se orgulhar de ter uma namorada “cientista”.

À minha família que está sempre presente em todos os momentos, torcendo, orando, comemorando,...

À minha irmã Daniela, por ser minha personal stylist, minha confidente e amiga e por ser a pessoa que mais acredita em mim!

À minha irmã Joana, meu clone, pelos beijos “aqui, aqui e aqui” que sempre me atrasam, mas que fazem todos os dias começarem especiais, pelo sorriso, pelo olhar, pelo carinho e até pela bagunça no nosso quarto.

Aos meus pais, Esther e Lula, a quem eu amo muito, por serem exemplos de força e perseverança, por me ensinarem a não desistir dos meus objetivos, mesmo quando eles parecem inatingíveis. Por me incentivarem a fazer o que eu gosto e acreditarem na minha escolha. Obrigada pelo exemplo, pela força, pelas conversas da madrugada, pelas super caronas e por tudo o que são na minha vida.

À Deus pela minha vida, pela força e pela minha saúde que me permitem chegar onde eu quero e ir adiante quando eu preciso!

“Não é preciso consenso
nem arte,
nem beleza ou idade:
a vida é sempre dentro
e agora.
(a vida é minha
para ser ousada)

A vida pode florescer
Numa existência inteira.
Mas tem de ser buscada, tem de ser
conquistada.”

(Lya Luft)

Resumo

A resistência a múltiplas drogas (MDR) clássica, é normalmente o resultado da super expressão de proteínas transportadoras membros da família ABC (ATP binding cassette), e entre estas a mais estudada é a proteína ABCB1, ou glicoproteína P. Esta proteína funciona como uma bomba de efluxo dependente de ATP. Devido a sua ação direta na função dessa proteína, o efeito do ATP no fenótipo MDR vem sendo estudado. O ATP extracelular (ATPo) pode ser citotóxico para alguns tipos celulares, inclusive em células tumorais. Além disso, tem sido demonstrada uma correlação positiva entre a atividade das ecto-enzimas e a expressão da ABCB1. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do ATP e da adenosina extracelulares nas linhagens celulares MDR Lucena e FEPS e na parental K562 (eritroleucemia humana). Na primeira etapa do trabalho nota-se que as linhagens utilizadas possuem diferentes níveis do perfil de resistência. Através da técnica de citometria de fluxo foi confirmada a expressão e a atividade de proteínas relacionadas à resistência a múltiplas drogas apenas nas linhagens Lucena e FEPS e não na linhagem parental K562. Na segunda etapa foi medida a atividade das ecto-ATPase e da ecto-5` nucleotidase e essas puderam ser demonstradas em todas as linhagens, porém o aumento da atividade dessas enzimas está diretamente relacionado a maior expressão da ABCB1 nas linhagens leucêmicas. Para verificar se a maior expressão da ABCB1 poderia interferir na sensibilidade ao ATP e adenosina, a viabilidade das células na presença desses agentes foi medida por ensaio de MTT. As três linhagens mostraram-se sensíveis, porém nas maiores concentrações, a FEPS demonstrou uma pequena resistência. Através de um ensaio com Anexina V foi demonstrado que a citotoxicidade observada na presença de adenosina ocorre pela indução de apoptose. Foi observado, também, que o ATPo e a adenosina são capazes de regular negativa e positivamente a atividade da ABCB1, respectivamente. Esses resultados sugerem que o ATP e a adenosina são citotóxicos, também em células resistentes e podem modular essa resistência. Além disso, confirmam a correlação entre a superexpressão da ABCB1 e o aumento da atividade das ecto-enzimas.

Palavras-chaves: 1. Glicoproteína-P. 2. Resistência a Múltiplas Drogas. 3. Leucemia. 4. ATP Extracelular. 5. Ecto-enzimas. 6. Adenosina.

Abstract

Classical multidrug resistance (MDR) results from the overexpression of proteins belonging to the superfamily of ABC (ATP binding cassette) transport proteins. Among the members of this family, ABCB1 or P glycoprotein is probably the best known transporter linked to the MDR phenomenon. This protein functions as a drug efflux pump and is dependent on energy derived from ATP hydrolysis. As a result of its direct action on the function of this protein, the effect of ATP on the MDR phenotype is under study. Extracellular ATP (ATPo) is cytotoxic for certain cell types including tumor cells. Furthermore, a positive correlation between the activity of ecto-enzymes and the expression of ABCB1 has been described. The aim of the present work was to determine the effect of extracellular ATP and adenosine on MDR cell lines (Lucena and FEPS) and on the parental cell line K562, a human erythroleukemia. The first approach, using functional assays, established that the cell lines under study presented different levels of resistance. Utilizing flow cytometry it was possible to confirm that only the cell lines Lucena and FEPS, but not K562, expressed proteins related to multidrug resistance. Next, ecto-ATPase and ecto-5' nucleotidase activities were detected in all cell lines, but the level of activity was directly related to a higher expression of ABCB1 on the leukemic cell lines. In an attempt to establish if an increased ABCB1 expression could interfere with the sensitivity of these cells to ATP and adenosine, cell viability after treatment with these agents was measured using the MTT assay. The three cell lines were sensitive to these agents; however, FEPS was slightly more resistant when higher concentrations were used. When the Annexin A assay was used to investigate apoptosis induction it was possible to observe that adenosine cytotoxicity involved the apoptotic mechanism. Moreover, ATPo and adenosine were capable of modulating ABCB1 activity, in a negative and in a positive way, respectively. Taken together, these results suggest that ATP and adenosine are cytotoxic towards resistant cell lines and are capable of modulating this resistance. In addition the present results confirm the correlation between the overexpression of ABCB1 and increased ecto-enzymes activities.

Keywords: 1. P glycoprotein. 2. Multidrug Resistance. 3. Leukemia. 4. Extracellular ATP. 5. Ecto-enzymes. 6. Adenosine.

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Alvo de ação dos principais fármacos utilizados no tratamento do câncer	24
Figura 2: Esquema das proteínas ABC	26
Figura 3. Estrutura da ABCB1	28
Figura 4: Estruturas das enzimas membros da família E-NTPDase	33
Figura 5: Estrutura bidimensional da ecto-5' nucleotidase	33
Figura 6: Receptores de nucleotídeos e as proteínas de membrana	35
Figura 7: Estrutura bidimensional dos receptores P2Y e P2X	36
Figura 8: Modelo esquemático do transporte do ATP para fora da célula pela ABCB1 e a conversão extracelular de ATP em adenosina pelas ecto-enzimas	39
Figura 9: Expressão da ABCB1 nas linhagens K562, Lucena e FEPS	56
Figura 10: Diferença da expressão da ABCB1 entre as linhagens K562, Lucena e FEPS	57
Figura 11: Atividade da ABCB1 nas linhagens K562, Lucena e FEPS	58
Figura 12: Tempo do ciclo celular	60
Figura 13: Viabilidade das linhagens K562, Lucena e FEPS na presença de quimioterápicos	62
Figura 14: Atividade da ecto-5' Nucleotidase	63
Figura 15: Atividade da ecto-ATPase	65
Figura 16: Viabilidade das linhagens K562, Lucena e FEPS na presença de ATPo	66
Figura 17: Viabilidade celular na presença de adenosina extracelular	68
Figura 18: Indução de apoptose na presença de adenosina extracelular	69
Figura 19: Modulação da atividade da ABCB1 em células leucêmicas pela adenosina extracelular	70
Figura 20: Modulação da atividade da ABCB1 em linfócitos normais pela adenosina extracelular	71
Tabela 1: Modulação da atividade da ABCB1 em linfócitos normais pelo ATPo	72
Tabela 2: Modulação da atividade da ABCB1 em células mononucleares normais pelo ATPo	73

Lista de Abreviaturas

- 6-MP - 6-mercaptopurina
- ABC – ATP Binding Cassete
- ABCB1 - ATP Binding Cassete - Subfamília B Membro1
- ABCC1 - ATP Binding Cassete - Subfamília C Membro1
- ADO - adenosina
- ADP - adenosina 5'-difosfato
- AMP - adenosina 5'-monofosfato
- ATP – adenosina trifosfato
- ATPo - adenosina Trifosfato Extracelular
- CSA – ciclosporina A
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*)
- DNR – daunorrubicina
- HBSS – salina balanceada de Hanks (*Hank's Balanced Salt Solution*)
- LLA – leucemia linfóide aguda
- LLC - leucemia linfóide crônica
- LMA - leucemia mielóide aguda
- LMC - leucemia mielóide crônica
- MDR – resistência a múltiplas drogas (*Multiple Drug Resistance*)
- mdr1 – gene que codifica a glicoproteína-P
- MRP – proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas – ABCC1 (*Multidrug Resistance-associated Protein*)
- MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
- NDB1 - domínio de ligação de Nucleotídeo (*Nucleotide Binding Domain*)
- P2X - receptor Ionotrófico
- P2Y - receptor Metabotrófico
- PBMC – células mononucleares de sangue *periféricos* (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)
- PBS – solução salina tamponada (*Phosphate-Buffered Saline*)
- Pgp – glicoproteína-P – ABCB1 (*P-glycoprotein*)
- PHA – fitohematoglutina A
- PI – iodeto de propídeo
- Rho - rodamina 123

SFB – soro fetal bovino

TMP - timidilato mono fosfato

VCR – vincristina

VP – verapamil

SUMÁRIO

Agradecimentos	vi
Resumo	x
Abstract	xi
Lista de Figuras e Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Câncer	18
1.2 As leucemias	19
1.3 A Quimioterapia e o Câncer.....	20
1.4 Resistência a Múltiplas Drogas.....	24
1.5 Transportadores ABC	26
1.6 A Glicoproteína P (ABCB1).....	27
1.6.1 A ABCB1 e a Leucemia.....	29
1.7 ATP.....	30
1.9 Ecto-enzimas	32
1.8 Adenosina.....	33
1.11 Receptores purinérgicos	35
1.12 O ATP, o câncer e a ABCB1.....	37
1.13 K562, Lucena-1 e FEPS	40
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Métodos.....	45
3.1.1 Cultura de células.....	45
3.1.2 Isolamento de linfócitos.....	45
3.1.3 Velocidade de duplicação celular	45
3.1.4 Expressão da glicoproteína P	46
3.1.5 Atividade da ABCB1	47
3.1.6 Viabilidade Celular	49
3.1.7 Detecção da apoptose por anexina V:	50
3.1.8 Dosagem da Atividade Ecto-5'-Nucleotidásica.....	51
3.1.9 Dosagem da Atividade Ecto-ATPásica.....	51
3.1.10 Análise estatística	52
3.2 Materiais.....	53
4. RESULTADOS	55
4.1 Expressão da Glicoproteína P nas diferentes linhagens leucêmicas.....	56
4.2 Atividade da ABCB1 nas linhagens K562, Lucena e FEPS	57
4.3 Velocidade de duplicação das linhagens K562, Lucena-1 e FEPS	59
4.4 Ação de quimioterápicos.....	60
4.5 Atividade das ecto-enzimas nas linhagens leucêmicas	63
4.5.1 Atividade da ecto-5' nucleotidase (CD73).....	63
4.5.2 Atividade da ecto-ATPase (CD39)	64
4.6 Efeito do ATPo na viabilidade celular em linhagens leucêmicas	66
4.7 Efeito da adenosina extracelular na morte celular em linhagens leucêmicas ..	67
4.7.1 Viabilidade celular na presença de adenosina	67
4.7.2 Efeito da adenosina no mecanismo de morte celular.....	68
4.8 Modulação da atividade da ABCB1	70

4.8.1 Modulação da ABCB1 pela adenosina extracelular em células leucêmicas	70
4.8.2 Modulação da ABCB1 pela adenosina extracelular em linfócitos normais	71
4.8.3 Modulação da ABCB1 pelo ATPo em linfócitos normais.....	72
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado ao conjunto de doenças caracterizadas por alterações no ciclo celular, que levam a inibição da morte celular, ou a proliferação desordenada. O câncer pode ser causado por uma série de mutações, que podem ocorrer em genes específicos, como proto-oncogenes, que são inativos em células normais, e quando ativados transformam-se em oncogenes e levam a malignização das células normais. Podem ocorrer também mutações em genes supressores de tumor, que atuam no controle da proliferação celular, e que quando inativados estão relacionados à tumorigênese (ALBERTS e col., 2002).

Os tumores podem ser benignos, quando este é uma massa de células localizada e não tem a capacidade de invadir outros tecidos, ou malignos, que também podem ser chamados de câncer, quando possuem a capacidade de se multiplicar mais rapidamente que o tecido à sua volta e de invadi-lo, formando metástases. Outros fatores também caracterizam as neoplasias, como a imortalização celular, devido à ativação da enzima telomerase; presença de alterações cromossômicas; perda de moléculas de adesão, que permite o reconhecimento célula-célula, a inibição por contato do movimento e crescimento celular; perda da capacidade de diferenciação ou especialização. Além disso, esses fatores são capazes de formar novos vasos sanguíneos, necessários para o crescimento do tumor e metástase (angiogênese) (ALBERTS e col., 2002).

Os cânceres são classificados de acordo com o tecido e o tipo celular de origem. Os tumores originados de células epiteliais são chamados de carcinoma, os originados do tecido conjuntivo ou de células musculares são denominados de

sarcomas. Aqueles que não pertencem a essas categorias incluem os cânceres derivados de tecido linfo-hematopoético, como os linfomas e as leucemias e os derivados de células do sistema nervoso (ALBERTS e col., 2002).

1.2 As leucemias

As leucemias são um grupo de doenças complexas e diferentes entre si que afetam a produção de células hematopoéticas na medula óssea. As principais formas de leucemia são classificadas em quatro categorias, as leucemias mielóide e linfóide, que se apresentam de forma aguda ou crônica.

A leucemia linfóide aguda (LLA) caracteriza-se pelo acúmulo de linfoblastos em diversos órgãos e tecidos, notadamente na medula óssea e no sangue periférico. É a neoplasia mais comum na infância, porém responsável por 20% das leucemias agudas em adultos (JENNINGS e FOON, 1997).

A leucemia linfóide crônica (LLC) é uma doença linfoproliferativa que se caracteriza pelo acúmulo de linfócitos de aspecto maduro, porém funcionalmente incompetentes, no sangue periférico e em outros órgãos como baço, linfonodos e medula óssea, o que contribui para efeitos secundários como anemia e trombocitopenia. Mais comum em adultos com mais de 55 anos e acomete 2 a 3 vezes mais homens do que mulheres, diminuindo essa taxa com o aumento da idade (KEATING, 1996).

A leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença do tecido hematopoético que se caracteriza pela proliferação progressiva de células progenitoras da linhagem mielóide, refletindo em alterações no sangue periférico tais como leucocitoses e anemias. Anormalidades no crescimento e maturação levam as células desse tipo

de leucemia a apresentar um nível de diferenciação baixo, o que as impede de se tornar funcionalmente competentes (GROVES e col., 1996).

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa que exhibe anormalidades hematológicas resultantes da transformação de uma única célula-tronco multipotente. É caracterizada pela produção de granulócitos e precursores de morfologia normal, porém com função alterada (KURZOCK e col., 2003). Esta leucemia é caracterizada pela presença do gene BCR-ABL, resultante da translocação entre os cromossomos 9 e 22 (cromossomo Philadelphia). A proteína quimérica bcr-abl possui atividade constitutiva da tirosina cinase, capaz de ativar diversas vias de ativação, levando as células hematopoéticas ao aumento de proliferação, redução da apoptose e distúrbios na interação com a matriz extracelular e o estroma. Portanto, a expressão do gene BCR-ABL em células hematopoéticas é responsável por liderar a manifestação clínica da LMC (DEININGER e col., 2000).

1.3 A Quimioterapia e o Câncer

A era da quimioterapia no tratamento do câncer começou em 1940 (PAPAC, 2001), com a descoberta da “mostarda nitrogenada”, um agente alquilante, que proporcionava um tratamento efetivo. Em 1942, Goodman and Gilman utilizaram este agente em um paciente para o tratamento de linfoma não-Hodgkin, eles se basearam em autopsias feitas em soldados mortos na Primeira Guerra Mundial pela exposição de gás de mostarda. Estas vítimas apresentavam hipoplasia linfóide, sugerindo que esse agente poderia causar regressão em tumores linfáticos. Infelizmente, apesar de eficaz no início, logo os tumores se tornavam resistentes à “mostarda nitrogenada” (GILMAN, 1963).

O segundo tipo de terapia utilizado contra o câncer foi baseada no estudo do ácido fólico, uma vitamina que, quando administrada em crianças com câncer, aparentemente, estimulava a proliferação de células de leucemia linfoblástica aguda (ALL). Farber e colaboradores sintetizaram um anti-folato: o metotrexato que é um potente inibidor da dihidrofolato redutase (DHFR), uma enzima crítica para a manutenção dos níveis intracelulares de tetrahidrofolato (forma reduzida), e administraram em crianças com ALL, e esta foi o primeiro fármaco a induzir a remissão da doença (FARBER e col., 1948). Além disso, foi utilizada, anos mais tarde, para a terapia de coriocarcinoma, sendo a primeira droga eficiente no tratamento de tumores sólidos em humanos (LI e col., 1958). E quando utilizado após uma remoção cirúrgica de osteosarcoma, estabeleceu o princípio da terapia adjuvante (JAFFE e col., 1981).

O metotrexato foi muito utilizado e estudado, principalmente o seu mecanismo de ação por várias etapas (OSBORN e col., 1958). Verificou-se posteriormente que defeitos celulares nestas etapas levavam as células à resistência ao fármaco, diminuindo então sua eficácia (PINEDO e col., 1996).

Outras drogas anti-leucêmicas foram descobertas no início dos anos 50, a partir dos estudos de análogos da purina, como o 6-mercaptopurina (6-MP) (SKIPPER e col., 1954). Posteriormente, no grupo de produtos naturais, foram descobertos os alcalóides da vinca, capazes de bloquear a proliferação das células tumorais (JOHNSON e col., 1963). O efeito anti-tumoral destes compostos deve-se à capacidade de inibir a polimerização dos microtúbulos e, conseqüentemente, a divisão celular (BENSCH e MALAWISTA, 1968).

Em 1965, Frei e colaboradores mostraram que a combinação de metotrexato, vincristina (alcalóide da vinca), 6-MP e prednisona (corticóide), era capaz de induzir a remissão a longo prazo em crianças com LLA (FREI e col., 1965), sugerindo que a combinação de fármacos, com diferentes mecanismos de ação, seria mais eficiente na prevenção da resistência a drogas em células tumorais.

Outras moléculas efetivas na luta contra o câncer chegaram ao mercado durante o período entre 1970 e 1990, incluindo as antraciclinas, que atuam inibindo a topoisomerase II, uma enzima crucial na replicação, transcrição e reparo do DNA (MINOCHA e LONG, 1984).

Durante as descobertas e aprimoramento dos agentes citotóxicos, houve a melhor compreensão molecular e genética dos sinais reguladores das atividades celulares, como proliferação e sobrevivência, que se apresentam alterados em células tumorais. Houve, então, uma nova perspectiva de tratamento, baseada no reparo de defeitos moleculares em células tumorais, dando início à “terapia direcionada”, com as chamadas “drogas inteligentes”, que visam diminuir os efeitos tóxicos do tratamento convencional (CALABRESI e col., 1995). Os novos alvos incluem fatores de crescimento, moléculas de sinalização, proteínas do ciclo celular, moduladores da apoptose e moléculas promotoras da angiogênese (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Um marco na terapia direcionada foi o desenvolvimento do mesilato de imatinibe, que inibe a atividade da BCR-ABL cinase, envolvida na leucemia mielóide crônica. Druker e colaboradores mostraram que este fármaco quando usado em pacientes em fase crônica, induz 90% de remissão total e a perda de clones malignos. Porém em fase aguda, induz uma breve remissão e o tratamento é

relacionado com resistência a droga por mutações no domínio catalítico da ABL (DRUKER e col., 2001 e SHAH e col., 2002). Em alguns pacientes em fase crônica da CML, células resistentes estão presentes antes da exposição ao fármaco, sugerindo que células tumorais, através de uma mutabilidade intrínseca, possuem subclones resistentes a drogas, mesmo antes do tratamento (ROCHE-LESTIENNE e col., 2002).

Devido à pressão seletiva das terapias tóxicas, da diversidade genética existente na maioria dos tumores humanos, há uma grande probabilidade de haver células resistentes. Existem vários mecanismos de resistência, envolvendo mutação e amplificação de enzimas alvo, super expressão de transportadores de drogas, ou a mutação de etapas da morte celular. Em alguns casos, drogas inteligentes e quimioterapias convencionais podem ser afetadas por um mecanismo de resistência, envolvendo efluxo de drogas, caracterizado pela presença de transportadores de Resistência a Múltiplas Drogas, (MDR, do inglês *Multiple Drug Resistance*) (RONINSON e col., 1986).

A transição dos fármacos citotóxicos para a terapia direcionada representa um grande avanço, porém os princípios básicos do tratamento contra o câncer e a resistência a ele, permaneceram semelhantes entre 1950 e 1980, a grande maioria dos agentes anti-neoplásicos vão atuar em uma via essencial de sobrevivência celular (Figura 1). Nas décadas seguintes, o maior desafio foi e ainda é a administração das duas terapias combinadas, com maior eficiência, utilizando a genômica e a biologia molecular para identificar o melhor tipo de tratamento em cada indivíduo. Além disso, o uso paralelo da exploração da mutabilidade genética de células tumorais e a reversão da resistência (REED, 1999).

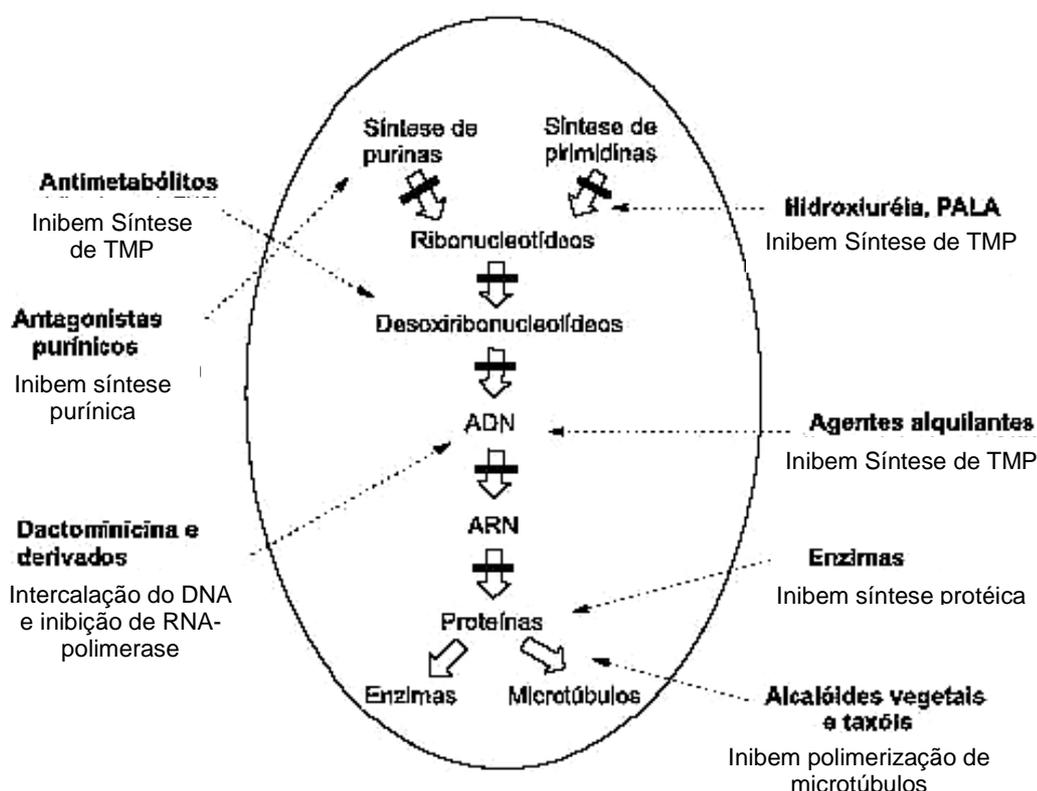


Figura 1. Alvo de ação dos principais fármacos utilizados no tratamento do câncer (Adaptado de CALABRESI e CHABNER, 1995).

1.4 Resistência a Múltiplas Drogas

Existem duas classes gerais de resistência a drogas contra o câncer: a causada pelo prejuízo da chegada do fármaco nas células tumorais e a baseada em mutações genéticas e epigenéticas pela própria célula, que afetam a sua sensibilidade. A primeira pode resultar da baixa absorção da droga, o aumento do metabolismo da droga ou o aumento da sua excreção, resultando em baixos níveis da droga no sangue e a diminuição da difusão do fármaco do sangue para o tumor (PLUEN e col., 2001 e JAIN, 2001).

Os mecanismos de resistência vêm sendo amplamente estudados, uma vez que os modelos experimentais podem ser gerados, facilmente, *in vitro* por seleção com agentes citotóxicos. Células tumorais tornam-se resistentes a um fármaco, ou a

uma classe de fármacos com mecanismo de ação semelhante, por alterações no alvo celular da droga, ou pelo aumento do reparo de danos induzidos pela droga, geralmente no DNA. Após essa seleção, as células, inicialmente susceptíveis a quimioterápicos, podem apresentar resistência cruzada com outros fármacos sem estrutura molecular relacionada, nem mecanismo de ação comum, portanto mesmo tratamentos que utilizam vários agentes quimioterápicos não são eficazes na cura da doença, esse fenômeno é chamado de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) (GOTTESMAN e PASTAN, 1993).

Um princípio importante da resistência a múltiplas drogas é que as células tumorais são geneticamente heterogêneas. Apesar do processo de proliferação descontrolada favorecer a expansão clonal, as células tumorais, quando expostas a quimioterapia são selecionadas por sua habilidade de sobrevivência e crescimento na presença de drogas citotóxicas. Portanto, devido a sua diversidade genética, em uma população de células tumorais pode haver mais de um mecanismo de resistência a múltiplas drogas, sendo, portanto, um fenômeno multifatorial (GOTTESMAN e col., 2002).

Vários mecanismos podem tornar as células resistentes a diversos quimioterápicos simultaneamente. Há a resistência causada por danos nas etapas de apoptose, como mutações no gene que codifica a proteína p53 (LOWE e col., 1993); alteração nos níveis de ceramida; ou mudanças no ciclo celular, prevenindo a indução da apoptose (LIU e col., 2001). A resistência também pode surgir pela diminuição da captação do fármaco (SHEN e col., 2000) ou como resultado da ativação de sistemas de regulação, como o reparo de DNA (SYNOLD e col., 2001).

A resistência a drogas hidrofóbicas derivadas de produtos naturais, considerada a resistência a múltiplas drogas clássica, é normalmente o resultado da super expressão de proteínas transportadoras membros da família ABC (*ATP binding cassette*) de proteínas. Estas proteínas funcionam como uma bomba de efluxo dependente de ATP, evitando o aumento da concentração de droga no meio intracelular, diminuindo assim a sua toxicidade (BROXTERMAN e col., 1988).

1.5 Transportadores ABC

Os transportadores ABC pertencem a uma das maiores famílias de proteínas e possuem um papel biológico importante como transportadores de membrana e moduladores de canais iônicos. Sua unidade funcional possui, geralmente, dois domínios transmembranares e dois domínios ligantes de ATP (HIGGINS, 1992) (Figura 2). No genoma humano existem 48 genes que codificam essas proteínas, que são divididas em subfamílias nomeadas de A-G, baseado na estrutura molecular. (DEAN e ALLIKMETS e col., 2001).

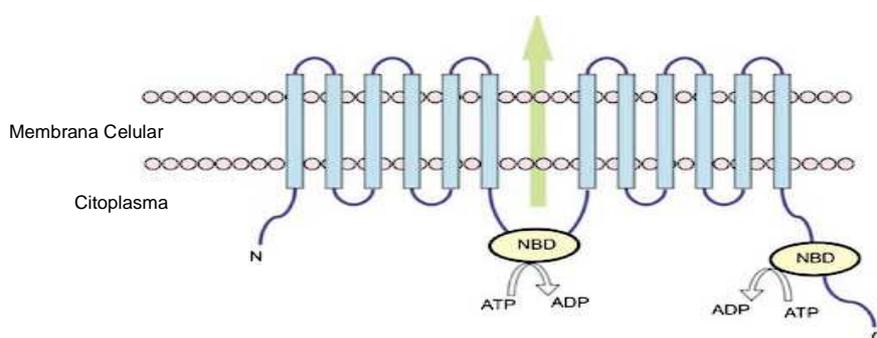


Figura 2: Esquema das proteínas ABC. Observam-se dois domínios transmembranares e seus dois sítios de ligação do ATP (Adaptado de LIN e col., 2006).

Apesar de vários membros dessa super família estarem envolvidos no transporte de substâncias específicas, há evidências que essas proteínas possuem

um papel fisiológico, provavelmente envolvido com a detoxificação e proteção do organismo contra xenobióticos. Esta função é atribuída pela alta expressão dos transportadores ABC em importantes barreiras farmacológicas, como células do intestino, hepatócitos, rins, barreira hematoencefálica e placenta (SZAKACS e col., 2006).

A seleção de células tumorais em cultura com drogas anti-tumorais derivadas de produtos naturais, como daunorrubicina e vincristina, freqüentemente resultam na resistência a múltiplas drogas pela super expressão das proteínas da família de ABC transportadores, e entre estas a mais estudada é a proteína ABCB1, ou glicoproteína P (UEDA e col., 1987).

1.6 A Glicoproteína P (ABCB1)

A ABCB1, anteriormente conhecida por Pgp, é uma proteína de membrana, codificada em humanos pelos genes de resistência a múltiplas drogas 1 e 2 (*mdr-1* e *mdr-2*) (RONINSON, 1992), possui peso molecular de 170kD (ROTHENBERG e LING, 1989). Ela contém 12 domínios transmembranares com 6 alças extracelulares, que contêm seqüências de glicosilação e 2 domínios citoplasmáticos ligantes a ATP (HIGGINS, 1992) (Figura 3). A ABCB1 funciona como uma bomba de efluxo dependente de energia e seu substrato endógeno deve ser catiônico, hidrofóbico, com dois anéis planares no mínimo e peso molecular de 400-1500 (AZZARIA e col., 1989).

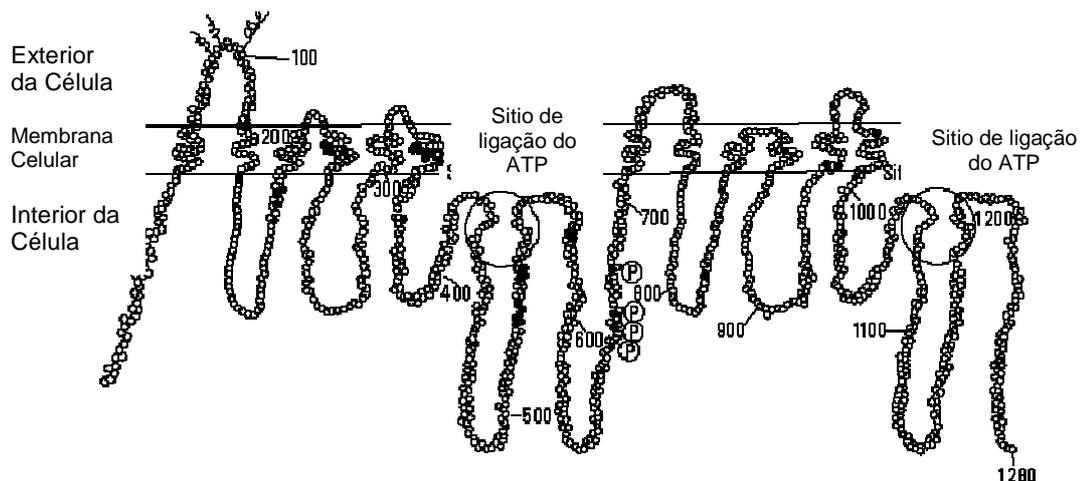


Figura 3. Estrutura da ABCB1. A. Estrutura bidimensional da ABCB1 (Pgp) descrita por Gottesman e Pastan, em 1993 (Adaptado de GOTTESMAN e PASTAN, 1993).

Nesse transportador, o substrato se liga às regiões transmembranares, estimulando a atividade ATPásica da ABCB1, que causa uma alteração conformacional, liberando o substrato para fora da membrana, ou para o espaço extracelular (RAMACHANDRA e col., 1998).

A ABCB1 possui um papel importante no transporte de íons (HYDE e col., 1990), hormônios (UEDA e col., 1992), glicosídeos cardíacos (DE LANNOY e SILVERMAN, 1992), compostos lipofílicos incluindo agentes anti-tumorais (NIELSEN e SKOVSGAARD, 1992) e corantes fluorescentes (KESSEL e col., 1991).

Esta proteína localiza-se, predominantemente, na membrana plasmática e, em menor quantidade, em organelas intracelulares (WILLINGHAM e col., 1987), sendo sugerido ainda que ela possa estar localizada também na membrana nuclear (CALCABRINI e col., 2000) e mais recentemente, foi descrito na mitocôndria (MUNTEANU e col., 2006).

Inicialmente a ABCB1 foi descrita em células tumorais caracterizando o fenótipo MDR, onde é responsável pela extrusão de quimioterápicos (JULIANO e

LING, 1976). No entanto, ela também é encontrada em células normais, como em células adrenocorticais (SUGAWARA e col., 1988), túbulo proximal renal, hepatócitos biliares, células da mucosa do intestino grosso e delgado, dutos pancreáticos (THIEBAUT e col., 1987), nas células endoteliais formadoras da barreira hematoencefálica (CORDON e col., 1989), na barreira materno-fetal da placenta (LANKAS e col., 1998), e em células do sistema imune (GUPTA e GOLLAPUDI, 1993). A sua presença em epitélios secretores sugere um papel fisiológico de proteção contra substâncias tóxicas e xenobióticos, apesar dessa função não estar ainda muito bem definida.

Existem moduladores da atividade da ABCB1, que são capazes de restaurar o acúmulo de quimioterápicos dentro das células MDR, seja por inibição competitiva ou mudança conformacional, como, por exemplo, o verapamil, um bloqueador de canais de cálcio (TSURUO e col., 1981); a ciclosporina-A (CSA), capaz de ligar-se a calmodulina (TWENTYMAN e col., 1987).

Substratos fluorescentes da ABCB1 são amplamente utilizados no estudo da atividade desta proteína, tanto *in vitro* com *in vivo* (MARQUES SANTOS e col., 1999). A rodamina 123 (Rho) é um fluorocromo catiônico, que entra passivamente na célula e se liga à mitocôndria, caracteriza-se por ser um conhecido substrato para a ABCB1 (NEYFAKH, 1988). Esta substância tem sido amplamente utilizada para verificar a atividade da ABCB1 e permite estudos acerca da atividade desta proteína por citometria de fluxo.

1.6.1 A ABCB1 e a Leucemia

O fenótipo MDR é estudado em vários tipos de tumores, porém clinicamente há ainda pouca informação sobre sua relação com a expressão da ABCB1 (BECK e

col., 1996). A associação mais uniforme entre a expressão da ABCB1 e a resistência vem sendo relatada na Leucemia Mielóide Aguda (LEITH e col., 1999). Essa expressão está relacionada com a redução da taxa de remissão e maior incidência da doença refratária (VAN DER KOLK e col., 2000).

Estudos recentes mostram que a expressão da ABCB1 está relacionada a um prognóstico ruim da doença. Além disso, resultados clínicos, associados, paralelamente a resultados *in vitro* em células leucêmicas, mostram que a expressão da ABCB1 reduz a concentração intracelular de daunorrubicina (antraciclina), e que a administração de inibidores da proteína aumenta o acúmulo da droga (BROXTERMAN e col., 1999 e TIDEFELT e col., 2000).

Três décadas de estudos sobre a resistência a múltiplas drogas identificaram várias maneiras de células tumorais driblarem a quimioterapia, e aparentemente esta resistência é contra todos os quimioterápicos efetivos existentes, inclusive os novos agentes anti-tumorais. Portanto a melhor compreensão desse fenótipo e a busca de novos tratamentos se tornam cada vez mais necessários para a solução da luta contra o câncer.

1.7 ATP

O ATP (adenosina 5'-trifosfato) desempenha um papel crucial no metabolismo energético intracelular. Além dessa função intracelular, o ATP também se encontra no compartimento extracelular. O ATP extracelular (ATPo) atua regulando vários processos biológicos, como a função cardíaca, neurotransmissão, vasodilatação, metabolismo hepático e inflamação (BURNSTOCK e KNIGHT, 2004).

As cascatas de sinalização desencadeadas pelo ATPo podem levar a apoptose, através de uma alteração da permeabilidade de membrana, através da indução de aberturas de poros (CHOW e col., 1997, DI VIRGILIO e col., 2001 e BURNSTOCK, 2004). Contraditoriamente, o ATPo é capaz de atuar como um mitógeno, induzindo a proliferação diversos tipos celulares (IKEHARA e col., 1981, HEPPEL e col., 1990, HOU e col., 2000, FRANKE e col., 2002 e SANCHES e col., 2002)

Enquanto a concentração intracelular de ATP varia em torno de 3-10mM, fisiologicamente, a concentração extracelular, no plasma, varia de 400-700nM (RYAN e col., 1996). Vários estudos mostram que o aumento da concentração extracelular de ATP pode ser citotóxico, inclusive em células tumorais (WHITE e BURNSTOCK, 2006).

Rapaport mostrou que, em células tumorais, o ATPo causa um acúmulo de ATP intracelular, provocando uma parada na fase S do ciclo celular, seguida de morte (RAPAPORT, 1983). Além disso, foi observado em células de câncer de mama, que a apoptose induzida pelo ATPo, está relacionada com o aumento dos níveis de cálcio intracelular (VANDEWALLE e col., 1994).

A concentração de ATPo pode aumentar, significativamente, devido a vários motivos, como inflamação, hipóxia e isquemia (LAZAROWSKI e col., 2003). Devido a sua citotoxicidade, a quantidade de ATPo deve ser controlada. Este controle é feito, em partes, pelas ecto-enzimas (ZIMMERMANN, 1996).

1.9 Ecto-enzimas

As ecto-enzimas, são assim chamadas por possuírem o sitio catalítico voltado para a face extracelular da membrana plasmática. Essas enzimas estão localizadas, principalmente, na membrana, porém existem isoformas clivadas e solúveis no meio intersticial. Sua atividade catalítica é dependente da presença de cátions divalentes, como o cálcio e o magnésio e do pH alcalino (ZIMMERMANN, 2000). Essas enzimas atuam não só de forma catalítica, mas também, participando da adesão celular ou como receptores transmembranares (WESTFALL e col., 1997 e MEYER-FERNANDES, 2002). Recentemente, alguns autores demonstraram essas enzimas parecem estar envolvidas nas etapas de migração, invasão e adesão de células tumorais, participando dos processos de angiogênese e metástase (JACKSON e col., 2007, ZHOU e col., 2007 e WANG e col., 2008).

As ecto-enzimas estão divididas em 4 famílias e são classificadas segundo a sua especificidade pelo substrato e pela sua distribuição tecidual: (1) ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPase), (2) ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), (3) fosfatase alcalina e (4) ecto-5'-nucleotidase (CD73) (BOURS e col., 2006). Em nosso trabalho, vamos nos aprofundar nas famílias das ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases e ecto-5'-nucleotidases.

As ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases são também chamadas de E-NTPDase, ecto-apyrase, ecto-ATPase ou CD39. Essas enzimas são capazes de hidrolisar nucleosídeos 5—trifosfatados e difosfatados (MEYER-FERNANDES e col., 1997). Esta família possui 7 membros (E-NTPDase 1-6 e -8), sendo que as E-NTPDases -1,-2,-3 e -8 estão envolvidas preferencialmente na quebra do ATP e

ADP (adenosina 5'-difosfato) em AMP (adenosina 5'-monofosfato) (BOURS e col., 2006) (Figura 4).

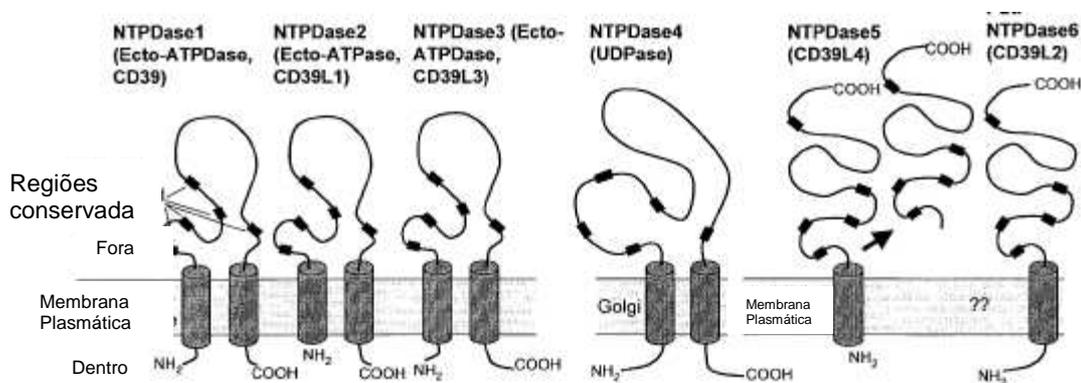


Figura 4: Estruturas das enzimas membros da família E-NTPDase. (Adaptado de ZIMMERMANN, 2000).

A ecto-5'-nucleotidase (CD73) é a enzima responsável pela etapa final da degradação de nucleotídeos extracelulares, ela é capaz de catalisar a hidrólise de AMP em adenosina, sendo assim a principal formadora de adenosina extracelular (ADO) (ZIMMERMANN, 2000) (Figura 5).

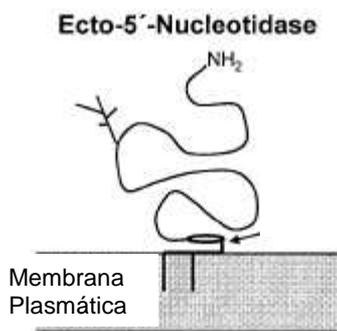


Figura 5: Estrutura bidimensional da ecto-5'-nucleotidase. (Adaptado de ZIMMERMANN, 2000).

1.8 Adenosina

Assim como o ATPo, a ADO possui um importante papel nos processos biológicos, porém, frequentemente, os efeitos da adenosina são opostos ao do ATP. No sistema imune, por exemplo, o ATP atua como um agente pró-inflamatório,

enquanto a adenosina possui um efeito anti-inflamatório (YEGUTKIN e col., 2002 e LUKASHEV e col., 2005).

A concentração de adenosina, no meio extracelular, é, fisiologicamente, dez vezes menor que a do ATPo, e varia em torno de 40-80nM, (YONEYAMA e col., 2004) e, assim como ele, quando se encontra em concentrações elevadas, pode ser citotóxico.

Os níveis de ADO podem ser regulados, não só pelas ecto-enzimas, mas também, pela adenosina cinase e pela adenosina deaminase (ADA). A primeira é uma enzima intracelular capaz de catalisar a fosforilação de ADO em AMP (MCGARAUGHTY e col., 2001). A ADA é uma enzima citosólica, mas pode aparecer no exterior da membrana plasmática (ecto-ADA), ela catalisa a deaminação da ADO em inosina, contribuindo assim para a remoção da adenosina do meio extracelular (CRISTALLI e col., 2001).

Em microambientes tumorais, o nível de ADO está aumentado e alguns autores sugerem que este aumento funcione como uma barreira contra o sistema imune (BLAY e col., 1997). Nessas concentrações a ADO é capaz de evitar a ativação e a proliferação de células CD8 citotóxicas (BUTLER e col., 2003).

As cascatas de sinalização desencadeadas, tanto pelo ATPo , quanto pela ADO, ocorrem pela capacidade que ambos tem de se ligar a receptores purinérgicos (SAWYNOK, 2007) (Figura 6).

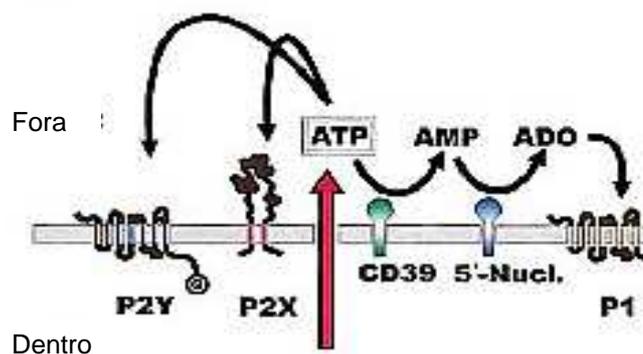


Figura 6: Receptores de nucleotídeos e as proteínas de membrana. As enzimas CD39 (Ecto-apirase) e CD73 (Ecto-5' nucleotidase) hidrolisam o ATP em seus subprodutos, e ambos são capazes de se ligar nos receptores purinérgicos (Adaptado de DI VIRGILIO e col., 2001).

1.11 Receptores purinérgicos

Existem 2 famílias de receptores purinérgicos, chamadas receptores P1 e receptores P2 (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998).

Os receptores P1 pertencem a superfamília dos receptores de sete domínios transmembranares, se ligam a adenosina e são subdivididos em receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} , e A_3 (FREDHOLM e col., 2001).

É importante observar que a inosina, produto da quebra da ADO, pode atuar como um agonista dos receptores A_1 , A_{2A} e A_3 , mesmo em concentrações micromolares (HASKO e col., 2004).

Os receptores P2 são divididos em 2 subfamílias: P2X e P2Y (ABBRACHIO E BURNSTOCK, 1994) (Figura 7).

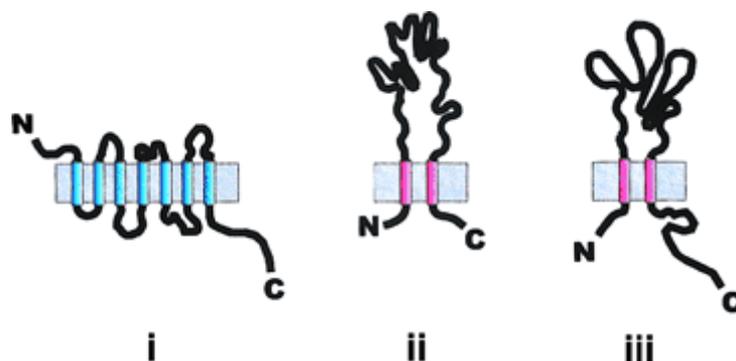


Figura 7: Estrutura bidimensional dos receptores P2Y e P2X. (I) Os receptores P2Y possuem sete domínios transmembranares que formam uma cadeia polipeptídica, com as porções N- e C- terminal do lado externo e interno da membrana citoplasmática, respectivamente. (II) Os receptores P2X por subunidades ancoradas na membrana plasmática e as porções N- e C- terminal voltadas para o lado citoplasmático. (III) Os receptores P2X₇ se diferenciam dos demais por possuírem a porção carboxiterminal mais extensa. (Adaptado de DI VIRGILIO e col., 2001).

Os receptores P2X são divididos em 7 subtipos (P2X₁₋₇). Esses receptores atuam como um formador de canal iônico não seletivo a cátions monovalentes e se ligam preferencialmente ao ATP (NORTH, 2002). A transdução de sinal ocorre pelo rápido influxo de Na⁺ e Ca⁺⁺ e efluxo de K⁺, desencadeando a despolarização da membrana plasmática e o aumento da concentração de Ca⁺⁺ no citosol. Essa drástica mudança na homeostase iônica intracelular, causada pela abertura dos receptores P2X, ativa uma série de mensageiros e enzimas intracelulares (DI VIRGILIO e col., 2001).

Os receptores P2Y são divididos em 8 subtipos (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) (BOEYNAEMS e col., 2003) e como a maioria dos receptores de sete domínios transmembranares, atuam acoplados a proteína G. O sinal de transdução ocorre pela ativação da fosfolipase C e/ou a estimulação/inibição da adenilato ciclase (BARNARD e col., 1994).

Os receptores P2Y são divididos segunda a afinidade com o seu ligante. Os receptores P2Y₁ e o P2Y₁₁ são receptores purinérgicos específicos, os receptores

P2Y₄ e o P2Y₆ são receptores pirimidinérgicos específicos, enquanto o receptor P2Y₂ possui afinidade equipotente com os dois ligantes (BOURS e col., 2006 e BOEYNAEMS e col., 2003).

1.12 O ATP, o câncer e a ABCB1

Por possuir atividade citotóxica em diversas células, inclusive em células tumorais, o ATPo passou a ser alvo de vários estudos contra o câncer.

Agteresch e colaboradores mostraram que a administração de ATP, em pacientes com carcinoma de não pequenas células em estágio avançado, foi capaz de melhorar a qualidade de vida, além de agir na manutenção do peso corporal, da força muscular e dos níveis de albumina no sangue, normalmente diminuídos durante a quimioterapia convencional (AGTERESCH e col., 2000).

Além deste trabalho, outros estudos descrevem importantes benefícios do ATP na oncologia. Estudos laboratoriais mostraram que a administração de ATP tem efeito protetor contra danos teciduais causados pela radioterapia, além de potencializar o efeito da mesma (SENAGORE e col., 1992 e ESTRELA e col., 1995). Existem, ainda, trabalhos que mostram que o ATP é capaz de aumentar os níveis intracelulares de drogas citostáticas em células de câncer de ovário, resultando assim, numa maior sensibilização do tumor (MAYMON e col., 1994).

Algumas evidências sugerem que essa potencialização do efeito do quimioterápico ocorra devido a capacidade do ATPo de reduzir a resistência a múltiplas drogas, através do bloqueio da ABCB1, evitando o efluxo da droga (ABRAHAM e col., 2001).

Foi demonstrado que o ATPo é um substrato da ABCB1, portanto pode ser transportado por ela, do meio intracelular para o meio extracelular. Acredita-se que, as células que possuem mais atividade da ABCB1 têm uma maior liberação de ATP (AL-AWQATI, 1995). Essa liberação de ATP pode ser na presença ou na ausência de substrato, uma vez que a presença do substrato parece aumentar a saída do ATP. Esta extrusão pode estar associada ao acoplamento do ATP intracelular e o substrato da proteína (ABRAHAM e col., 2001).

Como descrito anteriormente, a concentração de ATPo pode e deve ser regulada pela atividade das ecto-enzimas, logo, acredita-se que células capazes de liberar mais ATP para o meio extracelular, como as células MDR, possuam uma maior atividade dessas enzimas.

Vários estudos mostram que existe uma correlação direta entre a atividade da ecto-5'-nucleotidase e a expressão da ABCB1 (UJHÁZY e col., 1994, LEDOUX e col., 1997 e BERNARDO e col., 2006). Abraham e colaboradores propõem que, esse aumento da atividade das ecto-enzimas nas células MDR contribua para a formação de adenosina. Essa adenosina é capaz de entrar na célula pelos co-transportadores de Na/adenosina, fornecendo os precursores para a produção de ATP intracelular gerando mais energia para o funcionamento das bombas de efluxo, como a ABCB1 (ABRAHAM e col., 2001) (Figura 8).

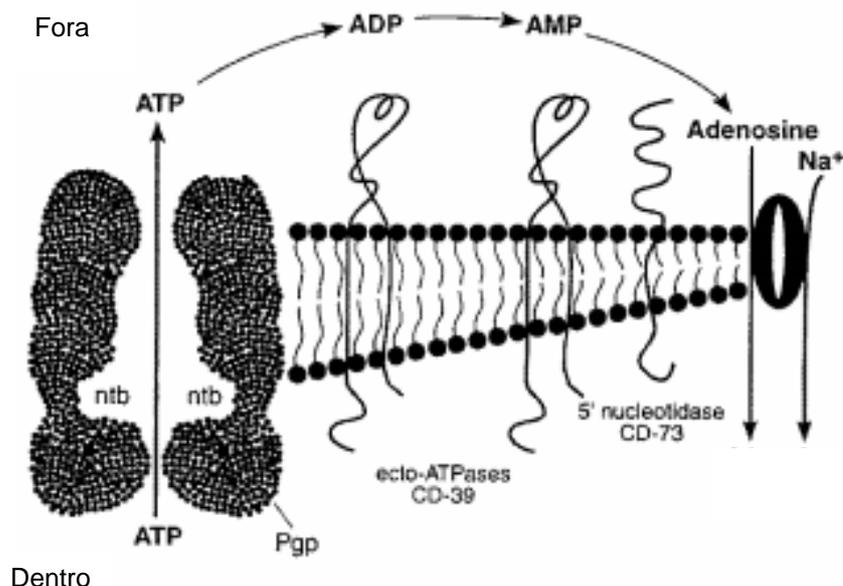


Figura 8: Modelo esquemático do transporte do ATP para fora da célula pela ABCB1 e a conversão extracelular de ATP em adenosina pelas ecto-enzimas. A extrusão de ATP, seguida da sua hidrólise extracelular é seguida da recaptação da adenosina pelos transportadores de nucleosídeos (Adaptado de ABRAHAM e col., 2001).

Em 2000, Thomas e colaboradores demonstraram em plantas e leveduras que a atividade da ecto-ATPase também está correlacionada com o fenótipo MDR, porém, essa correlação ainda não foi descrita em células humanas. Além disso, há evidências que as ecto-enzimas participem, indiretamente, do fenótipo MDR, uma vez que quando a atividade ATPásica é inibida, química ou geneticamente, há a perda da resistência a xenobióticos, por plantas e leveduras. Uma sugestão seria que a falta das ecto-enzimas aumentaria a concentração de ATP extracelular, afetando assim a extrusão dos xenobióticos (THOMAS e col., 2000).

No presente trabalho, iremos estudar o comportamento de células leucêmicas humanas, sensíveis e resistentes a múltiplas drogas, na presença do ATP e da adenosina extracelulares, além de verificar a existência da correlação da ABCB1 com a atividade das ecto-enzimas nas mesmas.

1.13 K562, Lucena-1 e FEPS

Desde os primeiros programas de estudos de quimioterapias, foram utilizadas linhagens celulares, P388 e L1210, linhagens de leucemia linfóide (FREI, 1982). Para compreender melhor o fenótipo MDR, foram criadas linhagens resistentes, a partir de células sensíveis, através da exposição crescente de quimioterápicos no meio de cultura (OKABE-KADO e col., 1983).

Neste projeto foram utilizadas três linhagens celulares, K562, linhagem parental sensível à quimioterapia, e K562-Lucena1 e FEPS, ambas derivadas da K562 e resistentes a múltiplas drogas.

As células K562 pertencem a uma linhagem originada de uma leucemia mielóide crônica em crise blástica eritroleucemia humana, e caracteriza-se por expressar o oncogene quimérico BCR-ABL no cromossomo Philadelphia (KOEFFLER e GOLDE, 1980).

As células do tipo Lucena-1 são derivadas da K562, as quais foram submetidas a concentrações crescentes de um quimioterápico, derivado de alcalóides da vinca, denominado vincristina (VCR), (RUMJANEK e col., 2001). A nova linhagem, Lucena-1, apresenta cinco vezes mais cópias do gene *mdr-1* (que codifica a ABCB1) que sua linhagem parental K562 (BRINDEIRO, 1999). Assim, apresenta resistência não só a VCR, mas também a drogas estruturalmente não-relacionadas, caracterizando o fenômeno MDR (MAIA e col., 1996).

As células da linhagem FEPS, foram selecionadas a partir da linhagem K562, exposta a concentrações crescentes de daunorrubicina (DNR). Esta linhagem possui

expressão e atividade da ABCB1 e da proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (ABCC1 ou MRP) (PINTO-SILVA, 2007).

Os estudos do fenótipo MDR são realizados comparando sempre uma linhagem celular resistente e uma sensível. O nosso modelo experimental se diferencia por observar as alterações em diferentes níveis de resistência, obtidas por exposição da mesma linhagem parental a diferentes agentes quimioterápicos, se assemelhando ao que ocorre na clínica.

2. OBJETIVOS

Objetivos

- Caracterizar o modelo experimental;
 1. Avaliando a expressão e a atividade da ABCB1 nas linhagens leucêmicas.
 2. Analisando a velocidade de duplicação celular nessas linhagens.
 3. Verificando a existência do fenótipo de resistência a múltiplas drogas nas células através da viabilidade celular na presença de diferentes quimioterápicos.
- Analisar a viabilidade das células na presença do ATP e da adenosina extracelulares.
- Verificar o mecanismo de indução de morte pela adenosina.
- Verificar a atividade das ecto-enzimas nas linhagens leucêmicas.
- Avaliar a ação do ATP e da adenosina extracelulares na atividade da ABCB1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Métodos

3.1.1 Cultura de células

As células das linhagens K562, Lucena-1 e FEPS foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm³, a uma concentração de 2 x 10⁴ céls/ml, num volume total de 5ml de meio RPMI, com 10% de soro fetal bovino (SFB). Na cultura de Lucena-1 foi adicionada vincristina (VCR) (concentração final de 60nM) e nas células FEPS, daunorrubicina (DNR) (concentração final de 466nM), a fim de manter suas características de resistência a múltiplas drogas. As culturas foram mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C e subcultivadas a cada três dias.

3.1.2 Isolamento de linfócitos

Para a obtenção de linfócitos, foi coletado sangue periférico de voluntários saudáveis. As células mononucleares foram obtidas de sangue heparinizado em centrifugação por gradiente de densidade com Ficoll-Histopaque. O sangue coletado foi adicionado ao Ficoll, na proporção 3:4 e centrifugado por 30 minutos a 400g. A camada de células mononucleares foi retirada e lavada três vezes com 20ml de PBS e centrifugado a 200g por 10 min. Os linfócitos foram separados dos monócitos por aderência destes últimos, por 2 horas em placa de cultura, em estufa com 5% de CO₂, a 37°C.

3.1.3 Velocidade de duplicação celular

Para avaliar a velocidade do ciclo celular de cada linhagem, as células foram contadas após 72 horas nas condições de cultura descritas acima. O valor de X encontrado, em quantidade de ciclos celulares, foi extraído da seguinte equação: $N_{\text{final}} = 2^X N_0$, onde N_{final} é o número total de células encontrado, após o tempo proposto e N_0 é a concentração inicial de células na cultura. Se no decorrer de 72

horas ocorreram X duplicações, conclui-se que o tempo de cada duplicação pode ser calculado dividindo 72 horas por X, que é deduzido da fórmula acima.

Exemplo:

$$N_{\text{final}} = 36 \times 10^4 \text{ células e } N_0 = 2 \times 10^4 \text{ células}$$

$$N_{\text{final}} = 2^x N_0$$

$$36 \times 10^4 = 2^x \cdot 2 \times 10^4$$

$$2^x = 36/2 = 18$$

$$\log 2^x = \log 18$$

$$X \log 2 = \log 18$$

$X = \log 18 / \log 2 = 1,25 / 0,30 = 4,16$ ciclos celulares no período de 72 horas, logo o tempo de duplicação, ou de cada ciclo celular é $= 72 / 4,16 = 17,3$ horas.

3.1.4 Expressão da glicoproteína P

As células K562, Lucena-1 e FEPS foram utilizadas para verificar a diferença na expressão da ABCB1 em células leucêmicas, não resistentes e resistentes a quimioterápicos, verificando também a sua relação com o tempo em cultura. Para a realização do experimento as células foram ajustadas para 2×10^4 células por poço, em placas de 24 poços, com meio RPMI, com 10% de SFB e mantidas em estufa de CO_2 5% a 37°C , por 72 horas.

Após o tempo em cultura, cada linhagem foi ajustada para 2×10^5 células por ponto, sendo esses: controle negativo (Neg), controle de marcação de anticorpo

secundário (Sec) e marcação de anti-ABCB1. As células foram lavadas em salina tamponada com fosfato (PBS) com 5% de SFB, e marcadas com anticorpo anti-ABCB1 na diluição 1:20, no volume final de 100µl, e mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 100µl de PBS com 5% de SFB, as células foram centrifugadas a 200g por 7 minutos, descartando o sobrenadante. Os pontos Sec e anti-ABCB1 foram ressuspensos com anticorpo secundário na diluição 1:300, no volume final de 100µl, e mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram lavadas com 200µl com PBS com 5% de SFB, e ressuspensas em 400µl de PBS com 5% de SFB para leitura em citômetro de fluxo FACSCalibur (Beckton & Dickinson). As células foram separadas em uma região de acordo com a sua granulosidade e tamanho, desta região foram adquiridas 10.000 células para análise.

3.1.5 Atividade da ABCB1

3.1.5.1 Atividade da ABCB1 em linhagens leucêmicas

As linhagens foram mantidas 3 dias em cultura e após esse tempo a atividade da ABCB1 foi medida por ensaio com Rho.

As células (2×10^5 céls/ponto) foram incubadas por 30 min na estufa com Rho nas concentrações finais de 200 e 500ng/ml (90µl) na presença ou na ausência de Verapamil na concentração final de 10µM (10µl), ambos diluídos em meio RPMI com 10% de SFB, para que houvesse o acúmulo do substrato dentro da célula. Posteriormente, adicionou-se 100µl de meio RPMI com 10% de SFB, centrifugou-se a 200g por 4 min e descartou-se o sobrenadante.

Colocou-se 90ul de meio RPMI com 10% de SFB na presença e na ausência de Verapamil. As células foram incubadas por 10 min na estufa, para que ocorresse a extrusão parcial da Rodamina 123. Posteriormente, adicionou-se 100ul de meio RPMI com 10% de SFB, centrifugação a 200g por 4 min e descarte do sobrenadante.

As células foram ressuspensas em 200ul de PBS e o experimento foi lido em citometria de fluxo (FACSCAN).

3.1.5.2 Atividade da ABCB1 nas linhagens leucêmicas na presença de adenosina

As linhagens foram mantidas 3 dias em cultura e após esse tempo a atividade da ABCB1 foi medida por ensaio com Rho.

As células (2×10^5 céls/ponto) foram incubadas por 30 min na estufa com Rho 500ng/ml (90ul) na presença e na ausência de Verapamil, na concentração final de 10μM (10ul) ou ADO, nas concentrações finais de 2,5 e 5mM (10ul), ambos diluídos em meio RPMI com 10% de SFB. Posteriormente, adicionou-se 100ul de meio RPMI com 10% de SFB, centrifugação a 200g por 4 min e descarte do sobrenadante.

Colocou-se 90ul de meio RPMI com 10% de SFB na presença e na ausência de Verapamil ou ADO (10ul). As células foram incubadas por 10 min na estufa. Posteriormente, adicionou-se 100ul de meio RPMI com 10% de SFB, centrifugação a 200g por 4 min e descarte do sobrenadante.

As células foram ressuspensas em 200ul de PBS e o experimento foi lido em citometria de fluxo (FACSCAN).

3.1.5.3 Atividade da ABCB1 em linfócitos normais na presença de ATP e

adenosina

As células (1×10^6 céls/ponto) foram incubadas por 30 min na estufa com Rho 200ng/ml (90 μ l) na presença e na ausência de Verapamil, na concentração final de 5 μ M (10 μ l) ou ADO ou ATP, na concentração final de 5mM (10 μ l), ambos diluídos em meio RPMI com 10% de SFB. Posteriormente, adicionou-se 100 μ l de meio RPMI com 10% de SFB, centrifugação a 200g por 4 min e descarte do sobrenadante.

Colocou-se 90 μ l de meio RPMI com 10% de SFB na presença e na ausência de Verapamil ou ADO ou ATP (10 μ l). As células foram incubadas por 30 min na estufa. Posteriormente, adicionou-se 100 μ l de meio RPMI com 10% de SFB, centrifugação a 200g por 4 min e descarte do sobrenadante.

As células foram ressuspensas em 200 μ l de PBS e o experimento foi lido em citometria de fluxo (FACSCAN).

3.1.6 Viabilidade Celular

A fim de verificar a viabilidade celular das células K562, Lucena e FEPS na presença de diferentes agentes, foram feitas culturas em uma placa de 96 poços. Cada poço possui uma concentração final de 2×10^4 céls/ml. Foram feitos controles de cada linhagem celular, célula na presença de meio RPMI e 10% de soro fetal bovino. Além disso, as células foram incubadas com diferentes concentrações de VCR, (3,75; 7,5; 15; 30; 60nM), de DNR, (29,12; 58,25; 116,5; 233; 466nM), ATP e adenosina extracelulares (1; 2,5; 5; 10mM) em todas as linhagens celulares.

Em seguida, as células foram colocadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C, por 7 dias com os quimioterápicos e por 3 dias com os nucleotídeos extracelulares. Após este período a viabilidade celular foi avaliada através do teste colorimétrico com MTT.

O teste colorimétrico com MTT (brometo de 3,4,5-dimetiazol-2-il-2,5-difeniltetrazol) mede a atividade desidrogenase mitocondrial, sendo um método colorimétrico baseado na habilidade de células vivas reduzirem o sal tetrazolium a um produto formazan. Foram adicionados a cada poço das placas utilizadas 20µl de uma solução de MTT diluída em salina a uma concentração de 5mg/ml. As placas foram mantidas na estufa por 3 horas. Posteriormente as placas foram centrifugadas a 200g, durante 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e aos cristais localizados no fundo da placa, adicionou-se 200µl de DMSO. A intensidade de coloração foi medida no aparelho Thermomax™ microplate reader, (Molecular Devices), a um comprimento de onda de 490nm.

3.1.7 Detecção da apoptose por anexina V:

A detecção da apoptose foi realizada por citometria de fluxo, utilizando a Anexina V-FITC e PI para diferenciar a morte por apoptose e por necrose. K562, Lucena 1 e FEPS foram ajustadas para a concentração de 1×10^5 céls/ml e mantidas por 24 e 72 horas em cultura, na presença e na ausência de adenosina (concentração final de 5mM). Posteriormente, as células restantes foram lavadas com PBS e ressuspensas em Anexina V-FITC diluída em tampão de ligação no volume final de 100µl (1:500). O experimento foi incubado por 20 min a temperatura ambiente e em seguida foram adicionados 200µl de tampão de ligação e 2µl de

Iodeto de propídeo [1mg/ml]. As células marcadas foram analisadas por citometria de fluxo.

3.1.8 Dosagem da Atividade Ecto-5'-Nucleotidásica

Em um tubo foram colocados 5'-AMP (na concentração final de 5mM), NaCl (120mM), KCl (30mM), glicose (4mM), HEPES-KOH (20mM), pH 7,2 e $1,0 \times 10^6$ células, num volume de reação de 0,5 mL. Após 1h de reação, adiciona-se 1mL de carvão ativado em HCl 0,1N e procede-se a centrifugação dos tubos a 1500x g por 15 minutos. Transfere-se uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante para um segundo tubo e adiciona-se 0,5 mL do reagente de Fiske e Subbarow (FeSO_4 , H_2SO_4 e $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e faz-se a leitura em 650nm. Para converter as leituras em atividade utiliza-se a comparação com a curva-padrão de Pi.

3.1.9 Dosagem da Atividade Ecto-ATPásica

Em um tubo foram colocados ATP (na concentração final de 5mM), 1×10^6 células/mL, NaCl (120mM), KCl (30mM), glicose (4mM), HEPES-KOH (20mM), pH 7,2, MgCl_2 (5mM) e $2,5 \times 10^6$ CPM.mL⁻¹ [$\gamma^{32}\text{-Pi}$] ATP como traçador. Após 1h de reação, os tubos foram adicionados de 1mL de carvão ativo em HCl 0,1N, centrifugados e uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante dos tubos são transferidos para papéis de filtro de 2,5 x 6 cm. Após secar, os papéis foram colocados em *vials* de cintilação líquida com 0,2g de POPOP/L tolueno e mediu-se a radiação por cintilação líquida.

Os experimentos de medida da atividade das ecto-enzimas foram realizados no laboratório de Bioquímica Celular, em colaboração com o estudante de doutorado André Luiz Fonseca de Souza.

3.1.10 Análise estatística

Todos os experimentos analisados estatisticamente foram realizados pelo menos três vezes. Foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni ou Dunnett. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$.

3.2 Materiais

[γ -³²Pi] – Obtido de Amersham Biosciences.

5'-AMP, Adenosina, Anexina V-FITC, ATP (Adenosine 5'-Triphosphate Sodium Salt), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT), Dimetilsufóxido (DMSO), HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*), Iodeto de propídeo (PI), Ribonuclease A (RNAse), Rodamina 123, Salina (NaCl 0,9%), Verapamil, - Obtidos de Sigma-Aldrich Corp. St..

Anticorpo anti-ABCB1 – Obtido de Dakocytomation, Mouse Anti-Human Pgp 4E3.

Anticorpo secundário – Obtido de Southern Biotechnologic Associates, Inc. Goat-Anti-Mouse IgG (H+L) – FITC.

Carvão ativado, Glicose, KCl, NaCl, NH₄Mo₇O₂₄.4H₂O - Obtidos de Reagen.

Cloridrato de Daunorrubicina (DNR) - Obtido de Pfizer.

FeSO₄, H₂SO₄, HCl, HEPES-KOH – Obtidos de Vetec.

Ficoll-Paque Plus – Fornecido por GE Healthcare.

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

Meio de Cultura – meio RPMI-1640 10,4g/l (Sigma), preparado com Estreptomicina 10mg/l (Sigma), Penicilina 60mg/l (Sigma) e β -mercaptoetanol 5 μ M (Sigma). Todos os reagentes foram adicionados em 1l de água deionizada e filtrados por uma membrana de nitrocelulose 0.22 μ m (MILLIPORE). O pH foi ajustado para 7,2 - 7,4.

MgCl₂ – Obtido de Calbiochem.

Soro Bovino Fetal (SFB) – fornecido por Gibco. Utilizado em meio a 10% (v/v).

Tampão Salina-Fosfato (PBS) – 8,0g NaCl (Merck), 0,2g KCl (Reagen), 1,15g NaH₂PO₄ . H₂O (Reagen), 0,2g Na₂HPO₄ . 7H₂O (Reagen). Reagentes solubilizados em 1L de água deionizada, pH 7,4, utilizando NaOH ou HCl.

Vincristina (VCR) – fornecido por Eli Lilly.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão da Glicoproteína P nas diferentes linhagens leucêmicas

A glicoproteína P foi estudada nas células K562, Lucena e FEPS, visando averiguar os diferentes níveis de expressão em cada linhagem. Para isso as células foram marcadas com anticorpo, anti-ABCB1 humano e a intensidade de fluorescência foi medida por citometria de fluxo. Foi observado que as células da linhagem parental K562 não expressam ABCB1, enquanto que as células Lucena e FEPS expressam altos níveis desta proteína (Figura 9).

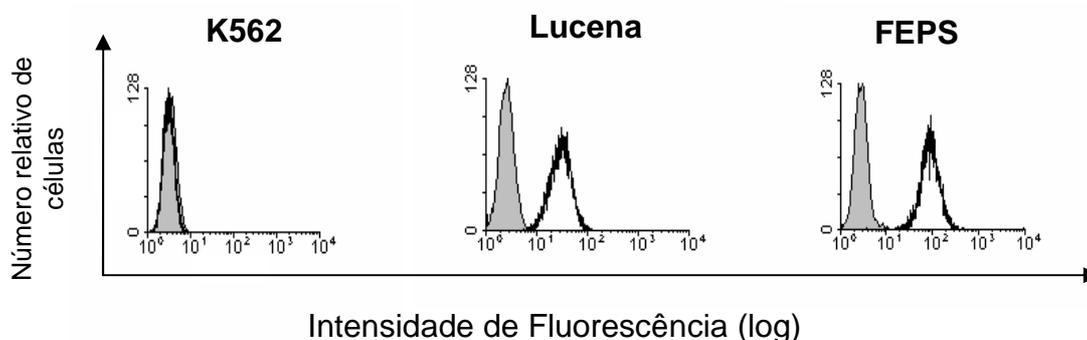


Figura 9: Expressão da ABCB1 nas linhagens K562, Lucena e FEPS. As células das linhagens K562, Lucena e FEPS ficaram em cultura por 72h. Após este tempo as células (2×10^5 céls) foram incubadas com anticorpo anti-ABCB1, por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente as células foram lavadas com PBS com 5% de SFB e incubadas com anticorpo secundário, por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram então lavadas e ressuspensas em PBS com 5% de SFB e a intensidade de fluorescência celular medida por citometria de fluxo. Em cinza, marcação do controle de anticorpo secundário; histograma vazado, marcação do anticorpo anti-ABCB1. Esta figura é representativa de 8 experimentos.

Ao comparar as linhagens Lucena e FEPS observamos que as células da linhagem FEPS apresentaram a maior expressão de ABCB1 entre as linhagens, tendo a média da intensidade de fluorescência de $53,2 \pm 7,5$, enquanto as células da linhagem Lucena apresentaram uma expressão de $22,0 \pm 3,4$. A diferença encontrada na expressão da glicoproteína P, foi de $31,2 \pm 8,2$. (Figura 10).

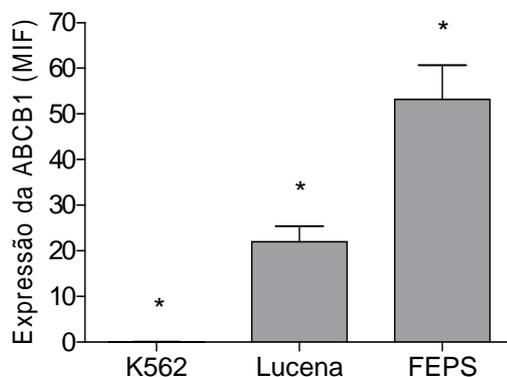


Figura 10: Diferença da expressão da ABCB1 entre as linhagens K562, Lucena e FEPS. As células das linhagens K562, Lucena e FEPS ficaram em cultura por 72h. Após este tempo as células (2×10^5 céls) foram incubadas com anticorpo anti-ABCB1, por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente as células foram lavadas com PBS com 5% de SFB e incubadas com anticorpo secundário, por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram então lavadas e ressuspensas em PBS com 5% de SFB e a intensidade de fluorescência celular medida por citometria de fluxo. O resultado está expresso como média da intensidade de fluorescência (MIF) \pm erro padrão de 8 experimentos diferentes. O valor da intensidade de fluorescência foi obtido pela diferença entre a intensidade de fluorescência do anticorpo anti-ABCB1 e a intensidade de fluorescência do anticorpo secundário. (*) valores estatisticamente diferentes entre si, $p < 0,05$.

4.2 Atividade da ABCB1 nas linhagens K562, Lucena e FEPS

A fim de verificar se a ABCB1 expressa apresentava atividade, as células foram incubadas na presença de Rodamina 123 (Rho) em diferentes concentrações, na presença e na ausência do inibidor da ABCB1: Verapamil (VP)

A atividade foi avaliada pelo acúmulo de Rho na ausência do inibidor, e posteriormente pelo aumento deste acúmulo na presença do inibidor, medido através da intensidade de fluorescência, por citometria de fluxo.

O histograma foi dividido em duas regiões, chamadas M1, onde se observa o controle negativo, e M2, onde há o deslocamento da intensidade de fluorescência, indicando a porcentagem do aumento do acúmulo de Rodamina 123 (Figura 11).

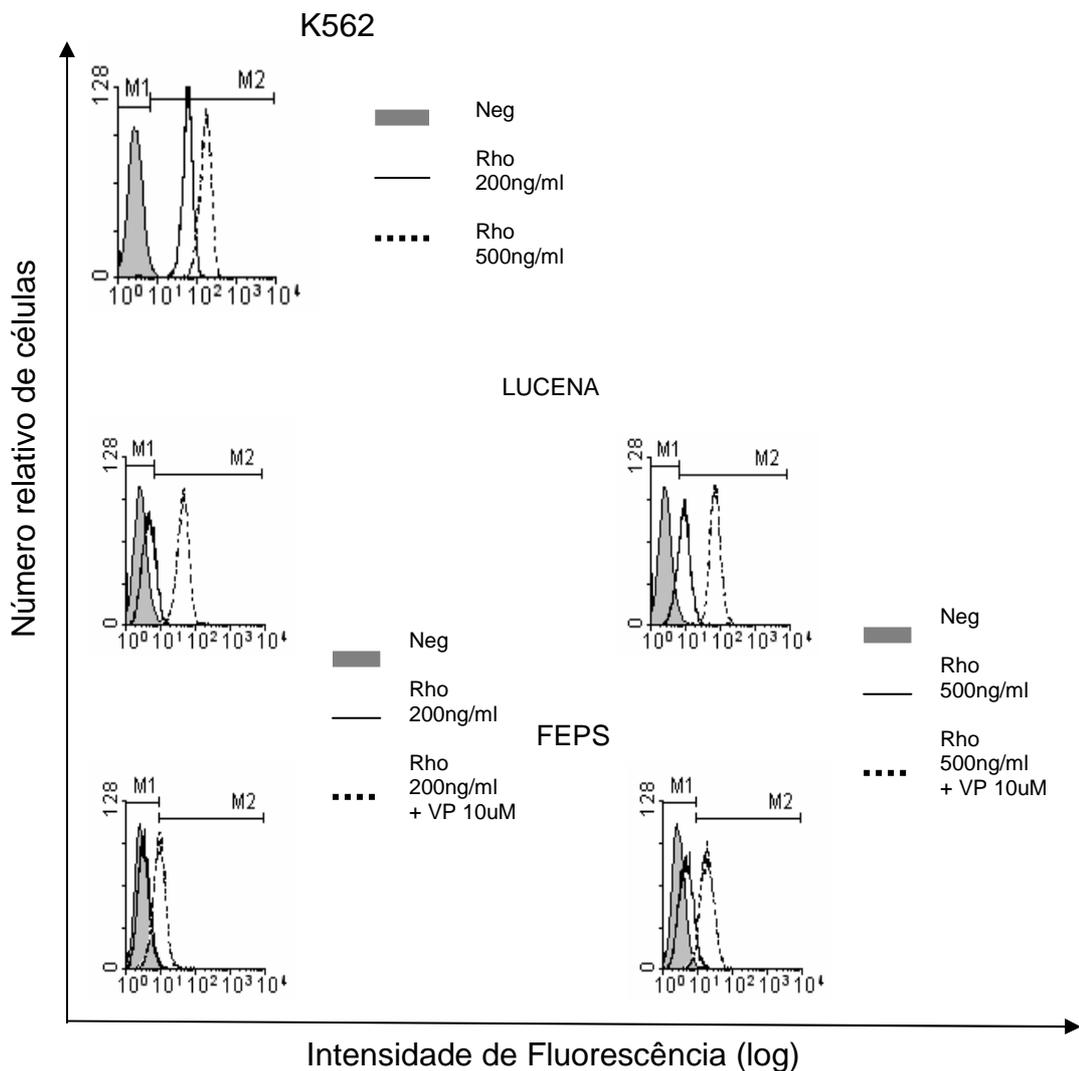


Figura 11: Atividade da ABCB1 nas linhagens K562, Lucena e FEPS. As células K562, Lucena e FEPS foram incubadas com rodamina 123 (200 e 500ng/ml) (Rho), sem ou com o inibidor da ABCB1 (verapamil – VP, na concentração 10 μ M) por 30 minutos a 37°C. Após este período as células foram lavadas e incubadas com ou sem o inibidor de ABCB1 por mais 10 minutos a 37°C, para que houvesse uma extrusão parcial da Rho. As células foram lavadas e o acúmulo de fluorescência foi analisado por citometria de fluxo. M1: controle negativo, M2: aumento do acúmulo de Rho. Esta figura é representativa de 3 experimentos.

O grande acúmulo de Rho nas células K562, evidenciado pela porcentagem de células na região de alta fluorescência do gráfico, na presença e na ausência dos inibidores, indica que esta linhagem não possui atividade da ABCB1 (Figura 11).

Corroborando o resultado da expressão da ABCB1, as células Lucena possuem atividade da ABCB1, esta atividade pode ser revertida na presença de

inibidores, o que pode ser verificado através do deslocamento de quase 100% da população de células para a região M2 na presença do inibidor VP.

Quando comparamos as linhagens Lucena e FEPS notamos que a segunda possui uma atividade maior da ABCB1, assim como a expressão. Observamos que a FEPS foi capaz de expulsar praticamente 100% de Rho, inclusive na maior concentração da mesma. Além disso, a mesma concentração de inibidor que é capaz de reverter totalmente a atividade da ABCB1 na Lucena, não possui essa eficácia na linhagem FEPS.

4.3 Velocidade de duplicação das linhagens K562, Lucena-1 e FEPS

Darzynkiewicz e colaboradores (1981) e Myc e colaboradores (1991) mostraram que a retenção de rodamina 123 em linfócitos do sangue periférico e em células leucêmicas se diferenciava entre células que estão se dividindo e células quiescentes, sugerindo que células paradas no ciclo possuem maior expressão do fenótipo MDR, e que haveria uma regulação negativa pela indução da proliferação dessas células (DARZYNKIEWICZ e col., 1981 e MYC e col., 1991). Posteriormente, foi mostrado que a indução de proliferação em progenitores hematopoéticos normais e em blastos leucêmicos resultava no aumento da sensibilidade destas células em relação a antraciclinas (MINDERMAN e col., 1994).

A fim de verificar a velocidade do ciclo celular nas linhagens estudadas, estas foram mantidas em cultura e após três dias foi feita uma contagem para avaliar a velocidade de duplicação dessas células (Figura 12).

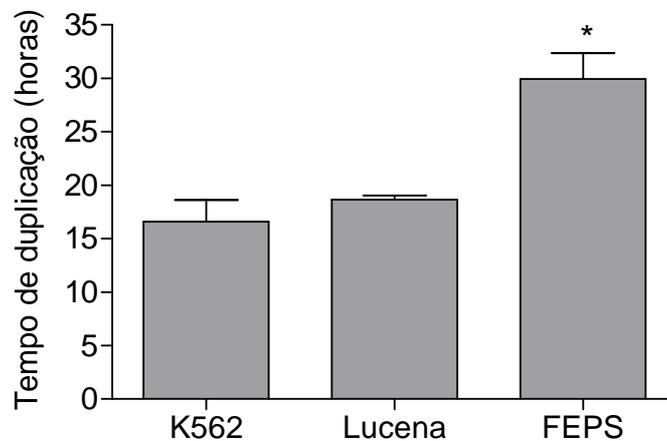


Figura 12: Tempo do ciclo celular. As células K562, Lucena e FEPS foram mantidas em cultura por 72 horas e posteriormente contadas para o cálculo do tempo do ciclo celular. A quantidade de ciclos celulares (x) em 72h foi calculada usando a seguinte expressão: $N_{\text{final}} = 2^x N_0$, onde N_{final} é o número total de células encontrado, após o tempo proposto e N_0 é a concentração inicial de células na cultura. O tempo de duplicação foi calculado dividindo 72 h pelo número de ciclos encontrado. O resultado está expresso como média \pm erro padrão de 6 experimentos diferentes. (*) $p < 0,01$;

As células da linhagem K562 apresentaram o tempo de duplicação de $16,60 \pm 2,02$ horas, enquanto a linhagem Lucena apresentou o tempo de $18,66 \pm 0,38$ horas, não havendo, portanto, uma diferença significativa entre estas duas células. Entretanto, a linhagem FEPS possui o tempo de ciclo celular de $29,95 \pm 2,39$ horas, mostrando-se mais lenta na divisão celular que as demais linhagens. Comparando as linhagens com o fenótipo MDR, Lucena e FEPS, estas apresentaram uma diferença de $11,29 \pm 2,89$ horas, no tempo de divisão celular, sendo a primeira mais rápida que a segunda.

4.4 Ação de quimioterápicos

Uma das características de linhagens MDR é a extrusão de quimioterápicos, impedindo que atinjam uma concentração intracelular eficaz. Para verificar a sua resistência, que é conferida pela extrusão dos quimioterápicos pela proteína

estudada, as linhagens K562, Lucena e FEPS ficaram em cultura durante 7 dias na presença de Vincristina (VCR) e Daunorrubicina (DNR) (Figura 13).

As células K562 apresentam uma grande sensibilidade aos quimioterápicos, já as células da linhagem Lucena são resistentes a VCR, quimioterápico pelo qual foi selecionada e com DNR elas se mostram pouco sensíveis, porém não há diferença na viabilidade com o aumento da concentração. No entanto, as células FEPS mostraram-se resistentes aos dois quimioterápicos em qualquer concentração utilizada, mostrando-se resistentes não só ao quimioterápico pelo qual foi selecionado.

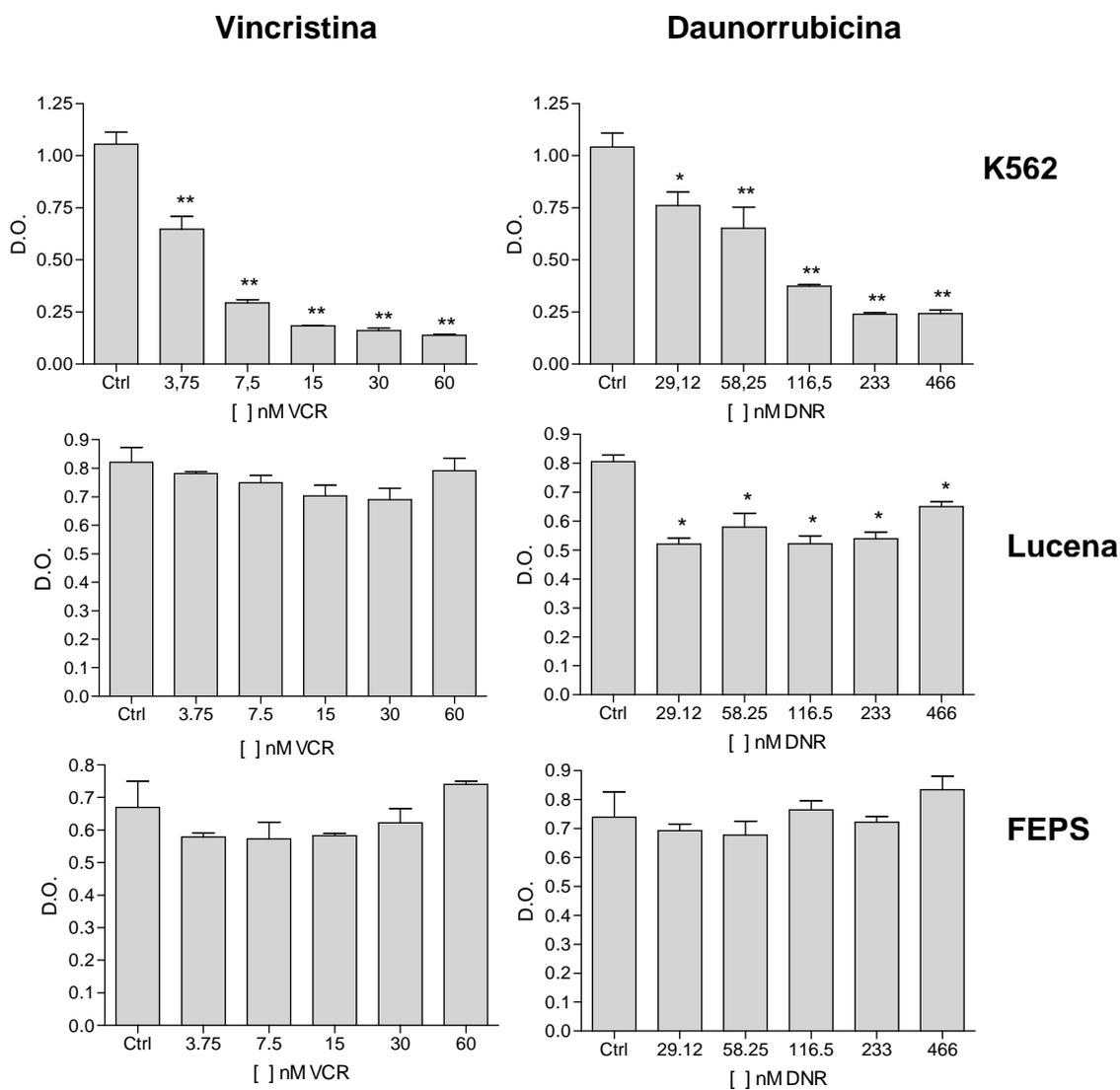


Figura 13: Viabilidade das linhagens K562, Lucena e FEPS na presença de quimioterápicos. As células K562, Lucena e FEPS foram incubadas com os quimioterápicos, vincristina (VCR) e daunorrubicina (DNR), por 7 dias a 37°C. Vincristina: células incubadas com VCR nas concentrações de 3,75 – 60nM. Daunorrubicina: células incubadas com DNR nas concentrações de 18,75 – 466ng/ml. Viabilidade medida por MTT. D.O.: densidade ótica. O resultado está expresso como média ± erro padrão de 3 experimentos diferentes, feitos em triplicata. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**) quando comparado ao controle.

4.5 Atividade das ecto-enzimas nas linhagens leucêmicas

O acúmulo de ATPo é controlado pelas ecto-enzimas que são capazes de hidrolisar o ATP e seus metabólitos. A metabolização extracelular dos nucleotídeos é afetada por ecto-enzimas como CD39 (ecto-apirase) e CD73 (ecto-5'-nucleotidase), expostas na membrana celular.

4.5.1 Atividade da ecto-5' nucleotidase (CD73)

Há evidências de uma correlação direta entre a superexpressão da ABCB1 e o aumento de atividade da ecto-5' nucleotidase em humanos. A fim de confirmar essa correlação em células de LMC humana, foi medida a atividade dessa enzima, nas linhagens K562, Lucena e FEPS após 72 horas em cultura (figura 14).

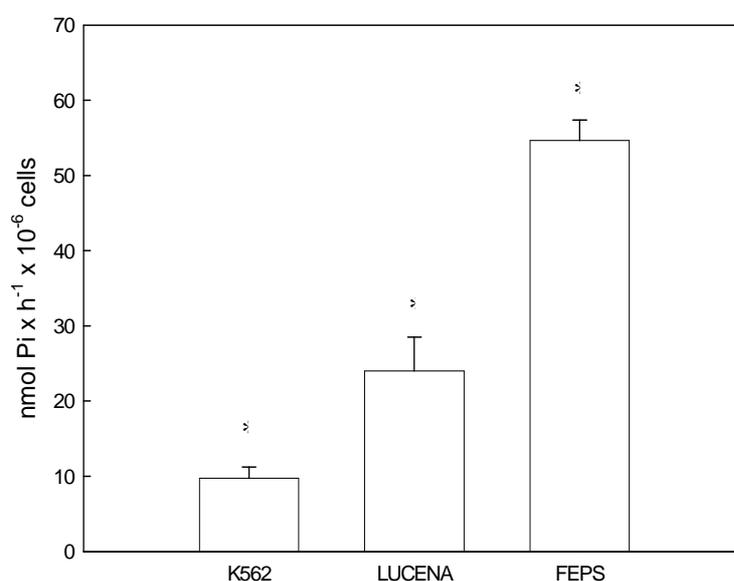


Figura 14: Atividade da ecto-5' Nucleotidase. As células K562, Lucena e FEPS foram mantidas em cultura por 72 horas e posteriormente avaliada a atividade da ecto-enzima ecto-5' Nucleotidase. O resultado está expresso como média \pm erro padrão de 5 experimentos diferentes, feitos em triplicata. (*) valores estatisticamente diferentes entre si, $p < 0,001$.

As células da linhagem FEPS possuem maior atividade de ecto-5' nucleotidase que as da Lucena, que por sua vez têm atividade maior que a da linhagem sensível K562. Esse resultado mostra que concomitantemente ao aumento

de expressão da ABCB1, há o aumento da atividade da ecto-5' nucleotidase também em células de LMC humana.

4.5.2 Atividade da ecto-ATPase (CD39)

Alguns autores acreditam que o aumento da ecto-5' nucleotidase em células resistentes se deve a extrusão de ATP pela ABCB1, como forma de controlar o acúmulo do mesmo. Essa enzima é capaz de hidrolisar o 5'AMP em adenosina acreditamos, portanto, que deve haver essa correlação numa etapa anterior da hidrólise de ATP, como o aumento da ecto-ATPase, capaz de quebrar o ATP em ADP e AMP. No entanto, essa correlação ainda não foi demonstrada em células humanas.

Para verificar se o aumento de ABCB1 está diretamente relacionado ao aumento da atividade da ecto-ATPase, foi medida a atividade dessa enzima, nas linhagens K562, Lucena e FEPS após 72 horas em cultura (figura 15).

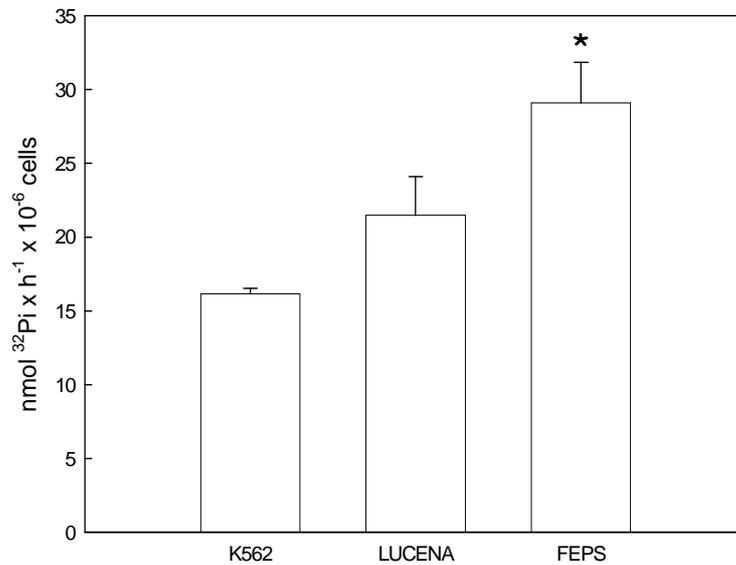


Figura 15: Atividade da ecto-ATPase. As células K562, Lucena e FEPS foram mantidas em cultura por 72 horas e posteriormente avaliada a atividade da ecto-enzima ecto-ATPase. O resultado está expresso como média \pm erro padrão de 5 experimentos diferentes, feitos em triplicata. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,005$ (*) quando comparado às outras linhagens.

As células da linhagem FEPS apresentaram uma diferença significativa do aumento da ecto-ATPase quando comparadas às outras linhagens que possuem menor expressão de ABCB1. Apesar da linhagem Lucena não apresentar uma diferença significativa em relação a K562, notamos uma tendência, quando observamos as três linhagens, de que o aumento da ABCB1 está diretamente relacionado com o aumento da atividade da ecto-ATPase.

Os resultados mostram que há uma correlação, também, entre a expressão de ABCB1 e o aumento de atividade da ecto-ATPase em células de LMC humana.

4.6 Efeito do ATPo na viabilidade celular em linhagens leucêmicas

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

Investigou-se se as linhagens celulares que apresentam um fenótipo de resistência a múltiplas drogas, Lucena, que superexpressa ABCB1 e FEPS, que superexpressa ABCB1 e ABCC1, apresentariam sensibilidades diferentes aos efeitos deletérios do ATP extracelular (ATPo), quando comparados com a linhagem parental K562 (Figura 16).

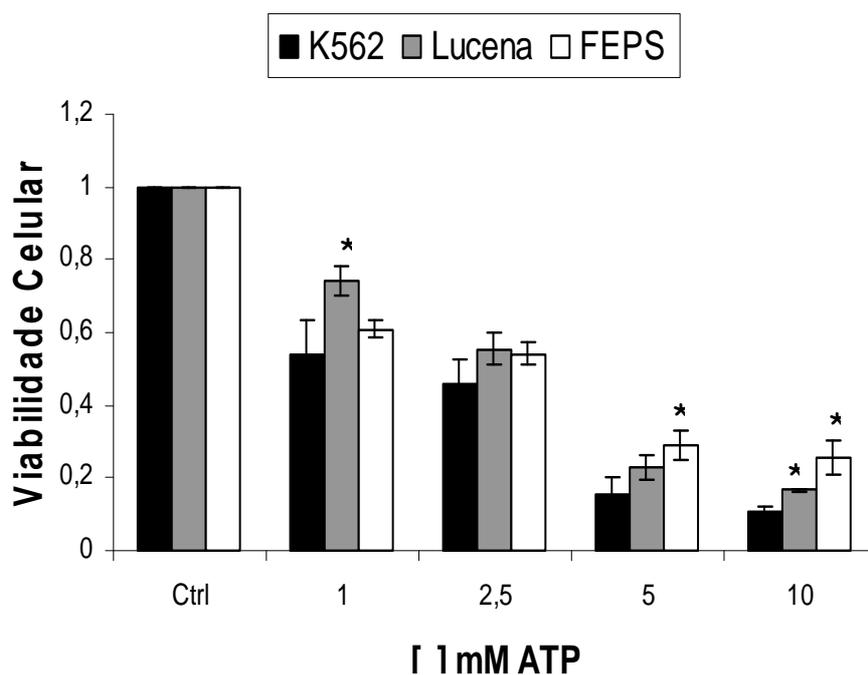


Figura 16: Viabilidade das linhagens K562, Lucena e FEPS na presença de ATPo. As células K562, Lucena e FEPS foram incubadas com ATPo nas concentrações de 1-10mM por 72h . A viabilidade celular foi medida por MTT. Os valores se referem à média \pm erro padrão da média de 3 experimentos diferentes, feitos em triplicata. (*) $p < 0.05$ em relação a K562 na mesma concentração.

As 3 linhagens mostraram-se sensíveis à ação do ATPo. A linhagem FEPS apresentou uma pequena resistência quando comparada às outras linhagens, porém essa resistência não pode ser comparada à resposta aos quimioterápicos. É possível que essa resistência, esteja ligada a maior atividade ecto-ATPásica promovendo a quebra do ATPo.

4.7 Efeito da adenosina extracelular na morte celular em linhagens leucêmicas

Pelo fato das linhagens estudadas possuírem as ecto-enzimas ativas na superfície celular e dos metabólitos do ATP serem, também, citotóxicos, foi sugerido que a morte observada pela incubação com ATP, na verdade, poderia estar sendo causada pelo produto final da sua hidrólise, a adenosina.

Além disso, o nosso grupo demonstrou anteriormente, que as linhagens K562 e Lucena parecem não possuir um receptor P2X₇ funcional, corroborando a idéia do efeito citotóxico da adenosina (BERNARDO e col., 2006).

4.7.1 Viabilidade celular na presença de adenosina

As células foram então incubadas com adenosina por 72 horas e a viabilidade celular foi medida por ensaio de MTT (figura 17).

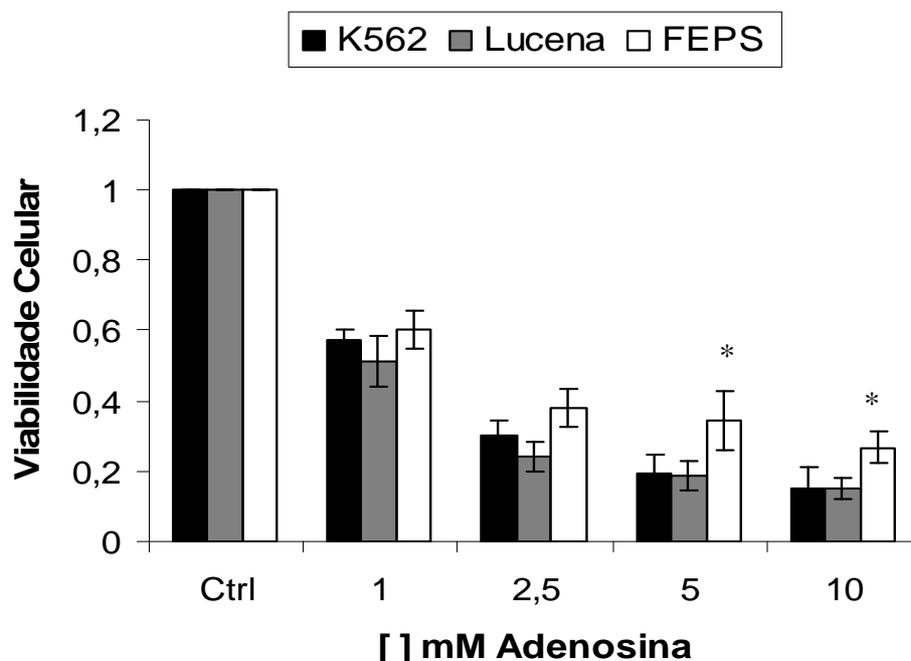


Figura 17: Viabilidade celular na presença de adenosina extracelular. As células K562, Lucena e FEPS foram mantidas em cultura por 72 horas na presença de adenosina extracelular e posteriormente a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico MTT. O resultado está expresso como média \pm erro padrão de 3 experimentos diferentes, feitos em triplicata. (*) $p < 0.05$ em relação a K562 na mesma concentração.

Observamos que a viabilidade celular na presença de adenosina extracelular apresenta um perfil equivalente ao observado na presença de ATP, sugerindo que a morte celular seja causada pelo produto final da hidrólise do ATP.

4.7.2 Efeito da adenosina no mecanismo de morte celular

Após verificar a citotoxicidade da adenosina extracelular, decidimos avaliar o mecanismo de morte celular desencadeado por ela. Para isso, foi utilizado o ensaio de marcação por anexina V ligada à fluoresceína. As moléculas de anexina se ligam a fosfatidil serina, que é exposta na face externa da membrana plasmática no caso de apoptose. Para verificar necrose utiliza-se iodeto de propídeo (PI) (figura 18).

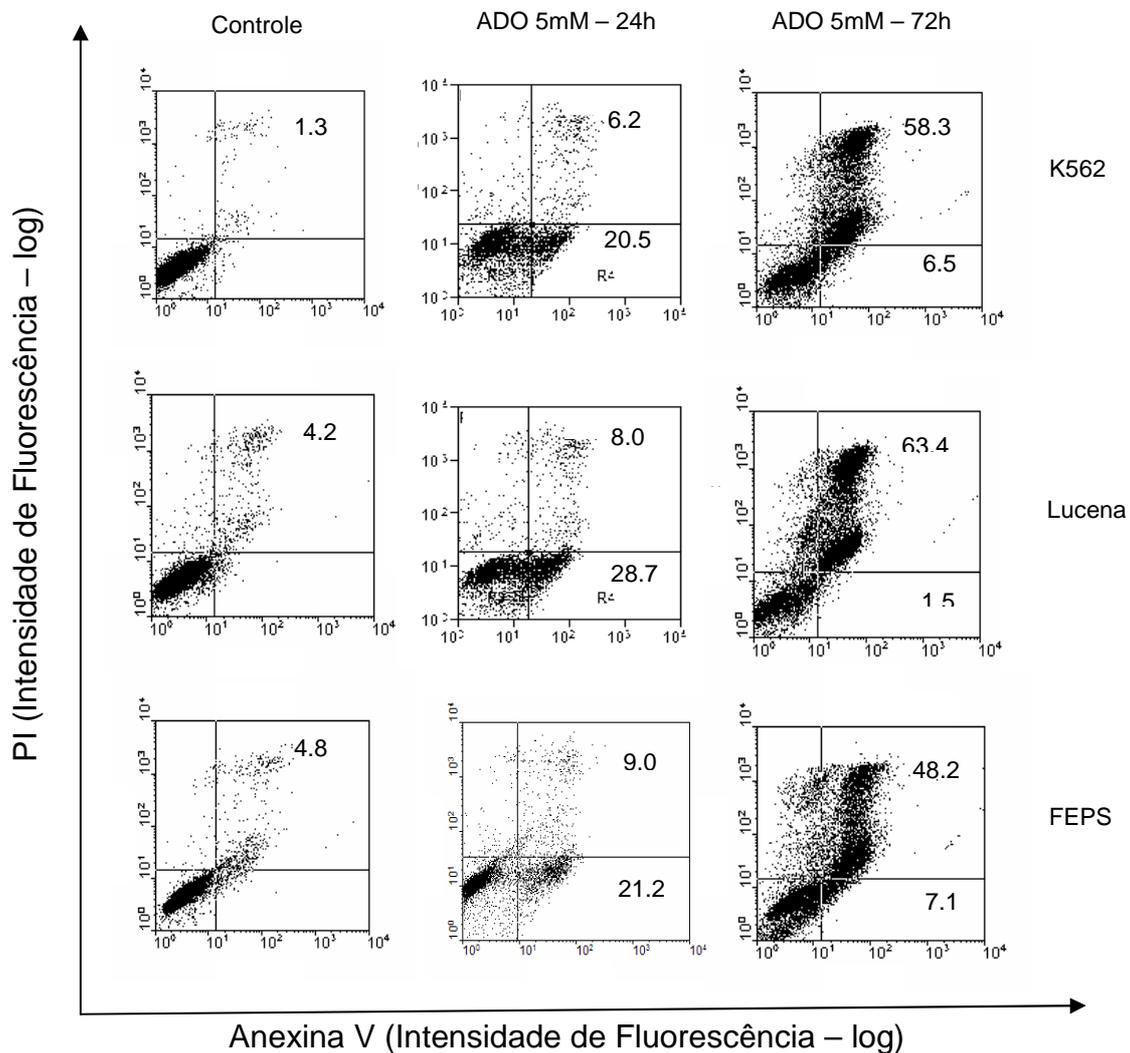


Figura 18: Indução de apoptose na presença de adenosina extracelular. As células K562, Lucena e FEPS foram mantidas em cultura por 24 e 72 horas na presença de adenosina (ADO) extracelular e posteriormente a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio com Anexina V, a fim de verificar a indução de apoptose. Esta figura é representativa de 3 experimentos.

Esse resultado sugere que a citotoxicidade da adenosina pode ocorrer pela indução de apoptose, como podemos observar em 24 horas de incubação e mais evidente com 72 horas, apresentando, também, uma necrose secundária.

4.8 Modulação da atividade da ABCB1

Como descrito anteriormente, há evidências de que o ATP seja um substrato da ABCB1, e que a regulação da concentração de ATPo pelo aumento da atividade das ecto-enzimas, nas células MDR, atue fornecendo seus precursores para transportadores dependentes deste nucleotídeo. Portanto, sugerimos que o ATP e a adenosina extracelulares modulem a atividade da ABCB1.

4.8.1 Modulação da ABCB1 pela adenosina extracelular em células

leucêmicas

A adenosina é um precursor da formação de ATP, portanto, acreditamos que o fornecimento de adenosina no meio extracelular de células leucêmicas resistentes, seja capaz de aumentar a atividade da ABCB1.

Para confirmar essa hipótese, foi realizado um ensaio preliminar de atividade da ABCB1 na presença e na ausência de adenosina extracelular (figura 19).

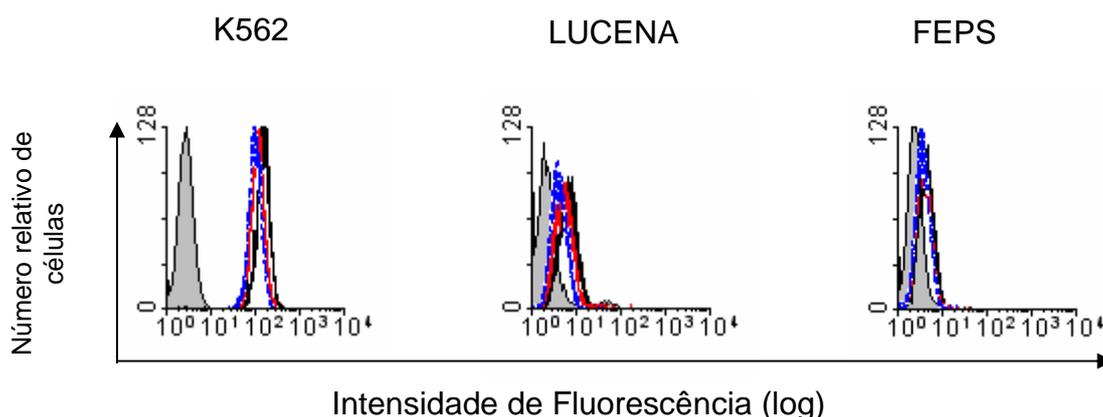


Figura 19: Modulação da atividade da ABCB1 em células leucêmicas pela adenosina extracelular. As linhagens K562, Lucena e FEPS foram incubadas na presença de Rho (500ng/ml), com ou sem adenosina, nas concentrações de 2,5 e 5mM por 30 min a 37°C, para o acúmulo do substrato. Após este período as células foram lavadas e incubadas com e sem o inibidor de ABCB1 por mais 10 minutos a 37°C, para que houvesse a extrusão parcial do substrato. As células foram lavadas e o acúmulo de fluorescência foi analisado por citometria de fluxo. __ controle negativo, __ células incubadas com Rho, __ células incubadas com Rho na presença de 2,5mM de adenosina, ---- células incubadas com Rho na presença de 5mM de adenosina.

Os resultados sugerem que a adenosina tenha um papel sinérgico da atividade da ABCB1, uma vez que podemos observar uma pequena diminuição do acúmulo de Rho quando as células são expostas a adenosina extracelular.

4.8.2 Modulação da ABCB1 pela adenosina extracelular em linfócitos

normais

Os resultados da modulação da atividade da ABCB1 em células leucêmicas mostraram uma pequena diferença na atividade. Buscamos, portanto, um outro modelo experimental, a fim de confirmar o resultado anterior.

Utilizamos linfócitos de sangue periférico de doadores saudáveis, uma vez que estes apresentam uma pequena atividade da ABCB1. Foi realizado, novamente, o ensaio de atividade da ABCB1 na presença e na ausência de adenosina extracelular (figura 20).

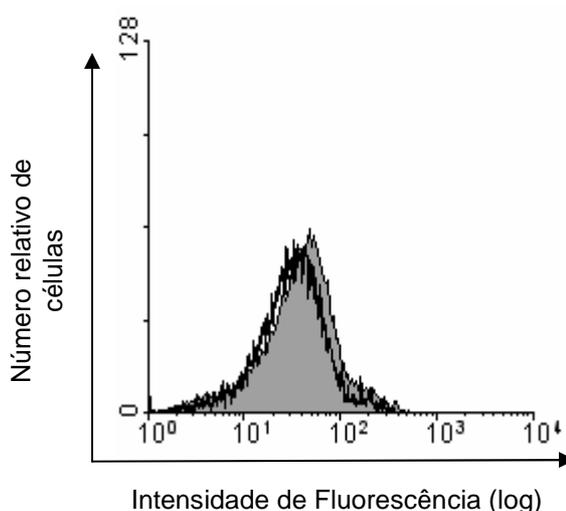


Figura 20: Modulação da atividade da ABCB1 em linfócitos normais pela adenosina extracelular. As células de doadores sadios foram incubadas na presença de Rho (200ng/ml), com ou sem adenosina, na concentração de 5mM por 30 min a 37°C, para o acúmulo do substrato. Após este período as células foram lavadas e incubadas com e sem o inibidor de ABCB1 por mais 30 minutos a 37°C, para que houvesse a extrusão do substrato. As células foram lavadas e o acúmulo de fluorescência foi analisado por citometria de fluxo.
— células incubadas com Rho, ___ células incubadas com Rho na presença de adenosina.

Observando o resultado da modulação da atividade da ABCB1 pela adenosina em linfócitos normais, percebemos que este, corrobora o resultado encontrado em células leucêmicas.

4.8.3 Modulação da ABCB1 pelo ATPo em linfócitos normais

Após avaliar o papel da adenosina na modulação da atividade da ABCB1, fomos verificar o papel do ATPo.

A partir dos dados da literatura, que mostram que o ATP é um substrato da ABCB1, sugerimos que o mesmo, quando em excesso, possa interferir na atividade da ABCB1, quando esta é exposta a um substrato.

A fim de verificar se há uma competição entre o ATP e o substrato da ABCB1 foi realizado um ensaio preliminar de atividade da ABCB1 na presença e na ausência de ATP extracelular (tabelas 1 e 2).

Linfócitos	Δ Intensidade de Fluorescência
Rho	17,76
Inibidor	22,88
ATP 0,5mM	19,15
ATP 1mM	24,09

Tabela 1: Modulação da atividade da ABCB1 em linfócitos normais pelo ATPo. As células de doadores sadios foram incubadas na presença de Rho (200ng/ml), com ou sem ATP, na concentração de 5mM por 30 min a 37°C, para o acúmulo do substrato. Após este período as células foram lavadas e incubadas com e sem o inibidor de ABCB1 por mais 30 minutos a 37°C, para que houvesse a extrusão do substrato. As células foram lavadas e o acúmulo de fluorescência foi analisado por citometria de fluxo.

PBMC	Δ Intensidade de Fluorescência
Rho	35,06
Inibidor	51,84
ATP 2,5mM	45,72
ATP 5mM	49,26

Tabela 2: Modulação da atividade da ABCB1 em células mononucleares normais pelo ATPo. As células de doadores sadios foram incubadas na presença de Rho (200ng/ml), com ou sem ATP, na concentração de 5mM por 30 min a 37°C, para o acúmulo do substrato. Após este período as células foram lavadas e incubadas com e sem o inibidor de ABCB1 por mais 30 minutos a 37°C, para que houvesse a extrusão do substrato. As células foram lavadas e o acúmulo de fluorescência foi analisado por citometria de fluxo.

As tabelas mostram que há um aumento de fluorescência quando as células são incubadas tanto com inibidor da ABCB1, quanto de ATP, indicando, portanto, um aumento do acúmulo de Rho. Este acúmulo sugere uma diminuição da atividade da ABCB1.

Esse resultado corrobora a hipótese de que o ATP, em excesso no meio de cultura, pode funcionar como um inibidor da atividade da ABCB1.

5. DISCUSSÃO

A busca de novas abordagens e novos alvos terapêuticos para tumores resistentes tem se tornado uma das principais razões de estudos na procura de novos tratamentos mais eficazes contra o câncer. Portanto a melhor compreensão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas e dos fatores capazes de modulá-lo são essenciais para auxiliar na descoberta desses novos tratamentos.

Este trabalho teve como objetivo principal verificar o papel do ATP extracelular e seus metabólitos na resistência a múltiplas drogas, uma vez que esses apresentam um efeito citotóxico em células tumorais e, além disso, parece haver uma correlação entre as enzimas responsáveis pela sua hidrólise e a expressão da proteína ABCB1.

Para isso, foi utilizado um modelo experimental de linhagens leucêmicas humanas, sensíveis e resistentes a quimioterápicos. A primeira etapa do trabalho consistiu na caracterização do fenótipo MDR nessas células, analisando a variação de expressão da ABCB1 nas diferentes linhagens, avaliando também as diferenças existentes entre elas.

As células da linhagem parental K562 não possuem expressão, nem atividade da ABCB1, enquanto as linhagens selecionadas por quimioterápicos, Lucena e FEPS, apresentaram uma alta expressão da proteína, porém em diferentes níveis, tendo a segunda uma expressão duas vezes maior que a primeira, e isto se reflete também na atividade da ABCB1.

Quando observamos os resultados da atividade da ABCB1, percebemos que a linhagem K562 não foi capaz de expulsar o substrato fluorescente, sugerindo, portanto, que não há atividade da proteína. Porém, quando colocamos as linhagens

Lucena e FEPS na presença do substrato fluorescente, percebemos que em ambas há um pequeno ou nenhum acúmulo do substrato na célula e que esse acúmulo pode ser revertido pelo inibidor da ABCB1. Além da maior expressão, as células FEPS parecem possuir uma maior atividade da ABCB1, uma vez que a extrusão de substrato nesta célula foi total e só foi possível reverter esta atividade de forma parcial. A presença de diferentes bombas, que possuem afinidade pelo substrato utilizado, mas não pelos moduladores, pode também estar influenciando a análise dos resultados em relação à atividade da ABCB1, já que a FEPS possui, também, expressão e atividade da ABCC1. Essa diferença de atividade da proteína ABCB1, entre as linhagens, pode, ainda, ser detectada sob forma de resistência, em diferentes níveis, aos quimioterápicos daunorrubicina e vincristina.

Um fator relacionado à modulação da expressão da ABCB1, e portanto à capacidade da célula de ser resistente ao tratamento, é a velocidade do ciclo celular. Em tumores sólidos, a ABCB1 é encontrada predominantemente nas camadas mais profundas, em células quiescentes, indicando que uma parada no ciclo celular pode induzir a expressão da ABCB1 (WARTENBERG e col., 1998). Outros estudos, também mostraram que células normais da medula óssea e células de pacientes com LMA apresentam menor expressão do mecanismo MDR quando submetidas a um estímulo de proliferação (SMEETS e col., 1999).

A diferença da velocidade do ciclo celular entre as células das linhagens resistentes Lucena e FEPS foi, então, analisada, paralelamente a diferença de expressão da ABCB1. Observou-se que as células FEPS possuem o ciclo celular mais lento que a Lucena, e uma maior expressão da proteína, sugerindo, juntamente

com os dados da literatura, que uma maior proliferação pode estar regulando negativamente a expressão da ABCB1.

Na clínica, um tumor possui células heterogêneas quanto à capacidade de resposta ao tratamento (VASCONCELOS e col., 2007), logo, o uso de um modelo experimental que nos permita verificar os fatores que podem estar envolvidos nesse processo de diferenciação, pode nos guiar numa busca mais específica de possíveis alvos terapêuticos no tratamento de tumores resistentes.

As diferenças observadas entre essas linhagens podem estar sendo reguladas por uma série de fatores. Marrone e colaboradores (2006) demonstraram que células tumorais na presença de apirase (substância capaz de hidrolisar o ATPo) tem a sua taxa de proliferação diminuída (MORRONE e col., 2006). Esse dado sugere que a maior capacidade de uma célula de promover a quebra do ATPo, pode influenciar negativamente na sua proliferação.

Então, após a caracterização do modelo experimental, foi iniciada a segunda fase do trabalho, que visava observar os efeitos do ATPo em diferentes níveis do fenótipo MDR.

Sabe-se que o ATPo é citotóxico em altas concentrações, tanto em células normais, quanto em células tumorais. Foi observado, neste projeto, que inclusive as células com alta expressão da ABCB1 se mostraram sensíveis a altas concentrações de ATPo (1; 2.5; 5; 10mM). As concentrações de ATPo usadas neste trabalho são bem acima das concentrações fisiológicas, pois nos permitem observar as diferentes respostas ao ATPo, das três linhagens utilizadas.

Nas maiores concentrações, de 5 e 10mM, a linhagem FEPS, se mostrou um pouco mais resistente que as outras. Apesar desta resistência apresentada pela FEPS não ser comparável à resistência dela a quimioterápicos convencionais, fomos então investigar o que poderia estar causando essa diferença.

Já foi demonstrado na literatura que células que possuem mais ABCB1 possuem uma capacidade maior de hidrolisar o ATPo, portanto essa resistência observada, na linhagem FEPS, poderia estar correlacionada à maior capacidade desta de promover a quebra do ATPo. Como descrito anteriormente, há uma correlação entre o aumento da expressão da ABCB1 e da atividade da ecto-5' nucleotidase (UJHÁZY e col., 1994 e 1996, LEDOUX e col., 1997 e BERNARDO e col., 2006). Quando a atividade dessa enzima foi comparada entre as linhagens K562, Lucena e FEPS, foi observado que a atividade da ecto-5' nucleotidase aumenta diretamente proporcional ao aumento da expressão da ABCB1, corroborando os dados da literatura. Já a correlação entre o aumento da ecto-ATPase e o fenótipo MDR, observado no modelo experimental utilizado durante o trabalho, ainda não havia sido demonstrada em humanos. Esses dados sugerem que haja uma maior degradação do ATPo nas células que possuem uma maior expressão da ABCB1, não só pela enzima capaz de hidrolisar o 5'AMP, mas também pela enzima capaz de hidrolisar diretamente o ATPo. Confirmando, portanto, a maior capacidade das células FEPS de promover a quebra do ATPo.

Como descrito anteriormente, o nosso grupo demonstrou que as células das linhagens K562 e Lucena não possuem receptores P2X₇ ativos (BERNARDO e col., 2006), portanto o efeito deletério causado pelo ATPo, não se deve à ligação do mesmo ao seu receptor de membrana.

Alguns estudos mostraram que em células leucêmicas e de carcinoma humano a inibição da quebra do ATPo inibe o seu efeito tóxico, indicando que este efeito esteja realmente relacionado à produção de metabólitos (SCHNEIDER e col., 2001 e VÖLKL e col., 2008). Somando-se a isso, tem-se o fato de que os três tipos celulares possuem atividade ecto-enzimática, assim sendo, esses dados sugerem que a citotoxicidade causada pelo ATPo possa ser resultado da geração dos seus metabólitos, como a adenosina extracelular.

Foi verificada, então, a viabilidade das linhagens celulares K562, Lucena e FEPS na presença de adenosina extracelular. Nota-se que as células apresentam uma curva de viabilidade dose dependente muito semelhante à observada com o ATPo. Porém a sensibilidade, nas menores concentrações (1 e 2,5mM), parece maior na presença de adenosina quando comparada com ATPo, principalmente nas células que possuem maior atividade das ecto-enzimas.

Além disso, nota-se, que a pequena resistência apresentada pela FEPS em relação ao ATPo, também se mantém em relação à adenosina, sugerindo que o efeito observado, seja realmente provocado pela adenosina.

Para compreender melhor os mecanismos pelos quais a FEPS possui essa diferença de viabilidade na presença de nucleotídeos extracelulares em relação às demais linhagens, é necessário um estudo mais aprofundado dos receptores para esses nucleotídeos, dos transportadores dos mesmos nessas células. Outro fator, que pode estar influenciando essa resposta à adenosina é uma possível alteração na atividade das enzimas capazes de modular a quantidade de adenosina extracelular, como a ecto-ADA.

Uma vez que os resultados apontam que a morte celular é gerada pela adenosina, foi verificado que na presença da mesma essa morte é induzida por apoptose, com ocorrência de uma necrose secundária.

Outra correlação existente entre o ATPo e células MDR é o fato desse ser um substrato das proteínas transportadoras ABC (ABRAHAM e col., 1993 e 2001). Acredita-se que células que possuam mais ABCB1 são capazes de transportar mais ATP do meio intracelular para o meio extracelular e que o aumento da atividade das ecto-enzimas nessas células seria uma forma de regular a quantidade de ATP extracelular. Além disso, as ecto-enzimas atuariam como uma molécula acessória à atividade da ABCB1, hidrolisando ATP e fornecendo seus precursores, no caso, a adenosina, para transportadores dependentes deste nucleotídeo.

A partir dessa hipótese, foi verificado, se o ATPo e a adenosina seriam capazes de modular a atividade da ABCB1. Foram utilizadas células de sangue periférico de doadores saudáveis para averiguar a existência dessa modulação, uma vez que elas possuem uma baixa atividade da proteína, o que permitiu observar de forma mais clara as mudanças ocorridas.

Os resultados que mostram que o ATPo foi capaz de aumentar o acúmulo de substrato fluorescente, tanto em linfócitos, quanto em células mononucleares, assim como o inibidor da proteína ABCB1, corroboram os dados da literatura. Esses dados sugerem que o ATPo pode atuar também como um inibidor dessa proteína, uma vez que além de ser um substrato da ABCB1, ela não é capaz de promover, nessas condições, permeabilização de membrana nessas linhagens (BERNARDO e col., 2006).

Apesar de o ATPo, sozinho, não ser capaz de reduzir a massa tumoral em pacientes (HASKELL e col., 1998), ele poderá ser utilizado, concomitantemente, aos tratamentos convencionais, como uma terapia adjuvante, a fim de reverter o perfil de resistência, apresentado por alguns tumores. Para isso, serão necessários mais estudos visando compreender melhor o efeito do ATPo no fenótipo MDR.

Corroborando a idéia de que o aumento da atividade ecto-enzimática esteja associado a uma maior produção de adenosina, levando, portanto a um aumento da atividade da ABCB1, nota-se que tanto em linfócitos, quanto em linhagens leucêmicas a adenosina foi capaz de diminuir a concentração de substrato dentro da célula, sugerindo que houve um aumento na atividade da ABCB1. Esses resultados são ainda preliminares, e por isso é necessário um pouco mais de investigação acerca da influência da adenosina, na atividade da ABCB1.

Existem vários fatores capazes de modular as proteínas de resistência, e os relacionados ao ATP vêm sendo estudados, uma vez que ele está diretamente ligado à função dessas proteínas. Em fungos e plantas, um aumento da atividade das ecto-enzimas leva a MDR, em contraposição à inibição dessa atividade, que induz uma susceptibilidade a xenobióticos (THOMAS e col., 2000), sugerindo mais uma vez que o estudo de ecto-enzimas possa vir a desvendar relações importantes no fenômeno MDR.

Portanto os nucleotídeos extracelulares e as enzimas capazes de regulá-los podem ser utilizados como alvos terapêuticos e servirem, no futuro, como novas abordagens de tratamento contra tumores resistentes a múltiplas drogas.

6. CONCLUSÕES

Baseado no sumário dos nossos resultados:

- A linhagem K562 não possui expressão e atividade da ABCB1, enquanto as linhagens Lucena e FEPS possuem expressão e atividade em diferentes níveis.
- A linhagem FEPS possui uma expressão da ABCB1 duas vezes maior que a observada nas células da linhagem Lucena, além disso, a atividade dessa proteína também é maior nessa linhagem.
- As linhagens Lucena e FEPS mostraram-se resistentes à ação de diferentes quimioterápicos, confirmando o fenótipo MDR.
- As três linhagens mostraram-se susceptíveis à ação do ATP extracelular, inclusive as linhagens resistentes.
- As três linhagens celulares possuem atividade das ecto-enzimas, ecto-ATPase e ecto-5' nucleotidase, porém nota-se um aumento dessa atividade diretamente relacionado ao aumento da expressão e atividade da ABCB1.
- A adenosina extracelular demonstrou uma maior toxicidade nas linhagens em relação ao ATP. Os resultados sugerem que ela seja o principal agente citotóxico e não o ATPo.
- A citotoxicidade observada na presença de adenosina foi causada pela indução de apoptose nas linhagens leucêmicas.
- O ATP é capaz de aumentar o acúmulo de Rho em células com atividade da ABCB1, sugerindo que ele possua um efeito inibidor dessa proteína.
- A adenosina foi capaz de diminuir a concentração de Rho dentro da célula, sugerindo que ela é capaz de promover um aumento na atividade da ABCB1.

Podemos concluir que os nucleotídeos extracelulares, como o ATPo e a adenosina extracelular são tóxicos em células leucêmicas, inclusive em células que possuem o fenótipo MDR, e que a atividade das ecto-enzimas está intimamente relacionada com a atividade da proteína de resistência ABCB1. Porém, os mecanismos que participam dessa modulação, ainda não foram elucidados. Além disso, o ATP e a adenosina extracelulares são capazes de alterar a atividade da ABCB1, sugerindo que essas proteínas se regulem por um possível mecanismo de *feedback*.

7. REFERÊNCIAS

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 1994;64:445-75.

Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arceci RJ, Kramer R, Guidotti G, Cantiello HF. The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:312-6.

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

Agteresch HJ, Dagnelie PC, van der Gaast A, Stijnen T, Wilson JH. Randomized clinical trial of adenosine 5'-triphosphate in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:321-8.

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

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Cancer in Molecular Biology of the Cell* 4^a edição. 2002; cap. 23, pág 1313-62: Editora Garland Science, New York and London.

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

Barnard EA, Burnstock G, Webb TE. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* 1994;15:67-70.

Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM, Kuttesch JF, Andreeff M, Bates SE, Berard CW, Boyett JM, Brophy NA, Broxterman HJ, Chan HS, Dalton WS, Dietel M, Fojo AT, Gascoyne RD, Head D, Houghton PJ, Srivastava DK, Lehnert M, Leith CP, Paietta E, Pavelic ZP, Weinstein R. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res.* 1996;56:3010-20.

Bensch KG, Malawista SE. Microtubule crystals: a new biophysical phenomenon induced by Vinca alkaloids. *Nature.* 1968;218:1176-7.

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

Blay J, White TD, Hoskin DW. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res* 1997;57,2602-5.

Boeynaems, JM, Wilkin F, Marteau F, Duhant X, Savi P, Gonzalez NG, et al. P2Y receptors: new subtypes, new functions. *Drug Dev Res* 2003;59:30–5.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2006;112:358-404.

Brindeiro PA. Caracterização de aspectos bioquímicos e moleculares de linhagem eritroleucêmica Lucena I – K562 envolvidos com o fenótipo MDR. MSc thesis 1999, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

Broxterman HJ, Pinedo HM, Kuiper CM, Kaptein LC, Schuurhuis GJ, Lankelma J. Induction by verapamil of a rapid increase in ATP consumption in multidrug-resistant tumor cells. *FASEB J.* 1988;2:2278-82.

Broxterman HJ, Sonneveld P, Pieters R, Lankelma J, Eekman CA, Loonen AH, Schoester M, Ossenkoppele GJ, Lowenberg B, Pinedo HM, Schuurhuis GJ. Do P-glycoprotein and major vault protein (MVP/LRP) expression correlate with in vitro daunorubicin resistance in acute myeloid leukemia? *Leukemia.* 1999;13:258-65.

Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* 2004;240:301-4.

Butler JJ, Mader JS, Watson CL, Zhang H, Blay J, Hoskin DW. Adenosine inhibits activation-induced T cell expression of CD2 and CD28 co-stimulatory molecules: role of interleukin-2 and cyclic AMP signaling pathways. *J Cell Biochem* 2003;89:975–91.

Calabresi P, Chabner BA. Quimioterapia de doenças neoplásicas. Em Goodman LS, Gilman A., M Graw Hill: As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, 1995. p.903-49, 8a. ed.

Calcabrini A, Meschini S, Stringaro A, Cianfriglia M, Arancia G, Molinari A. Detection of P-glycoprotein in the nuclear envelope of multidrug resistant cells. *Histochem J.* 2000;32:599-606.

Chow SC, Kass GE, Orrenius S. Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacol.* 1997;36:1149-56.

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:695-8.

Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, et al. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev* 2001;21:105–28.

Darzynkiewicz Z, Staiano-Coico L, Melamed MR. Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:2383-7.

de Lannoy IA, Silverman M. The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189:551-7.

Dean M, Allikmets R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr.* 2001;33:475-9.

Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343-56.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V, Baricordi OR. Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ.* 1998;5:191-9.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood.* 2001;97:587-600.

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344:1031-7.

Estrela JM, Obrador E, Navarro J, Lasso De la Vega MC, Pellicer JA. Elimination of Ehrlich tumours by ATP-induced growth inhibition, glutathione depletion and X-rays. *Nat Med.* 1995;1:84-8.

Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). *N. Engl. J. Med.* 1948;238:787-93.

Franke H, Krugel U, Illes P. P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo. *Glia* 2002;28:190–200.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001;53:527-52.

Frei E 3rd, Karon M, Levin RH, Freireich EJ, Taylor RJ, Hananian J, Selawry O, Holland JF, Hoogstraten B, Wolman IJ, Abir E, Sawitsky A, Lee S, Mills SD, Burgert EO Jr, Spurr CL, Patterson RB, Ebaugh FG, James GW 3rd, Moon JH. The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood.* 1965;26:642-56.

Frei E 3rd. The National Cancer Chemotherapy Program. *Science.* 1982;217:600-6.

Gilman A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg.* 1963;105:574-8.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:48-58.

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

Groves FD, Linet MS, Devesa SS. Epidemiology of leukemias: overview and patients of occurrence, in: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF. *Leukemia 6^a edição.* 1996; cap 8, pag 179-194: Editora WB Saunders, London, England.

Gupta S, Gollapudi S. P-glycoprotein (MDR 1 gene product) in cells of the immune system: its possible physiologic role and alteration in aging and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *J Clin Immunol.* 1993;13:289-301.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.

Haskell CM, Mendoza E, Pisters KM, Fossella FV, Figlin RA. LinksPhase. II study of intravenous adenosine 5'-triphosphate in patients with previously untreated stage IIIB and stage IV non-small cell lung cancer *Invest New Drugs.* 1998;16:81-5.

Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 2004;25:33-9.

Heppel LA, Wang D, Huang N, Gonzalez FA, Ahmed AH, Alfonzo RG, Desheesh M. Extracellular ATP is a mitogen for 3T3, 3T6, A431, DDT1-MF2, BALB/MK, NIE-115, and HFF cells. *Ann NY Acad Sci* 1990;603:432-4.

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

Hou M, Moller S, Edvinsson L, Erlinge D. Cytokines induce upregulation of vascular P2Y(2) receptors and increased mitogenic responses to UTP and ATP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2064-9.

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature.* 1990;346:62-5.

Ikehara S, Pahwa RN, Lunzer DG, Good RA, Modak MJ. Adenosine-5'-triphosphate-(ATP) mediated stimulation and suppression of DNA synthesis in lymphoid cells. I. Characterization of ATP responsive cells in mouse lymphoid organs. *J Immunol* 1981;127:1834-8.

Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enjyoji K, Cszimadia E, Sundberg C, Robson SC. Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice. *Am J Pathol.* 2007;171:1395-404.

Jaffe N, Goorin A, Link M, Watts H, Frei E, Vawter G, Fellows KE, Beardsley GP, Abelson HT. High-dose methotrexate in osteogenic sarcoma adjuvant chemotherapy and limb salvage results. *Cancer Treat Rep.* 1981;65:99-106.

Jain RK. Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *J Control Release*. 2001;74:7-25.

Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997;90:2863-92.

Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP. The Vinca Alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res*. 1963;23:1390-1427.

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

Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia, *in*: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF. *Leukemia 6^a edição* 1996; cap 26, pag 554-586: Editora WB Saunders, London, England.

Kessel D, Beck WT, Kukuruga D, Schulz V. Characterization of multidrug resistance by fluorescent dyes. *Cancer Res*. 1991;51:4665-70.

Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*. 1980;56:344-50.

Kurzock R, Kantarjian HM, Duker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive in leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Inter Med* 2003;138:819-30.

Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod Toxicol*. 1998;12:457-63.

Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol*. 2003;64:785-95.

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

Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdens L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*. 1999;94:1086-99.

Li MC, Hertz R, Bergenstal DM. Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists. *N Engl J Med*. 1958;259:66-74.

Lin T, Islam O, Heese K. ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis – a different perspective. *Cell Research*. 2006; 16: 857–71.

Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Cabot MC. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J.* 2001;15:719-30.

Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent Apoptosis Modulate the Cytotoxicity of Anticancer Agents. *Cell.* 1993;74:957-67.

Lukashev DE, Ohta A, Sitkovsky MV. Physiological regulation of acute inflammation by A2a adenosine receptor. *Drug Dev Res* 2005;64:172–7.

Maia, RC, Wagner K, Cabral RH, Rumjanek VM. Heparin reverses rhodamine 123 extrusion by multidrug resistant cells. *Cancer Lett.* 1996;106:101-8.

Marques-Santos LF, Harab RC, de Paula EF, Rumjanek VM. The in vivo effect of the administration of resistance-modulating agents on rhodamine 123 distribution in mice thymus and lymph nodes. *Cancer Lett.* 1999;137:99-106.

Maymon R, Bar-Shira Maymon B, Cohen-Armon M, Holtzinger M, Leibovici J. Enhancing effect of ATP on intracellular adriamycin penetration in human ovarian cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1201:173-8.

McGaraughty S, Cowart M, Jarvis MF. Recent developments in the discovery of novel adenosine kinase inhibitors: mechanism of action and therapeutic potential. *CNS Drug Rev* 2001;7:415–32.

Meyer-Fernandes JR, Dutra PM, Rodrigues CO, Saad-Nehme J, Lopes AH. Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*, *Arch. Biochem. Biophys* 1997;341:40–6.

Meyer-Fernandes JR. Ecto-ATPases in protozoa parasites: looking for a function, *Parasitol. Int.* 2002;51:299–303.

Minderman H, Linssen P, van der Lely N, Wessels J, Boezeman J, de Witte T, Haanen C. Toxicity of idarubicin and doxorubicin towards normal and leukemic human bone marrow progenitors in relation to their proliferative state. *Leukemia.* 1994;8:382-7.

Minocha A, Long BH. Inhibition of the DNA catenation activity of type II topoisomerase by VP16-213 and VM26. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;22:165-70.

Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Battastini AM. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer.* 2006;6:226.

Munteanu E, Verdier M, Grandjean-Forestier F, Stenger C, Jayat-Vignoles C, Huet S, Robert J, Ratinaud MH. Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:1162-74.

Myc A, DeAngelis P, Kimmel M, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Retention of the mitochondrial probe rhodamine 123 in normal lymphocytes and leukemic cells in relation to the cell cycle. *Exp Cell Res*. 1991;192:198-202.

Neyfakh AA. Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exp Cell Res* 1988;174:168-76.

Nielsen D, Skovsgaard T. P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1139:169-83.

North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*. 2002;82:1013-67.

Okabe-Kado J, Hayashi M, Honma Y, Hozumi M, Tsuruo T. Effects of inducers of erythroid differentiation of human leukemia K562 cells on vincristine-resistant K562/VCR cells. *Leuk Res*. 1983;7:481-5.

Osborn, MJ, Freeman M., Huennekens, F.M. Inhibition of dihydrofolic reductase by aminopterin and amethopterin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1958;97:429-31.

Papac RJ. Origins of cancer therapy. *Yale J Biol Med*. 2001;74:391-8.

Pinedo HM, Longo DL, Chabner BA. Cancer chemotherapy and biological response modifiers annual 16. Introduction. *Cancer Chemother Biol Response Modif*. 1996;16.

Pinto-Silva FE. Seleção e caracterização de uma nova linhagem leucêmica humana MDR. MSc thesis 2007, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

Pluen A, Boucher Y, Ramanujan S, McKee TD, Gohongi T, di Tomaso E, Brown EB, Izumi Y, Campbell RB, Berk DA, Jain RK. Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4628-33.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998;50:413-92.

Ramachandra M, Ambudkar SV, Chen D, Hrycyna CA, Dey S, Gottesman MM, Pastan I. Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry*. 1998;37:5010-9.

Rapaport E. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *J Cell Physiol*. 1983;114:279-83.

Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17:2941-53.

Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Lai JL, Philippe N, Facon T, Fenaux P, Preudhomme C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood*. 2002;100:1014-8.

Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:4538-42.

Rothenberg M, Ling V. Multidrug resistance: molecular biology and clinical relevance. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81:907-10.

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

Ryan LM, Rachow JW, McCarty BA, McCarty DJ. Adenosine triphosphate levels in human plasma. *J Rheumatol*. 1996;23:214-9.

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

Sawynok J. Adenosine and ATP receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;309-28.

Schneider C, Wiendl H, Ogilvie A. Biphasic cytotoxic mechanism of extracellular ATP on U-937 human histiocytic leukemia cells: involvement of adenosine generation. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1538:190-205.

Senagore AJ, Milsom JW, Walshaw RK, Mostoskey U, Dunstan R, Chaudry IH. Adenosine triphosphate-magnesium chloride in radiation injury. *Surgery*. 1992;112:933-9.

Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002;2:117-25.

Shen DW, Goldenberg S, Pastan I, Gottesman MM. Decreased accumulation of [14C]carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. *J Cell Physiol*. 2000;183:108-16.

Skipper HE, Thomson JR, Elion GB, Hitchings GH. Observations on the anticancer activity of 6-mercaptopurine. *Cancer Res*. 1954;14:294-8.

Smeets ME, Raymakers RA, Vierwinden G, Pennings AH, Wessels H, de Witte T. Triggering noncycling hematopoietic progenitors and leukemic blasts to proliferate increases anthracycline retention and toxicity by downregulating multidrug resistance. *Blood*. 1999;94:2414-23.

Sugawara I, Nakahama M, Hamada H, Tsuruo T, Mori S. Apparent stronger expression in the human adrenal cortex than in the human adrenal medulla of Mr 170,000-180,000 P-glycoprotein. *Cancer Res*. 1988;48:4611-4.

Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med.* 2001;7:584-90.

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

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

Thomas C, Rajagopal A, Windsor B, Dudler R, Lloyd A, Roux SJ. A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. *Plant Cell.* 2000;12:519-33.

Tidefelt U, Liliemark J, Gruber A, Liliemark E, Sundman-Engberg B, Juliusson G, Stenke L, Elmhorn-Rosenborg A, Mollgard L, Lehman S, Xu D, Covelli A, Gustavsson B, Paul C. P-Glycoprotein inhibitor valspodar (PSC 833) increases the intracellular concentrations of daunorubicin in vivo in patients with P-glycoprotein-positive acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2000;18:1837-44.

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

Twentyman PR, Fox NE, White DJ. Cyclosporin A and its analogues as modifiers of adriamycin and vincristine resistance in a multi-drug resistant human lung cancer cell line. *Br J Cancer.* 1987;56:55-7.

Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:3004-8.

Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, Hori R. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem.* 1992;267:24248-52.

Ujházy P, Berleth ES, Pietkiewicz JM, Kitano H, Skaar JR, Ehrke MJ, Mihich E. Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance. *Int J Cancer.* 1996;68:493-500.

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

van der Kolk DM, de Vries EG, van Putten WJ, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, Vellenga E. P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3205-14.

Vandewalle B, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. Effect of extracellular ATP on breast tumor cell growth, implication of intracellular calcium. *Cancer Lett.* 1994;85:47-54.

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

Völkl T, Ogilvie A, Neuhuber W, Ogilvie A. Cell death induced by uridine 5'-triphosphate (UTP) in contrast to adenosine 5'-triphosphate (ATP) in human epidermoid carcinoma cells (A-431). *Cell Physiol Biochem.* 2008;22:441-54.

Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, Zhou P. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134:365-72.

Wartenberg M, Frey C, Diederhagen H, Ritgen J, Hescheler J, Sauer H. Development of an intrinsic P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in quiescent cell layers of large, multicellular prostate tumor spheroids. *Int J Cancer.* 1998;75:855-63.

Westfall TD, Kennedy C, Sneddon P. The ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 enhances parasympathetic neurotransmission in the guinea-pig urinary bladder. *Eur J Pharmacol.* 1997;329:169-73.

White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:211-7.

Willingham MC, Richert ND, Cornwell MM, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan IH. Immunocytochemical localization of P170 at the plasma membrane of multidrug-resistant human cells. *J Histochem Cytochem.* 1987;35:1451-6.

Yegutkin GG, Henttinen T, Samburski SS, Spychala J, Jalkanen S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem J.* 2002;367:121-8.

Yoneyama Y, Suzuki S, Sawa R, Araki T. Plasma adenosine concentrations increase in women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chim Acta.* 2004;342:99-103.

Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, Yin L, Shao Z, Ou Z. Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol Ther.* 2007;6:426-31.

Zimmermann H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 1996;49:589-618.

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

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](#)