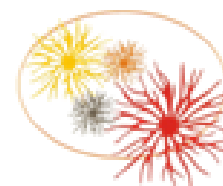




Universidade Federal do Rio Grande – FURG  
Instituto De Ciências Biológicas  
PPG em Ciências Fisiológicas-Fisiologia Animal Comparada



**“Relação entre a origem do fenótipo MDR e a sensibilidade a agentes com diferentes  
alvos celulares na linhagem eritroleucêmica FEPS”**

Fernanda Saldanha Soares

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, sob a orientação da Profa. Dr<sup>a</sup> Ana Paula de Souza Votto.

RIO GRANDE, AGOSTO DE 2016.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS .....	6
RESUMO GERAL.....	8
INTRODUÇÃO GERAL .....	9
OBJETIVO .....	20
METODOLOGIA .....	20
CAPÍTULO 1 .....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL.....	47
BIBLIOGRAFIA GERAL.....	53

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, ou a qualquer boa energia suprema na Evolução do Universo que me ajudou a concluir esta dissertação.

Aos meu pais, que sempre me apoiaram, deixando sempre bem claro que eu conseguiria, apesar das dificuldades, que não foram poucas.

A minha irmã, que me ensinou a ter um pouco de paciência e me fez companhia.

A minha tia avó Gládis Regina Oliveira, que sempre me forneceu suporte a minhas viagens para Porto Alegre, sempre sendo uma ótima companhia e uma excelente incentivadora.

A todos os meus colegas de pós-graduação, que me ajudaram muito, com conversas, conselhos, ajuda, experimentos.

Agradeço especialmente a colega Aline Lettnin, que sempre me ajudou e orientou quando eu precisei, sendo acima de tudo uma ótima amiga. Ela é maravilhosa.

Agradeço a Maiara Marques e Bruno Oliveira que sempre me ajudaram quando pedi ajuda. Obrigada Bruno por ser um gênio do computador! Obrigada Mai por ser uma das pessoas mais carismáticas e queridas que eu conheço!

Também não poderia esquecer meu colega Joaquim Ribeiro, com quem aprendi muitas coisas, muitas delas que me ajudaram a otimizar meu tempo e a melhorar a qualidade do meu trabalho.

Agradeço à colega Fernanda Lopes, que sempre foi uma boa colega de Laboratório, além de ter me dado uma idéia valiosa para execução de alguns experimentos com lâmpadas UV. Com sua ajuda, as coisas deram certo.

Ao colega Thiago Goulart, por todo apoio prestado, bons conselhos e conversas online.

Agradeço à colega Fernanda Figueira, por todo o apoio e amizade prestada, especialmente nos momentos em que precisei de bons conselhos de vida.

Agradeço ao meu colega Márcio Geihs, que desde o último ano de faculdade tem meu auxiliado com boas conversas, conselhos e amizade.

Agradeço aos meus queridos IC's, Francielly Mattozo, Mariana Salgado, Fabiani Rehbein e Eduardo Wagner, que sempre se mostraram interessados em aprender e a ajudar com o que fosse preciso.

Agradeço a Nicole Guidony, Elisa Dosso, Matheus Bandeira, Marcos Cordeiro, João Luís Scaini e Clarissa Rios, todos os meus bons e velhos amigos, que sempre tornaram a

minha vida mais leve e feliz. Sem vocês eu não teria conseguido de forma alguma. Vocês desde a faculdade foram e sempre serão um alicerce na construção da minha vida, juntamente com minha família. Agradeço por existirem e terem dividido parte dos anos da vida comigo. Espero que dividam muitos mais. Eu amo vocês.

Também não poderia esquecer a Maria Félix e a Inês Pereira, que sempre se preocuparam com meu bem estar e andamento do trabalho. Sempre me transmitiram boas energias.

Ao professor e velho amigo Ubiratã Jacobi, por seus conselhos, apoio e amizade desde o início da graduação. Obrigada por me estimular e confiar na minha capacidade, mesmo quando muitos outros não confiavam. Obrigada por sempre me ouvir.

Ao meu querido professor Fábio Everton Maciel, com quem eu tive a grande alegria de realizar meu estágio de docência e perceber o quanto eu realmente adorei dar aula. Sua paciência e exemplo de didática serão sempre uma inspiração para mim.

A Daza Filgueira, Gilma Trindade e a toda equipe do Laboratório de Cultura Celular, por tudo que me ensinaram.

A minha orientadora Ana Paula Votto, pela paciência e oportunidade de pesquisa.

Aos coordenadores, Marta Marques e Luiz Eduardo Nery, que sempre foram gentis, agradáveis e ótimos exemplos a se seguir. Ao professor agradeço especialmente às ótimas aulas, aos bons conselhos, apoio e orientações que recebi quando entrei no programa. Inclusive nos momentos de desespero.

Foi e sempre será um imenso prazer ter aprendido com todos vocês.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas- Fisiologia Animal Comparada, por realizar uma meta muito importante na minha vida, que foi voltar a trabalhar com Fisiologia, área que tanto me fascina.

A Universidade Federal do Rio Grande (FURG), por me ensinar e ter me feito crescer muito, durante os seis anos em que estou aqui.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela parceria e colaboração com o Lab. de Cultura Celular, especialmente pelo repasse das linhagens celulares. Agradeço especialmente a professora Vivian Rumjanek, por confiar nesta parceria e torná-la possível.

A FAPERGS, pela concessão de minha bolsa de mestrado, a CAPES, e a todas as agências de fomento/ parcerias que deram o apoio financeiro para que minha pesquisa e muitas outras se tornassem reais, dentro e fora da FURG.

## **LISTA DE FIGURAS**

### **a) Dissertação:**

**Figura 1. Translocação cromossômica característica de portadores de Leucemia Mielóide Crônica.**

**Figura 2. Relação entre o oncogene BCR-ABL e evolução das fases da Leucemia Mielóide Crônica.**

**Figura 3. Representação de splices alternativos nas regiões dos genes BCR e ABL.**

**Figura 4. Representação das principais vias sinalizadoras envolvidas na progressão da leucemia mielóide crônica.**

**Figura 5. Eritropoiese e progressão das fases da Leucemia Mielóide Crônica.**

**Figura 6. Proteína transportadora de membrana ABCB1.**

**Figura 7. Localização e distribuição das três faixas de radiação ultravioleta (UVA, UVB e UVC) na superfície terrestre.**

**Figura 8. Efeitos dos raios UVA e UVB em seus respectivos alvos celulares preferenciais.**

**Figura 9. Representação de placas de cultura para exposição à radiação UV.**

### **b) Artigo:**

**Figura 1. Viabilidade Celular das linhagens não MDR K562 e MDR FEPS expostas à radiação UVA.**

**Figura 2. Viabilidade Celular das linhagens não MDR K562 e MDR FEPS expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

**Figura 3. Viabilidade Celular das linhagens não MDR K562 e MDR FEPS expostas à radiação UVB.**

**Figura 4. Morte celular por apoptose e/ou necrose da linhagem MDR FEPS exposta à radiação UVB e ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

**Figura 5. Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) na linhagem MDR FEPS exposta à radiação UVB e ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABCB1 ou Pg-p-** Proteína transportadora de membrana envolvida na resistência tumoral e responsável pelo efluxo inespecífico de drogas

**ABCC1 ou MRP-** Proteína transportadora de multiresistência dependente de ATP

**ABC-** Proteínas transportadoras de membrana dependentes de ATP

**ADP-** Adenosina difosfato

**ATP-** Adenosina trifosfato

***bcl-2***- Gene ou proteína promotores de sobrevivência tumoral

**BCR-ABL-** Principal oncogene envolvido na manifestação da Leucemia Mielóide Crônica

**LMC-CB-** Crise blástica da Leucemia Mielóide Crônica

**LMC-FC-** Fase crônica da Leucemia Mielóide Crônica

**DNR-** Quimioterápico Daunorrubicina

**DS-** Quimioterápico inibidor de tirosinaquinase Desatinibe

**ERO ou ROS-** Espécies Reativas de Oxigênio

**E3 ou HDM2-** Proteína ubiquitina ligase E3, supressora da p53

**FEPS-** Linhagem Eritroleucêmica Resistente à Daunorrubicina e a Múltiplas Drogas

**GPX-** Enzima Glutathione Peroxidase

**GSH-** Tripeptídeo Glutathione

**GST-** Glutathione sulfidril transferase

**HL-60-** Células de Leucemia Mielóide Crônica Humana não Resistente

**HP50-2 e HP100-1-** Células de Leucemia Humana Resistentes à Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de Hidrogênio

**IM-** Quimioterápico inibidor de tirosinaquinase Imatinibe

**K562- Linhagem Eritroleucêmica Sensível à Múltiplas Drogas**

**K562-Lucena1 ou Lucena- Linhagem Eritroleucêmica Resistente à Vincristina e a Múltiplas Drogas**

**K562R- Linhagem Eritroleucêmica Resistente à Imatinibe**

**LMC- Leucemia Mielóide Crônica**

**MAPK- Proteína quinase ativada por mitógenos**

**MDR- Fenótipo de resistência à múltiplas drogas**

**MDR1- Gene responsável por codificar o transportador de membrana ABCB1**

**MI-219- Inibidor da p53**

**NL- Quimioterápico inibidor de tirosinaquinase Nilotinibe**

**$^1\text{O}_2$ -Oxigênio Singlete**

**Ph- Cromossomo Philadelphia**

**Pi- Piruvato**

**PI3K/AKT- Proteína fosfoinosítideo 3 quinase/Proteína quinase B**

**SOD- Enzima Superóxido Dismutase**

**TP53 ou p53- Proteína supressora tumoral responsável pela sinalização de reparo do genoma e envolvida na apoptose celular**

**TS- Proteínas supressoras tumorais**

**UV-Radiação ultravioleta**

**UVA- Radiação Ultravioleta de Baixa Frequência e Comprimentos de Onda Longos (320 a 400 nm)**

**UVB- Radiação Ultravioleta de Frequência e Comprimentos de Onda Médios (290 a 320 nm)**

**UVC- Radiação Ultravioleta de Alta Frequência e Comprimento de Onda Curtos (200 a 290 nm)**

**VCR- Quimioterápico Vincristina**

## RESUMO GERAL

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma desordem de células tronco hematopoiéticas em diferenciação na medula óssea. Após o início do tratamento quimioterápico algumas mutações podem resultar em resistência a múltiplas drogas (fenótipo MDR). Tumores tornam-se resistentes a fármacos que podem ou não ser quimicamente relacionados, com mecanismos de ação distintos e atuantes em alvos celulares diferentes, o que diminui a eficácia da quimioterapia. Portanto, o fenótipo MDR é multifatorial e inespecífico, sendo um grande obstáculo no tratamento do câncer. Com isso, é necessário compreender os mecanismos envolvidos na resistência tumoral, especialmente aspectos da relação alvo celular-comportamento MDR. Isto é, se o alvo celular por onde a resistência foi induzida será determinante nas respostas de células MDR a tratamentos posteriores. Duas linhagens celulares MDR provenientes da linhagem K562 foram estabelecidas, K562-Lucena 1 (Lucena) e FEPS. Ambas tiveram suas resistências induzidas por quimioterápicos com alvos celulares distintos. Lucena por vincristina, que atinge os microtúbulos, e FEPS por daunorrubicina, através de danos no DNA. A linhagem Lucena foi estudada previamente e mostrou-se resistente a agentes oxidantes com alvo preferencial na membrana celular e, sensível a agentes com alvo direto no DNA. Desta forma, este estudo busca investigar o comportamento da linhagem FEPS exposta a agentes com estes mesmos alvos celulares. Para isto, a linhagem FEPS foi exposta à radiação UVA e ao  $H_2O_2$ , seu principal produto. Ambos causam danos oxidativos preferencialmente em membrana celular. FEPS também foi exposta à radiação UVB, que atinge preferencialmente o DNA. Alguns testes foram feitos com a linhagem não MDR K562, a qual se mostrou sensível a todas as doses de UVA imediatamente após a exposição (0h), exibindo redução proliferativa e de viabilidade celular. Enquanto a FEPS também apresentou inibição na proliferação, para todas as doses testadas (a partir de 24h) e nenhuma redução na viabilidade celular. Quanto às respostas ao  $H_2O_2$ , a linhagem K562 apresentou maior sensibilidade, mostrando queda de proliferação, a partir de 24h, para todas as concentrações, e redução da viabilidade celular nas maiores concentrações (30 e 40 mM). A linhagem FEPS foi mais resistente ao  $H_2O_2$ , mostrando queda na proliferação frente a estas mesmas concentrações, somente a partir de 48h e à concentração de 20 mM, após 96h. Também apresentou redução na viabilidade celular apenas na concentração de 40 mM, após 72h. Não houve indução de morte celular em FEPS, nem por apoptose, nem por necrose após 24 e 48h de exposição ao  $H_2O_2$ , bem como quaisquer aumentos na indução de ERO (após 24h). Entretanto sua resistência foi menor quando comparada aos resultados encontrados por outros autores para a linhagem Lucena, o que pode indicar diferenças nas estratégias antioxidantes entre as linhagens. Quanto às respostas à radiação UVB, ambas as linhagens mostraram-se sensíveis, mostrando citotoxicidade em todas as doses testadas, a partir de 24h. Foi verificada indução de morte celular principalmente por apoptose (após 24 e 48h), assim como elevados níveis de ERO (após 24h). Portanto, é possível sugerir que agentes que atinjam diretamente o DNA sejam capazes de transpor o fenótipo MDR, independente do alvo celular por onde a resistência tenha sido induzida.

**Palavras-chaves:**  $H_2O_2$ ; leucemia; resistência tumoral; UVA; UVB.



## INTRODUÇÃO GERAL

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) caracteriza-se como uma doença clonal mieloproliferativa proveniente das células tronco hematopoiéticas em diferenciação na medula óssea. Geralmente, está associada a múltiplos processos biológicos (Albano *et. al.*, 2013; Marcé *et. al.*, 2013). A LMC é fortemente associada a uma anomalia cromossômica, onde são encontradas translocações recíprocas entre os braços longos do cromossomo 9 e do cromossomo 22, na maioria dos pacientes. Esta mutação resulta na formação do cromossomo Philadelphia (Ph), que carrega a sequência gênica BCR-ABL (Marcé *et. al.*, 2013; Rumjanek *et. al.*, 2013; Zaharieva *et. al.*, 2013) (Figura 1).

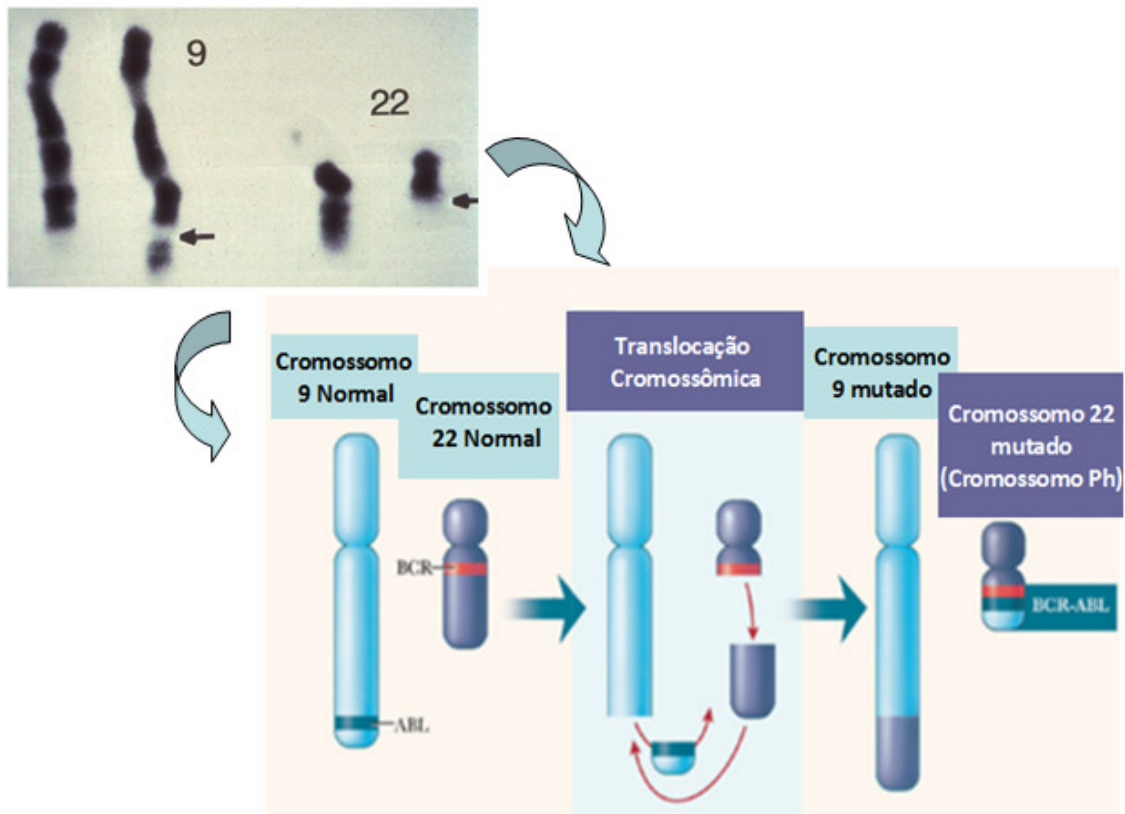


Figura 1. Cariótipo de um portador de LMC e representação esquemática da translocação cromossômica 9-22 com formação do cromossomo Philadelphia (Ph) (adaptado de Nowell 2007 e de [www.cmlnetwork.ca](http://www.cmlnetwork.ca))

Adicionalmente, de 5 a 10% dos pacientes apresentam mutações em outros cromossomos, que também colaboram com a progressão tumoral, como trissomia do cromossomo 8, 19 ou 21, perda do cromossomo Y, monossomia do cromossomo 7 ou formação do isocromossomo 17 (Johansson *et. al.*, 2002; Calabretta & Perrotti 2004). Entretanto, a formação do cromossomo Ph continua sendo a anomalia mais relevante na progressão da LMC.

Como resultado da formação deste cromossomo anômalo, há diversas disregulações gênicas, principalmente super-expressões. Dentre elas, destacamos a super-expressão em genes envolvidos na via da MAPK e na via da PI3K/AKT. Ambas responsáveis pela preservação da sobrevivência, estímulo da proliferação, migração, diferenciação celular e inibição da apoptose (Deininger *et. al.*, 2000; Katso *et. al.*, 2001; Ding *et. al.*, 2001; Melo & Barnes 2007; Albano *et. al.*, 2013). Entre as super-expressões em genes da via MAPK responsáveis pela manutenção destes fatores estão as do

oncogene BCR-ABL, envolvido na translocação do cromossomo Ph. Portanto, o aumento na transcrição deste oncogene indica progressão da LMC (Deininger *et. al.*, 2000, Calabretta & Perrotti 2004). Especialmente porque o aumento de sua transcrição e atividade costuma ser constitutiva (Deininger *et. al.*, 2000).

Podemos mencionar inclusive que o aumento na expressão do BCR-ABL é capaz de induzir mutações em genes envolvidos na manutenção da integridade do genoma, resultando em capacidade reduzida de encontrar danos na molécula de DNA e também de repará-los. Estas mutações amplificam fenótipos geneticamente instáveis, ou seja, aqueles que perpetuam um genoma alterado. O que afeta genes essenciais na fisiologia e maturação celulares (Aggerholm *et. al.*, 2000; Calabretta & Perrotti 2004; Melo & Barnes 2007) (Figura 2).

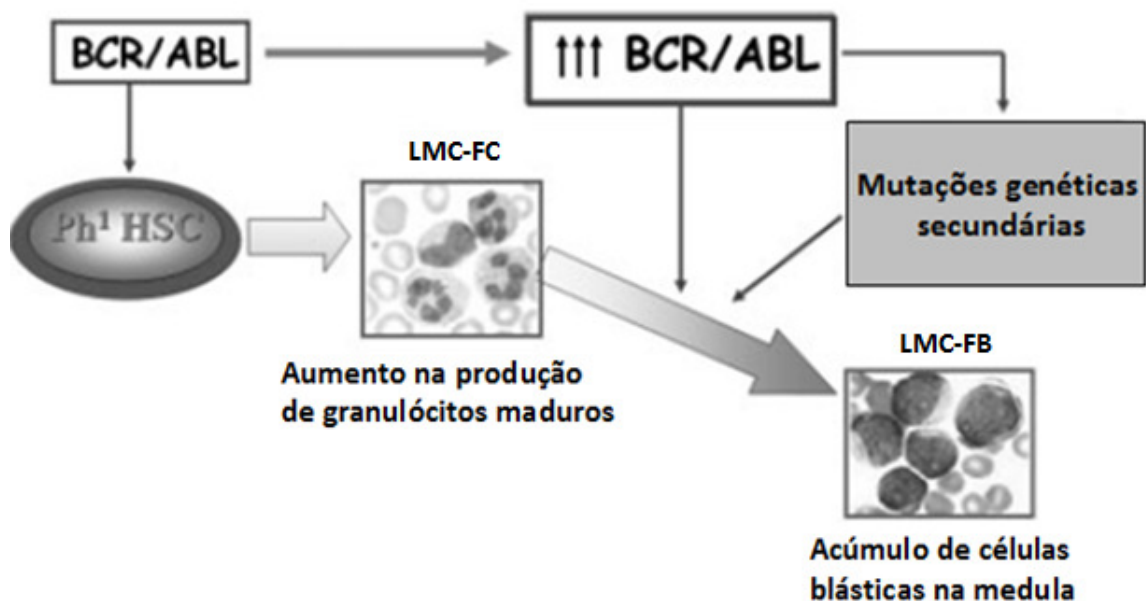


Figura 2. Representação do cromossomo Ph com mutação BCR-ABL gerando super-expressão do gene e induzindo mutações secundárias, relacionadas com a progressão fase crônica (LMC-FC) e fase blástica (LMC-FB) da LMC (adaptado de Calabretta & Perrotti 2004).

Também foram elucidados splices alternativos na região deste oncogene, com a fusão de éxons que alteram diretamente a função das proteínas codificadas por eles. Especialmente alterações na região BCR, muito mais variável e responsável por ditar o fenótipo da doença (Figura 3). Entretanto, mutações na porção ABL do gene perfazem 40% da resistência tumoral a inibidores de tirosina quinases. Tanto aos de primeira geração como o Imanitibe (IM), quanto aos de segunda, como Desatinibe (DS) e Nilotinibe (NL), o que representa mais um obstáculo no tratamento do câncer (Deininger *et. al.*, 2000; Marcé *et. al.*, 2013).

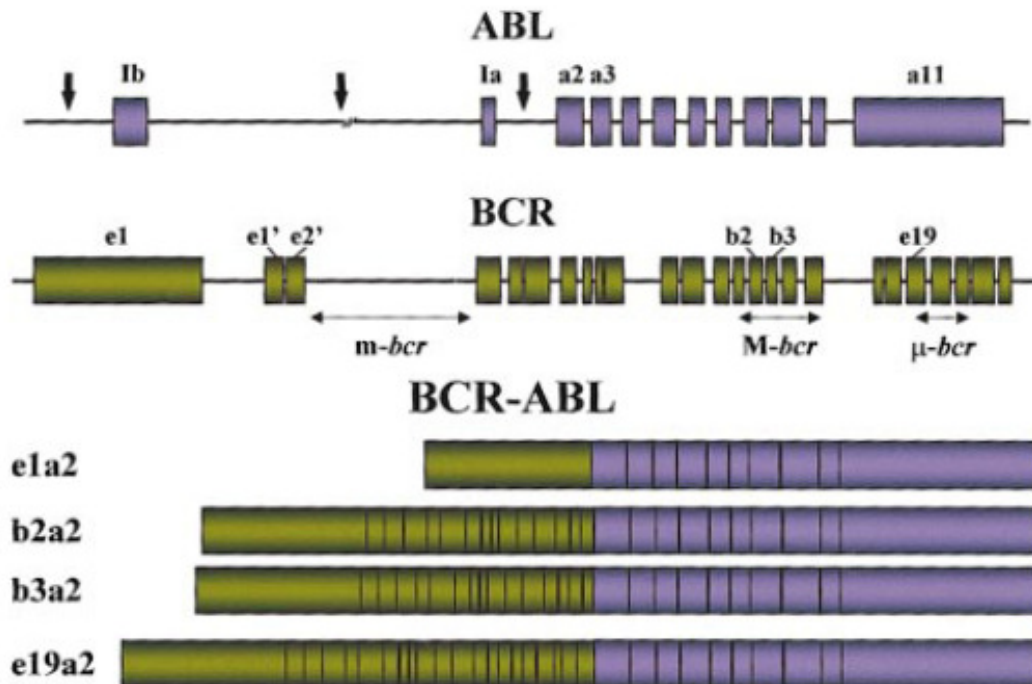


Figura 3. Localização dos pontos de quebra dos genes BCR e ABL e estrutura dos RNAs quiméricos advindos destas quebras (retirado de Deininger *et. al.*, 2000).

Além disso, são observados aumentos na via de sinalização da PKC, que possui uma direta relação de dependência entre a resistência tumoral e seu alto nível de concentração/ativação (Fine *et. al.*, 1996; Hu & Robert 1997; Kantharidis *et. al.*, 2000). Dentre as manifestações fisiológicas desta progressão, ressaltamos a queda na adesão celular de células progenitoras ao estroma da medula e à matriz extracelular. Portanto, estas células hematopoiéticas anormais se comportam independentemente de adesão e migram da medula para a circulação, estando imaturas. Esta queda de adesão é compatível com um aumento proliferativo e inibição de vias apoptóticas, o que demonstra que há a necessidade de interações célula-célula, célula-estroma na regulação negativa da proliferação (Verfaillie 1992; Di Bacco *et. al.*, 2000).

Dentre as proteínas responsáveis por estas interações de adesão e controle da migração celular temos a paxilina, talina, vinculina e tensina, além de receptores para microfilamentos de actina. Como reguladoras temos proteínas quinases Fak, cbl e Src, além de proteínas adaptadoras, como CRB2 e CrkL (Clark & Brugge 1995; Zaharieva *et. al.*, 2013). Portanto, alterações na atividade destas proteínas resultam em mudanças na aderência e na migração de células, incluindo as hematopoiéticas (Lewis *et. al.*, 1997; Di Bacco *et. al.*, 2000). Também foram demonstradas elevações na expressão de proteínas transportadoras de membrana, associadas à ativação do complexo protéico BCR-ABL da via MAPK. Portanto, a elevada atividade das quinases PKC e MAPK e/ou alterações na transdução de sinais em suas vias, favorece a progressão tumoral, incluindo de desordens hematológicas como na LMC (Albano *et. al.*, 2013; Zaharieva *et. al.*, 2013). Adicionalmente, o oncogene BCR-ABL também influencia a apoptose através de outras vias, como na atividade seletiva de proteínas *Stat*, responsáveis por ativar a transcrição gênica de genes envolvidos na apoptose, dentre eles do gene *Bcl-xl*, da família *Bcl-2*, responsável pela manutenção da sobrevivência (Zaharieva *et. al.*, 2013) (Figura 4).

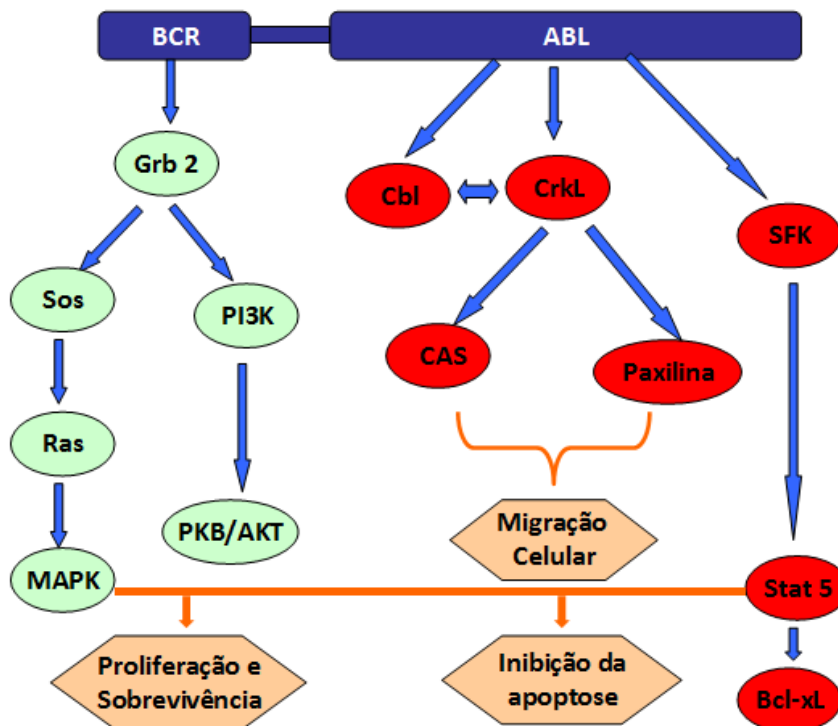


Figura 4. Representação esquemática das principais vias sinalizadoras ligadas ao complexo BCR-ABL envolvidas na progressão da LMC (adaptado de Zaharieva *et. al.*, 2013).

Quanto a sua fisiologia, a LMC se apresenta majoritariamente como uma patologia composta por três fases: a fase crônica, onde há a produção de granulócitos maduros concomitantemente com uma alta produção e acúmulo de células progenitoras mielóides em sítios extramedulares e na circulação periférica; a fase acelerada, onde há leucitose retardada e plaquetopenia, elevação na produção de basófilos, de células progenitoras e de blastos, com progressão da LMC e; a fase blástica, onde a diferenciação das células hematopoiéticas ocorre lentamente, levando a um grande acúmulo de células indiferenciadas (blásticas) na medula. Portanto, é caracterizada como a fase terminal da LMC, com duração que vai de semanas a poucos meses (Olmedillas & Regueira 2001; Zaharieva *et. al.*, 2013). Além disso, em alguns casos a doença pode passar da fase crônica diretamente para a fase blástica ou aguda, quando há uma quantidade igual ou superior a 30% de células blásticas na medula ou grande quantidade delas em sítios extramedulares (Rumjanek *et. al.*, 2013).

Alguns dos agentes essenciais no controle de células mielóides na fase crônica são proteínas supressoras tumorais (TS). Elas permitem que as células ou se mantenham em um estado de senescência proliferativa ou entrem em apoptose. Entretanto, com o aparecimento e avanço das crises blásticas, ocorrem perdas ainda maiores na função destas proteínas, o que favorece a progressão da doença. Na fase blástica, portanto se destacam e se consolidam fatores como a instabilidade genômica das células; ou seja, acúmulo de mutações; falhas no reparo de DNA; características fenotípicas alteradas e; encurtamento das extremidades dos telômeros (Melo & Barnes 2007). Dentre as TS mais afetadas na LMC e na maioria dos tipos de câncer, está a TP53 ou p53. Na fase blástica, cerca de 20% a 30% dos indivíduos possuem mutações nesta proteína. Ela é responsável por sinalizar eventuais reparos no DNA e, consequentemente prevenir o surgimento e a manutenção de células tumorais,

atuando na regulação da sobrevivência e proliferação, favorecendo a apoptose (Ahuja *et al.*, 1991; Di Bacco *et al.*, 2000).

É de conhecimento que mutações secundárias ligadas ao complexo BCR-ABL, como alterações na tradução da enzima ubiquitina ligase E3 (HDM2), suprimem a atividade da p53. O que prejudica sua atividade de reparo e de controle apoptótico intrínseco. Isto foi demonstrado através da inibição de HDM2 por MI-219, o que resultou na indução da apoptose por p53 em pacientes de LMC em crise blástica. Entretanto, o uso deste inibidor também foi capaz de induzir apoptose independentemente da presença do complexo BCR-ABL mutante. O que representa o importante papel da estabilização da p53 no controle da LMC (Peterson *et al.*, 2011). Além disso, a incapacidade das células progenitoras de se diferenciarem na medula na fase blástica, é uma resposta secundária às mutações em genes de regulação e diferenciação, como no próprio gene da p53. Embora a p53 não atue diretamente no processo de diferenciação, como foi visto. (Di Bacco *et al.*; 2000; Calabretta & Perrotti 2004) (Figura 5).

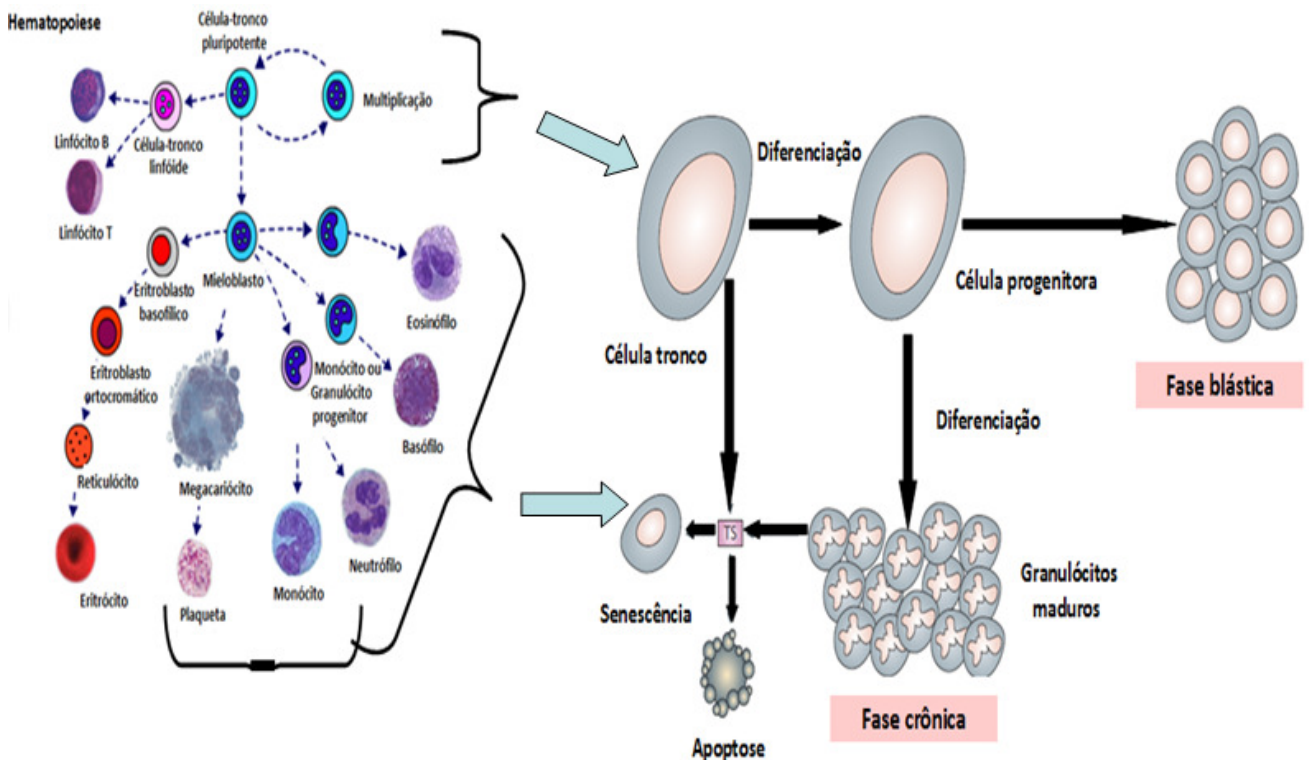


Figura 5. Eritropoiese na progressão das fases da LMC (adaptado de Melo & Barnes 2007 e de [www.lymphoma.about.com](http://www.lymphoma.about.com)).

Porém, devemos considerar não somente as mutações ligadas às vias de proliferação celular e/ou apoptóticas, mas também mutações ligadas à resistência da LMC a agentes quimioterápicos. Dentre elas, a superexpressão no gene MDR1, que codifica para uma proteína transportadora de membrana ABCB1 ou glicoproteína P (Pg-p), responsável pelo efluxo de drogas. Além disso, a resistência tumoral é influenciada por regulações epigenéticas, como metilações da cromatina e por mutações do próprio complexo BCR-ABL (Kantharidis *et al.*, 2000; Gottesman 2002; Marcé *et al.*, 2013). Desta forma, atualmente a resistência a múltiplas drogas tem sido sugerida como uma das maiores causas da falta de êxito na quimioterapia de diversos

tipos de câncer, incluindo o leucêmico (Gottesman & Pastan, 1993; Bellamy 1996; Fernandes *et. al.*, 2005; Gottesman & Ling, 2006; Carrett-Dias *et. al.*, 2011).

Este fenômeno de resistência tumoral é também conhecido como fenótipo MDR (do inglês, *multidrug resistance*). Manifesta-se a partir de tumores que inicialmente respondem a quimioterapia, mas que após um período, adquirem resistência a fármacos que podem ou não ser quimicamente relacionados, com mecanismos de ação distintos e que sejam atuantes em alvos intracelulares diferentes (Gottesman & Pastan, 1993; Gottesman 2002; Carrett-Dias *et. al.*, 2011).

Quanto à origem da resistência, esta pode ser intrínseca, dependendo do órgão em que se originou o tumor, ou adquirida. Mesmo em meio a controvérsias sobre a seleção ou indução de resistência pelos quimioterápicos, acredita-se que ocorre a seleção de variantes resistentes na população de células que dão origem às células MDR (Kantharidis *et. al.*, 2000). Principalmente porque populações tumorais são muito heterogêneas quanto à resistência a drogas. Especialmente ao que se refere à genética e epigenética nestas populações, onde ambos constituem parâmetros que representam a força seletiva de quais células serão eliminadas ou não pelos quimioterápicos. O resultado disso é o crescimento das variantes celulares resistentes e uma rápida aquisição do fenótipo MDR em diversos tipos de câncer (Gottesman 2002).

Também é bem conhecida em células MDR a ocorrência de mutações em genes reguladores de apoptose, como no *bcl-2*, um promotor de sobrevivência tumoral (Dole *et. al.*, 1994; Reed *et. al.*, 1998; Daflon-Yunes *et. al.*, 2013). Além disso, o fenótipo MDR apresenta mudanças em vias de sinalização envolvidas na proliferação celular e/ou supressão da apoptose, algumas já citadas anteriormente. Destas vias de sinalização, as mais relevantes no desenvolvimento e manutenção do fenótipo MDR são a via da PI3K/AKT e da PKC. Tendo em vista que o aumento da ativação destas quinases auxilia nestes dois processos, em diversos tipos de câncer, incluindo o leucêmico. Isto porque estas vias controlam a expressão e função de proteínas necessárias às células MDR, como das proteínas transportadoras ABC (Gottesman & Pastan 1993; Fine *et. al.*, 1996; Kantharidis *et. al.*, 2000).

Outro transportador que está presente em células eritroleucêmicas e que confere comportamento MDR é o transportador ABCC1, também conhecido como proteína de multiresistência (MRP). Ambos os transportadores P-gp e MRP possuem atividade dependente da hidrólise de ATP (Daflon-Yunes *et. al.*, 2013; Mao *et. al.*, 2014). Entretanto, estudos indicam que este transportador expulsa preferencialmente substratos conjugados ao tripeptídeo glutationa (GSH) através da catálise da proteína glutationa-S-transferase (GST) (Muller *et. al.*, 1994).

Considerando a detoxificação e resposta antioxidante por GSH, foi evidenciado que os níveis da enzima determinam a sensibilidade das células tumorais às drogas, assim como a danos advindos do metabolismo oxidativo e provenientes da ação de radicais livres (Black & Wolf 1991). Já é reconhecido que, tanto a forma reduzida, quanto a forma oxidada de glutationa, está relacionada com diversas funções celulares, como divisão celular, regulação enzimática, ativação de fatores transcricionais, controle dos níveis intracelulares de  $Ca^{+2}$ , reparo de DNA e ação antioxidante, exercendo um papel protetivo importante em células MDR (Dolphin *et. al.*, 1989). Esta importância está baseada em diversos processos já observados. Dentre eles, podemos mencionar a alta presença de glutationa reduzida (GSH), de enzimas



dependentes de sua ação e de enzimas envolvidas em sua manutenção, em células resistentes. Bem como depleção dos níveis de GSH em células sensibilizadas (Black & Wolf 1991).

Como aspectos gerais relacionados à super-expressão dos transportadores ABCB1 (Figura 6) e ao fenótipo MDR como um todo, podemos citar a alta capacidade de extrusão do corante rhodamina 123 por células MDR (Neyfakh 1988) e a reversão da resistência a quimioterápicos pelos agentes verapamil, bloqueadores de canais de cálcio, como o PMA, antagonistas como trifluoperazina e ciclosporina A (Tsuruo *et. al.*, 1981; Ford & Hait 1990; Sikic 1993; Rumjanek *et. al.*, 2001; Carret-Dias *et. al.*, 2016).

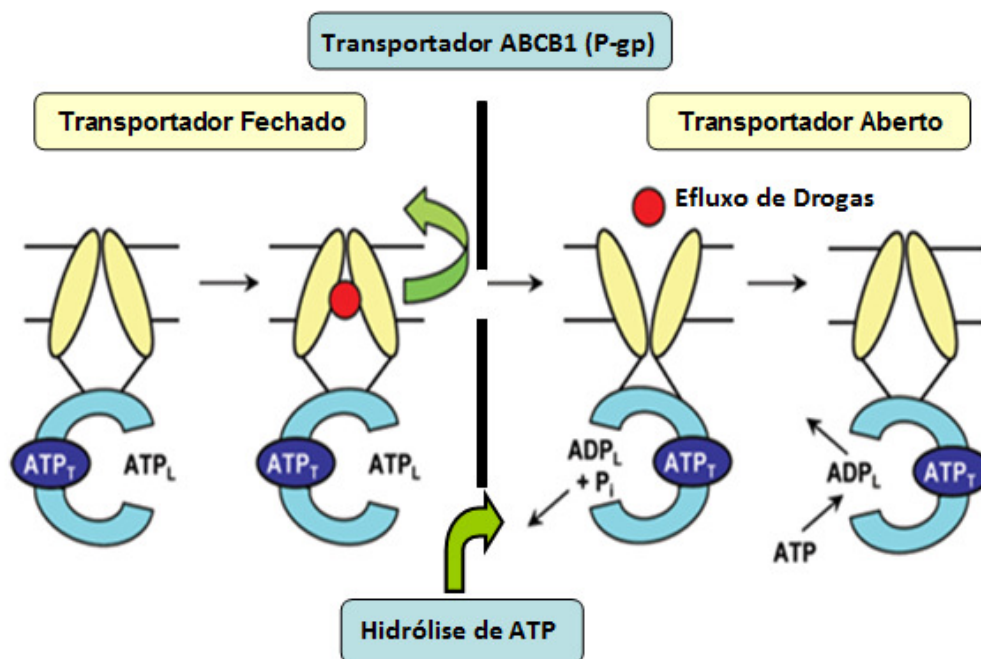


Figura 6. Representação simplificada do efluxo do principal transportador de membrana envolvido no fenótipo MDR (ABCB1 ou P-gp) (adaptado de Sharom 2011).

Quanto à importância das vias de sinalização quinásicas na expressão e função destes transportadores, foi demonstrado que com o uso de inibidores da PI3K/AKT, onde houve um decréscimo na expressão da ABCC1 (MRP), assim como com o silenciamento deste transportador (Cheng *et. al.*, 2013). Com o uso de moduladores de MDR, como inibidores da PKC, houve sub-regulações na expressão da glicoproteína transportadora ABCB1 (P-gp), além de diminuição em sua atividade de efluxo e de sua ativação por fosforilação (Fine *et. al.*, 1996; Hu & Robert 1997).

Embora estes sejam resultados promissores, ensaios clínicos de inibição não têm demonstrado sucesso em transpor a resistência como um todo, especialmente em relação aos transportadores ABCB1 (Ding *et. al.*, 2001). Esta super-expressão pode ocorrer em resposta a diferentes agentes, como drogas antitumorais indutoras de dano ao DNA e exposição à radiação UV (Kohno *et. al.*, 1989; Uchiumi *et. al.*, 1993; Ohga *et. al.*, 1996).

Desta forma, o fenótipo MDR por ser inespecífico e capaz de diminuir a sensibilidade tumoral a múltiplos quimioterápicos, amplamente utilizados, abre caminho para pesquisas com agentes alternativos, com objetivos terapêuticos, ou na busca de uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência tumoral. Dentre os quais, a relação alvo celular-comportamento MDR, isto é, se o alvo celular

atingido por estes agentes em células resistentes será determinante em suas respostas fisiológicas.

Considerando a ação em diferentes alvos celulares, as faixas de radiação ultravioleta, (UVA; UVB e UVC) foram avaliadas frente à indução de sensibilidade em linhagens eritroleucêmicas humanas com e sem o fenótipo de resistência a múltiplas drogas, ambas de LMC (Trindade *et. al.*, 1999). A linhagem resistente Lucena foi obtida a partir da linhagem parental K562, através de crescentes concentrações do quimioterápico Vincristina (VCR) (Okabe-Kado *et. al.*, 1983) e foi desenvolvida por Rumjanek *et. al.*, 2001. Este quimioterápico possui papel principal no processo de aquisição do fenótipo MDR, pois leva há significativas alterações no citoesqueleto das células tumorais, como rearranjos na distribuição dos microtúbulos (Votto *et. al.*, 2007). O rearranjo microtubular ocorre através da atuação da VCR em células leucêmicas, agindo como um bloqueador da polimerização dos microtúbulos, ligando-se a dímeros de tubulina entre suas  $\alpha$  e  $\beta$  subunidades e conseqüentemente alterando estas organelas e a formação do fuso mitótico (Himes *et. al.*, 1976; Owellen *et. al.*, 1977; Lee 1995).

Quanto à radiação ultravioleta como um agente, ela constitui um tipo de onda eletromagnética não-ionizante com um comprimento de onda que varia de 200 a 400 nm. Usualmente, esta larga faixa do espectro eletromagnético é dividida em três porções distintas, que vão desde a porção de raios com comprimentos de onda curtos e de maior frequência energética, os raios ultravioletas C (UVC-de 200 a 290 nm); raios de comprimento de onda e frequência médios, os raios ultravioletas B (UVB- de 290 a 320 nm) e; raios de comprimento de onda e frequências longos, os raios ultravioletas A (UVA-de 320 a 400 nm) (Jiang *et. al.*, 2009). Quanto ao alcance na superfície terrestre destes raios, UVC é totalmente absorvido pela camada de ozônio da atmosfera, UVB irradia cerca de 5% de suas ondas na superfície e, UVA penetra 95% de seus raios (Figura 7). É de conhecimento de que regiões atmosféricas com rarefação de ozônio, aumentam o risco de mutações associadas à radiação ultravioleta (Kuluncsics *et. al.*, 1999). Especialmente, mutações associadas a danos diretos ou indiretos à estrutura de DNA (Sage *et. al.*, 1993; Kuluncsics *et. al.*, 1999).



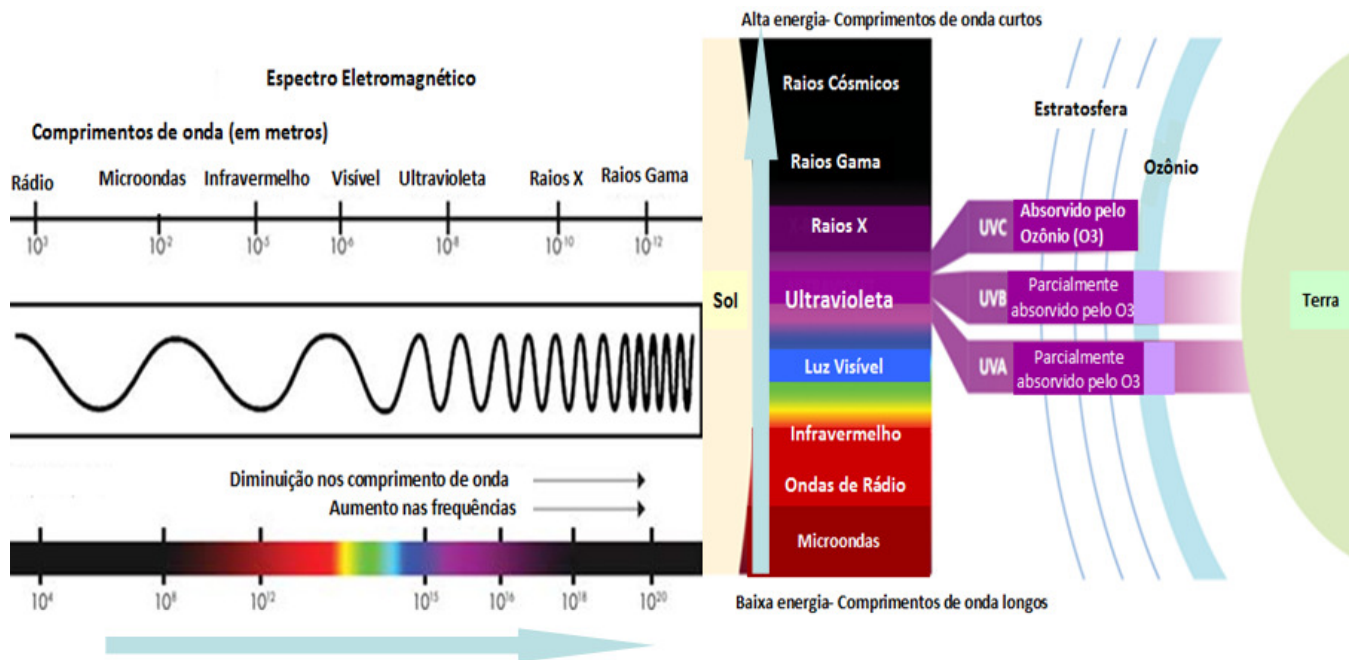


Figura 7. Localização da radiação ultravioleta no Espectro Eletromagnético e nível de penetração de seus três tipos de raios na superfície terrestre (adaptado de [www.surfscience.com](http://www.surfscience.com) e De [www.westernreservepublicmedia.org](http://www.westernreservepublicmedia.org)).

Quanto à ação dos diferentes raios UV frente a diferentes alvos celulares, as faixas de radiação UVB e UVC atingem preferencialmente o DNA, ou seja, seus efeitos atuam diretamente nesta molécula, formando principalmente dímeros de pirimidina (Cadet *et. al.*, 2005; Mouret *et. al.*, 2006; Zelle *et. al.*, 1980). Diferentemente, para a radiação UVA, o alvo preferencial passa a ser a membrana celular, onde podem ocorrer danos indiretos, através de peroxidação lipídica, gerada por espécies reativas de oxigênio (ERO's) como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (McCormick *et. al.*, 1976; Black 1987; Tyrrell & Keyse 1990; de Grujil 2000) (Figura 8).

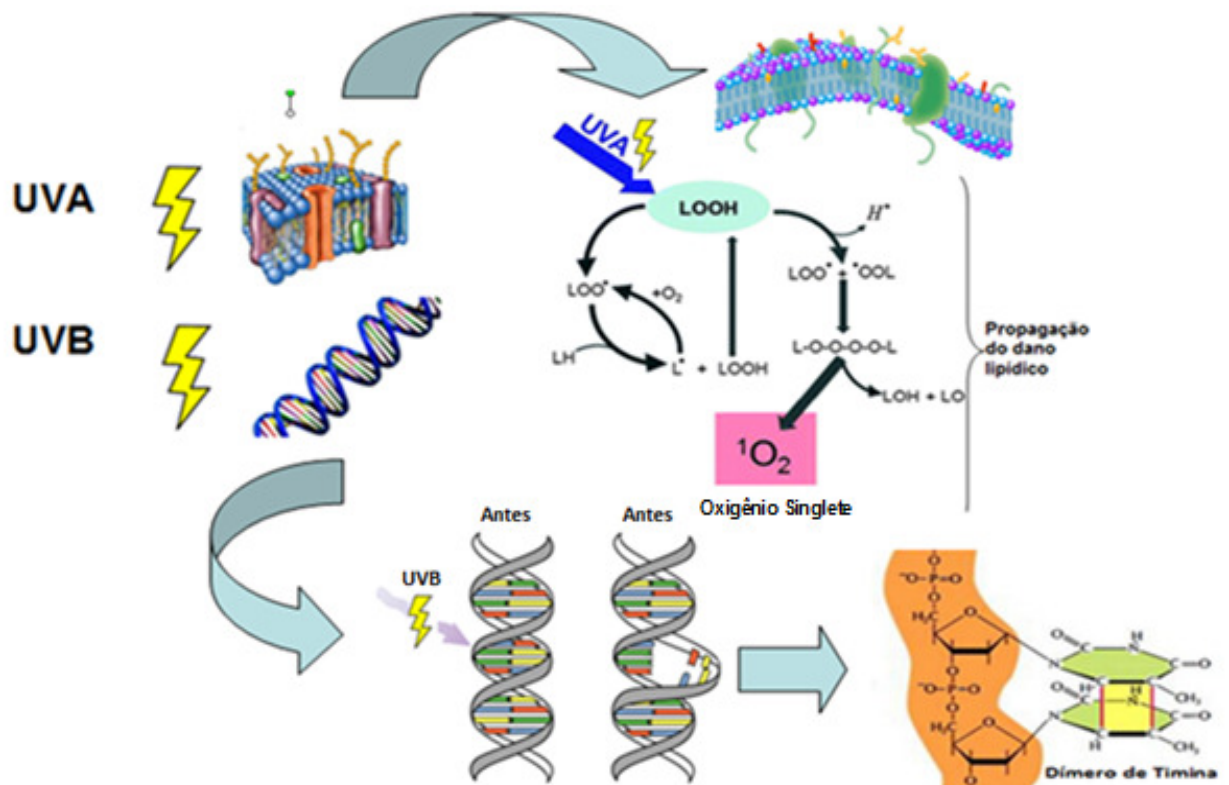


Figura 8. Efeitos dos raios ultravioletas UVA e UVB em seus principais cromóforos celulares (adaptado de [www.pt.slideshare.net](http://www.pt.slideshare.net) e [www.earthobservatory.nasa.gov](http://www.earthobservatory.nasa.gov)).

Esta resposta celular na membrana é justificada por danos em estruturas não-nucleares contribuírem para a mortalidade de células por UVA, principalmente por apoptose, quanto por necrose (Beer *et. al.*, 1993; Godar *et. al.*, 1995; Trindade *et. al.*, 1999). Além disso, altos níveis de ERO podem atuar como segundos mensageiros em cascatas sinalizadoras, incluindo a via da MAPK. Em contraste, níveis moderados de ERO, podem levar a fragmentação mitocondrial, o que aumenta a sensibilidade das células a estímulos apoptóticos (Kim *et. al.*, 2014).

Considerando as duas linhagens eritroleucêmicas K562 sensível e K562-Lucena 1 (MDR) e a preferencial ação das diversos tipos de radiação UV em alvos celulares específicos (DNA e membrana plasmática), foram analisadas as respostas destas duas linhagens frente a estas radiações. Quanto à UVB e a UVC, ambas as linhagens foram igualmente sensíveis, embora significativamente diferentes quando expostas à radiação UVA. A linhagem Lucena se apresentou mais resistente à faixa de UVA, quando comparada à linhagem K562, significativamente mais sensível. Também foi demonstrada uma maior atividade da enzima antioxidante catalase nas células MDR expostas à UVA, o que caracteriza um aumento na capacidade antioxidante destas células frente à indução de apoptose. A radiação UVA também alterou a funcionalidade da P-gp (ABCB1), embora esta alteração não tenha afetado a resistência destas células à faixa de radiação testada em outros parâmetros (Trindade *et. al.*, 1999).

Ainda buscando um maior entendimento sobre o fenômeno MDR, estudos de Votto *et. al.*, 2007 com a toxina microcistina foram realizados. Foi observado que as células MDR Lucena se mostraram mais resistentes do que as não MDR K562. A

microcistina induziu estresse oxidativo somente nas células K562, o que indica que linhagens MDR se mostram mais resistentes a agentes oxidativos. Este achado corrobora com o demonstrado por Trindade *et. al.*, 1999, onde o agente indutor de radicais livres, UVA, causou maior efeito na linhagem não resistente K562. Ambas as respostas podem ser justificadas, pelas células MDR terem sido capazes de desenvolver um sistema antioxidante mais eficiente que as células não MDR K562 (Trindade *et. al.*, 1999), o que também poderá ser elucidado na linhagem MDR FEPS.

Também foi observado que células eritroleucêmicas K562 (não-MDR) e Lucena (MDR) expostas ao extrato bruto de cebola, mostraram danos ao DNA e diminuição na viabilidade (Votto *et. al.*, 2010). O ácido acetilsalicílico (ASA), um antiinflamatório não esteróide com atividade antioxidante, também se mostrou eficiente, inibindo a proliferação celular e induzindo citotoxicidade nas mesmas linhagens, desconsiderando o fenótipo MDR da linhagem Lucena (Carrett-Dias *et. al.*, 2011).

Portanto, com estudos focados em diferentes alvos, é possível inferir que agentes que ataquem diretamente o DNA sejam capazes de sensibilizar células tumorais MDR. Desta forma, é interessante estudar outra linhagem celular tornada MDR através de um quimioterápico com outro alvo celular, a fim de avaliar se o alvo atingido pela droga que gerou a resistência irá determinar e/ou induzir o comportamento MDR desta linhagem. Estes objetivos poderão ser alcançados, através de pesquisas com a recém estabelecida e ainda pouco estudada linhagem eritroleucêmica MDR FEPS, desenvolvida por Daflon-Yunes, *et. al.*, 2013. Esta linhagem MDR foi adquirida através da utilização de crescentes concentrações do quimioterápico daunorrubicina (DNR) e também possui a linhagem K562 como parental. A DNR atua diferentemente de VCR, através de modulações que ocorrem em nível de DNA. Embora, também sofra extrusão por proteínas trans-membrana, tendo suas concentrações intracelulares diminuídas e também induzindo comportamentos celulares de resistência a múltiplos fármacos (Daflon-Yunes, *et. al.*, 2013). Estes comportamentos são demonstrados através da resistência da FEPS à VCR e a própria DNR, enquanto a K562 é sensível a ambas as drogas.

Quanto às células Lucena, estas são resistentes a VCR, mas apresentam resistência intermediária a DNR (Rumjanek *et. al.*, 2001). Também foi elucidado que as linhagens MDR Lucena e FEPS são resistentes ao Imatinibe (IM), o primeiro inibidor de MAPK conhecido, utilizado no tratamento de leucemias mielóides crônicas. Das três linhagens, a mais resistente ao IM foi a FEPS, enquanto que a linhagem não MDR K562 foi totalmente sensível a droga (Daflon-Yunes *et. al.*, 2013). Com a realização de silenciamentos gênicos de ABCB1 em Lucena e FEPS, foram observados aumentos na sensibilidade a VCR, DNR e IM, mas não atingindo o nível de sensibilidade da linhagem K562, o que reforça a atuação de outros mecanismos envolvidos na resistência observada, considerando a ampla gama de características do fenótipo MDR já citadas (Daflon-Yunes *et. al.*, 2013).

Com todas as características do fenótipo MDR, a linhagem FEPS, adicionalmente possui a expressão do transportador de efluxo ABCC1 (MRP), não presente na linhagem Lucena. Além disso, é relevante investigar se a FEPS, terá uma resposta de resistência diferente daquela apresentada pela linhagem Lucena, considerando que as duas linhagens foram atingidas por quimioterápicos em alvos celulares diferentes. A Lucena em seus microtúbulos por VCR e a FEPS em seu DNA por DNR.

Com estes e outros resultados, observa-se que a resistência a drogas quimioterápicas tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa já há alguns anos (Kohno *et. al.*, 1989; Trindade *et. al.*, 1999; Gottesman & Ling 2006; Votto *et. al.*, 2007, 2010; Daflon-Yunes *et. al.*, 2013; Carret-Dias *et. al.*, 2011; Mao *et. al.*, 2014). Estas pesquisas ocorrem especialmente em estudos *in vitro* de linhagens tumorais estabelecidas, considerando que o fenótipo MDR representa o maior obstáculo no tratamento do câncer ainda hoje e que muito de seus mecanismos ainda são pouco compreendidos e/ou desconhecidos, especialmente no que se refere à relação alvo celular específico-comportamento MDR.

## **OBJETIVO**

Verificar se há relação entre o fenótipo MDR e sua sensibilidade a agentes com diferentes alvos celulares, na linhagem eritroleucêmica MDR FEPS, afim de estabelecer um maior entendimento sobre maneiras de transpor a resistência tumoral no tratamento de leucemias mielóides crônicas.

## **METODOLOGIA**

### **1. Manutenção das linhagens celulares**

As linhagens eritroleucêmicas K562 (não MDR) e FEPS (MDR) foram obtidas do Laboratório de Imunologia Tumoral, junto ao Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Méis, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As linhagens permaneceram no Laboratório de Cultura Celular no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande. Ambas as linhagens foram mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com bicarbonato de sódio (2 g/L), com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (Penicilina 100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e antimicótico (0,25 µg/mL). As células foram mantidas em garrafas de cultura à 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A linhagem FEPS recebeu 300 ng/ml de daunorrubicina (DNR) para preservação do fenótipo MDR a cada repique realizado.

### **2. Exposição das linhagens eritroleucêmicas K562 e FEPS aos tratamentos com alvos celulares distintos**

#### **2.1. Exposição das linhagens eritroleucêmicas K562 e FEPS à radiação UVB (alvo DNA)**

As células ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) foram expostas à radiação UVB em caixa preta de madeira, com dimensões de 51,8 cm por 32 cm. Para irradiar, foi utilizada lâmpada de UVB VL 115M: 115V, 30 W (com pico de emissão em 312 nm), mantida a uma distância de 30 cm da placa com células. As células foram dispostas de maneira em que cada

coluna representasse um tratamento e que cada uma delas fosse intercalada com uma coluna preenchida com tinta preta de carimbo, diluída em PBS. Esta lógica foi utilizada de maneira a evitar a refração dos raios UV, certificando que cada tratamento recebesse a sua dose correta.

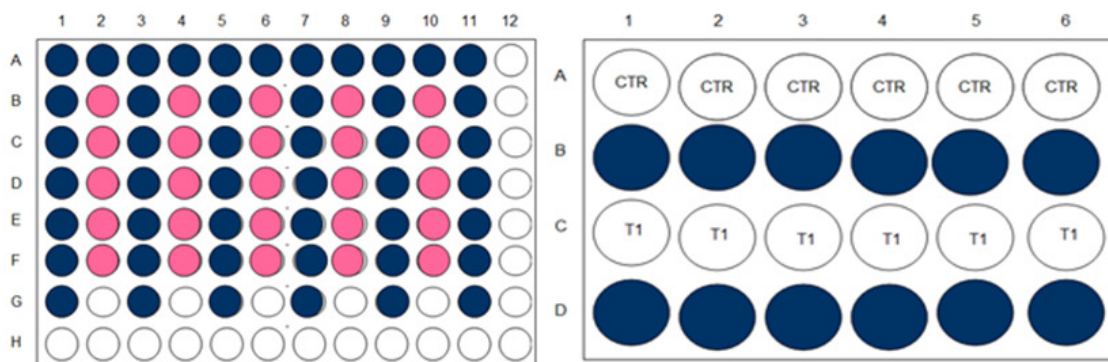


Figura 9. Representação esquemática de placa de cultura 96 e 24 poços para experimentos com radiação UV (na placa 96 poços as células foram expostas as doses de 0,01; 0,03; 0,06 e; 0,12 J/cm<sup>2</sup> respectivamente e; na placa 24 poços foram expostas à dose de 0,03 J/cm<sup>2</sup>, a dose escolhida a partir dos testes de viabilidade celular).

Além disso, todas as células foram irradiadas diluídas em PBS, para evitar absorção dos raios pela coloração vermelho fenol do meio de cultura. Embora os controles não tenham recebido radiação, através do bloqueio da mesma por 3 a 4 camadas de fita isolante preta, estes também foram diluídos em PBS, para fins de manter um padrão e praticidade. Como todos os tratamentos estavam contidos em uma mesma placa, as doses foram alcançadas através do deslocamento temporal de uma tampa de placa forrada com papel preto. O que permitiu que cada coluna de células recebesse sua dose corretamente, obedecendo a uma escala de tempo pré-calculada, com base na fórmula proposta por Diffey (2002), à seguir:

$$t \text{ (em minutos)} = \frac{1000 \times \text{Dose (J/cm}^2\text{)}}{60 \times \text{Irradiância medida (mW/cm}^2\text{)}}$$

De forma que é de conhecimento que lâmpadas de UV sofrem variações temporais em suas irradiâncias, esta foi medida com dosímetro mensalmente, para que o cálculo da escala de tempo de exposição fosse ajustada, conforme estas variações, de forma a manter permanente as doses escolhidas. Desta forma, a média das irradiâncias foi de 59,09 μw/cm<sup>2</sup>, para medições de Junho de 2015 à Julho de 2016.

Após as irradiações, as placas foram centrifugadas a 1600 rpm por 10 min para que o PBS fosse retirado das placas e as células fossem ressuspensas em meio de cultura, para que pudessem ser incubadas na estufa até o tempo necessário de realização de cada tipo de experimento (de 0h a 96h).

## 2.2. Exposição das linhagens eritroleucêmicas K562 e FEPS ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (alvo membrana)

As células (2,5x10<sup>5</sup> células/ml) foram expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de 10mM, 20mM, 30mM e 40mM por 30 minutos, diluídas em meio. Estas doses foram

obtidas a partir de estoques de 200 mM, 400 mM, 600 mM e 800 mM, respectivamente. Após a exposição, as células foram então lavadas com PBS, ressuspensas em meio de cultura sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubadas em estufa, até o tempo necessário a cada tipo de experimento (de 0 a 96h). A placa de cultura foi montada de forma contínua, isto é, sem a necessidade de fileiras preenchidas com tinta. O volume total de cada poço foi de 200 µl para a placa de 96 poços e de 1 mL para a placa de 24 poços.

### **3. Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão por Azul de Trypan**

A viabilidade celular, isto é, a porcentagem de células viáveis sobre a quantidade de células totais de uma amostra, foi avaliada pelo método de exclusão por azul de trypan, para as linhagens K562 e FEPS. O método por azul de Trypan consiste nas células coradas em azul serem consideradas inviáveis e as não coradas (transparentes) como viáveis. Este método foi avaliado às 0, 24, 48, 72 e 96 h após exposição aos diferentes tratamentos com UV ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ambos os tratamentos foram aplicados com base em uma curva dose-resposta, pré-estabelecida e individualizada. Ambos os experimentos foram montados em placas 96 poços, com n de 5 poços para cada tratamento. As células foram irradiadas com UVB (conforme descrito no item 2.1), nas doses de 0,01; 0,03; 0,06 e 0,12 J/cm<sup>2</sup>, ou foram incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (conforme descrito no item 2.2), nas doses de 10; 20; 30 e 40 mM, por 30 minutos. Para as células que receberam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em seguida elas foram centrifugadas e lavadas com PBS. Por fim, receberam meio e foram incubadas em estufa até o momento de retirada de alíquotas diárias de contagem e avaliação da viabilidade celular. A partir destes resultados, foram escolhidas as menores doses com efeito significativo e os tempos de exposição adequados para cada teste posterior (itens 4 e 5), 0,03 J/cm<sup>2</sup> para radiação UVB e 30 mM para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **4. Análise quantitativa de morte celular por apoptose e necrose**

A avaliação da apoptose e necrose para a linhagem FEPS foi realizada de acordo com Ribble *et. al.*, 2005, onde foram adicionados 2 µl de solução (proporção 1:1) de laranja de acridina (100 µg/mL) e brometo de etídio (100 µg/mL), diretamente no poço a ser analisado. As células foram mantidas em meio desde a preparação da placa até o momento da análise de cada poço individual. A avaliação das respostas de morte celular foi realizada a partir de áreas fotografadas de cada poço (em um aumento de 400X) por microscópio de epifluorescência (Olympus IX81). Os dados foram expressos em porcentagem relativa para o número total de células visualizadas na área de captura. As células foram classificadas de acordo com o método modificado de Kosmider *et. al.*, 2004, onde células com citoplasma e núcleo verdes foram consideradas viáveis; aquelas de núcleo laranja com cromatina fragmentada e citoplasma verde foram consideradas apoptóticas e; aquelas com núcleos uniformemente manchados de laranja foram consideradas necróticas. O uso dos corantes brometo de etídio e laranja de acridina foi realizado devido a capacidade de

cada um deles se ligar especificamente a uma região distinta na célula, no DNA e no citoplasma, respectivamente. Ou seja, o brometo corou de laranja a cromatina nuclear e o laranja de acridina corou o citoplasma de verde, de forma a permitir uma boa classificação dos tipos de morte celular sofridos pela FEPS, após 24 e 48h de exposição à radiação UVB ou ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **5. Avaliação na geração de ERO**

A capacidade dos diferentes tratamentos com UVB ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzir a produção de espécies reativas de O<sub>2</sub> na linhagem FEPS foi avaliada após 24h. Este método consiste na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), geradas pelo aquecimento à 37°C do composto fluorescente H<sub>2</sub>DCF-DA por 1h e 30 min, gerando uma medida numérica de cinética de fluorescência. Este experimento foi analisado por fluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer), com excitação e emissão de 485 e 520 nm, respectivamente. De forma que foi então estabelecido que, quanto maior a fluorescência líquida da amostra, maior seria a concentração de ERO gerada pelos tratamentos, aos quais a linhagem celular FEPS teria sido exposta.

## **6. Análise dos resultados**

Nas análises dos testes de viabilidade de exclusão por Azul de Trypan, foram realizados três experimentos independentes, utilizando quintuplicatas. Para os demais testes, foram realizados dois experimentos independentes, também utilizando n de 5 poços para cada tratamento. Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão, utilizando análise de variância de uma via (ANOVA One-Way), seguida por pós-teste Unequal ( $p < 0,05$ ).

## **CAPÍTULO 1**

Manuscrito a ser submetido à revista científica Blood Cells, Molecules and Diseases.



**Exposure of human erythroleukemia cells to agents with distinct cellular targets: a study about the relation between cellular target inducer resistance and MDR behavior**

Fernanda Saldanha Soares<sup>1,2</sup>, Aline Portantiolo Lettnin<sup>1,2</sup>, Eduardo Felipe Wagner<sup>2,3</sup>, Francielly Hafele Mattozo<sup>2</sup>, Michele Carrett-Dias<sup>1,2</sup>, Vivian Rumjanek<sup>4</sup>, Daza Moraes Vaz Batista Filgueira<sup>2</sup>, Ana Paula de Souza Votto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas- Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande- FURG, Rio Grande, RS, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Cultura de Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande- FURG, Rio Grande, RS, Brasil

<sup>3</sup>Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande- FURG, Rio Grande, RS, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Imunologia Tumoral, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Méis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Corresponding author: Ana Paula de Souza Votto

Phone/Fax: +55 53 32935192/ + 55 53 32336848

E –mail address: [anavotto@yahoo.com.br](mailto:anavotto@yahoo.com.br)

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande – FURG,  
Rio Grande, RS, Brazil

Zip Code: 96203-900

Rio Grande, RS, Brazil

## ABSTRACT

After chemotherapy treatment, cell mutations might occur, resulting in multiple drug resistance phenotypes (MDR phenotype). Tumors become resistant to drugs with distinct mechanisms of action operating on different cell targets. Therefore, the MDR phenotype is multifactorial and unspecific, turning into a huge obstacle in the search for the cure of cancer. So, is necessary understand the mechanisms underlying tumoral resistance, especially those involved in the relation cell target/MDR behavior. Two MDR cell lines, K562-Lucena 1 (Lucena) and FEPS, were established from K562 cell line. Both had its resistance induced by chemotherapy drugs aiming distinct targets. Lucena was induced by vincristine, which targets the microtubules, and FEPS by daunorubicin, that causes DNA damage. Therefore, intending to investigate the relation cell target/MDR behavior, the effects on MDR FEPS cell line exposed to UVB (target DNA), UVA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (target cell membrane) were studied in the present work. The cell line K562 was more sensitive to UVA when compared to FEPS, presenting proliferative inhibition and cell viability decrease in all doses (starting at 0h). FEPS showed proliferative decrease only after 24 h and no cell viability reduction. FEPS was more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than K562, once it presented cytotoxicity only when challenged with 40mM after 72 h FEPS also presented no cell death or even ROS increase when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was tested. Both cell lines were sensitive to UVB, presenting cytotoxicity after 24 h, mainly by apoptosis (24 and 48h), as well as increased ROS levels (24h). Therefore, the present work implies that agents acting on the DNA might be capable to transpose the MDR phenotype, independently from the cell target by which the resistance might have been inducted.

Keywords: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; leukemia; MDR phenotype; UVB; UVA.

## INTRODUCTION

The chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative clonal disease from hematopoietic stem cells in differentiation process within the bone marrow [1,2]. Usually, it is associated with the Philadelphia chromosome (Ph), resulting translocation of the long arms of chromosomes 9 and 22 [2,3,4]. The mentioned chromosomal anomaly results in gene disorders and these mutations act on signaling pathways, which contribute to tumoral progression [1,5,6] and might also induce to the multiple drug resistance phenotype (MDR phenotype) [2,7]. This phenomenon occurs due to the use of drugs that might, or not, be chemically related with distinct mechanisms action operating in different cell targets [8,9,10]. The MDR phenotype can present many characteristics, including the increase of membrane transporters, such as ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP) and ABCG2 (MXR), DNA repair alterations, increase of antioxidant capacity, cytoskeleton alterations, microtubules rearrangement [9,11,12,13]. Therefore, the MDR phenotype is non-specific and multifactorial, leading to the need of a better understanding concerning the mechanisms involved in tumoral resistance. Intending to better understand this phenotype, MDR cell lines were established from K562 erythroleukemic cell line by treatment with two chemotherapeutic drugs for two cell targets. The cell line K562-Lucena 1 (Lucena), was turned into MDR by exposure to increasing concentrations of the chemotherapeutic drug vincristine [14], which acts in the microtubules. The cell line FEPS was established by using increasing concentrations of the chemotherapeutic drug daunorubicin [13], which provoke DNA damages directly. Considering this, it is highly relevant to investigate if the cell target of the chemotherapeutic responsible for the resistance induction will be determinant for further responses to agents with different targets. Previous studies have shown the sensibility of Lucena cell line, when challenged with agents aiming directly the DNA as a target, and

its resistance to agents aiming membrane targets and oxidant agents [11,12,15]. Considering agents that act on distinct targets, UVA radiation causes damage to the cell membrane by the generation of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [16,17,18,19]. Differently, UVB radiation affects mainly the DNA [19,20,21]. Therefore, in the present work it was evaluated the sensibility of FEPS cell line to agents with different targets. The aim of this study was to investigate if there are any relation between the cell target by which the cell resistance was induced and its further sensitivity to agents with different cell targets.

## METHODS

### 1. Cell Culture

The erythroleukemic K562 (non-MDR) and FEPS (MDR) cell lines were obtained from the Tumoral Immunology Laboratory, placed at Leopoldo de Meis Medical Biochemistry Institute of Federal University of Rio de Janeiro. The cell lines were kept at the Cell Culture Laboratory in the Biological Sciences Institute from the Federal University of Rio Grande. Both cell lines were kept in RPMI 1640 medium, supplemented with sodium bicarbonate (2g/L), with 10% of fetal bovine serum, 1 % of antibiotics (100 U/mL of penicillin e 100 µg/mL de streptomycin) and antimycotic (0.25 µg/mL de amphotericin). The cells were maintained in culture bottles at 37°C and stored in an incubator with a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cell line FEPS received 300 ng/ml of daunorubicin (DNR) for preservation of the MDR phenotype at each medium renewal.

### 2. Exposure of erythroleukemic K562 and FEPS cell lines to UVA and UVB radiation

The cells ( $2.5 \times 10^5$  cells/ml) were exposed to UVA and UVB radiation. Regarding UVA radiation exposure, the cells were rinsed with PBS and placed in Petri plates and exposed to doses of 0.2; 1 and 2 J/cm<sup>2</sup> of radiation and different exposure times were used to reach the desired doses. An UVA lamp (VL 115L: 115V, 30 W Vilber Lourmat, France) was used for this purpose, with an intensity peak of 365 nm and irradiance of 0.00375 J/cm<sup>2</sup>. After irradiation, the cells were transferred to 96-well plates and further centrifuged at 220 rpm during 8 minutes. The PBS was removed and the cells were resuspended in culture medium and serum.

Concerning UVB exposure, the cells were placed at 24 or 96-well plates with PBS and exposed to doses of, 0.01; 0.03; 0.06 e 0.12 J/cm<sup>2</sup>. For that goal, an UVB lamp (VL 115M: 115V, 30 W), with emission peak of 312 nm. The irradiance of the lamp was 59.09  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  and different exposure times were used aiming to obtain the desired doses. After irradiation, the 96-well plates and 24-well plates were centrifuged at 1500 rpm for 5 min and 1600 rpm for 10 min, respectively, for PBS removal and further cell resuspended in supplemented culture media. After irradiation, the plates were then kept in an incubator at 37°C, with a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, up to the necessary time for each reading or analysis (from 0h to 96h).

### 3. Exposure of erythroleukemic K562 and FEPS cell lines to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

The cells ( $2.5 \times 10^5$  cells/mL) were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the concentrations of 10mM, 20mM, 30mM and 40mM for 30 minutes in culture media. After exposure, the cells were rinsed in PBS and resuspended in culture medium without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and kept in an incubator at 37°C, with a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, up to the necessary time for each experiment (from 0h to 96h).

#### 4. Trypan Blue Assay

The trypan blue assay show the number of viable cells as well the cell viability. This method indicates non-viable cells, which get stained in blue, while viable cells are not stained (colorless). The percentage of cell viability is obtained by number of the viable cells divided by the total number of cells in a sample. The analyses were run at time points 0, 24, 48, 72 and 96 h after exposure to the different UVA or UVB doses and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations.

Based on the results of both experiments, the dose of 0.03 J/cm<sup>2</sup> of UVB and the concentration of 30 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were chosen, as well as the suitable exposure times for each further test.

#### 5. Quantitative analysis of cell death by apoptosis and necrosis

The evaluation of apoptosis and necrosis to FEPS cell line was realized according to [22]. FEPS cells were analyzed after 24 and 48 hours from the exposure to UVB or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The 96-well plates were centrifuged (1500 rpm; 5 min) and 100 µL of medium were removed from each well before running the analyses. Subsequently, 2 µL of acridine orange fluorescent (100µg/mL) and ethidium bromide (100µg/mL) staining solutions (proportion of 1:1) were directly added in the well to be analyzed. The evaluation of cell death responses was realized based on photo-documented areas from each well (400X magnification) using a fluorescence microscope (Olympus IX81). Data were expressed in relative percentage compared with the total number of cells visualized in the photo-documented area. The cells were classified according to the modified method of [22] considering viable the cells presenting green stained nucleus, while those evincing orange stained nucleus with fragmented chromatin and green

cytoplasm were considered apoptotic. Cells with uniformly orange stained nucleus were considered necrotic.

## 6. Evaluation of reactive oxygen species (ROS)

The UVB or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments capability of the to induce ROS production in FEPS cell line was evaluated after 24h of exposure to these agents. The method used was of generating ROS by heating the fluorescent compound H<sub>2</sub>DCF-DA at 37°C for 1h and 30 min, consequently generating a kinetic numerical measure of fluorescence. This experiment was analyzed in a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer), using excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively. ROS levels were expressed in terms of fluorescence area, after fitting fluorescence data to a second order polynomial and integrating between 0 and 90 min in order to obtain its area.

## 7. Data analysis

Three independent experiments were realized for all analyses and at least triplicates from the samples were used. All results were expressed as mean  $\pm$  standard error, using one-way ANOVA followed by Tukey's test and significance level of 0.05% ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

The MDR FEPS cell line sensibility to UVA and UVB radiation, and to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, was evaluated by cell viability, cell death and reactive oxygen species (ROS) generation. The non-MDR K562 cell line was also evaluated intending to sustain comparative parameters. The cell line K562 was shown to be sensitive to all UVA radiation doses

immediately after exposition (0h), exhibiting decrease in the number of viable cells and cell viability (Figure 1A and C). Also, the MDR FEPS cell line presented a drop in the number of viable cells, when compared with the control group, after 24h from UVA exposure in all tested doses (Figure 1B). On the other hand, no cell viability reduction was observed, indicating only proliferation inhibition (Figure 1D). Trindade and collaborators [11] have also demonstrated a similar result in K562-Lucena 1, evincing that the MDR cell line was more resistant to UVA radiation when compared with the parental K562 cell line, which was sensitive since the first day of exposure.

Once the well-known main products of UVA radiation are the reactive oxygen species (ROS), such singlete oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) and the hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [16], Trindade and collaborators [11] have also tested the sensibility of both cell lines to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Once again, the MDR K562-Lucena1 cell line presented higher resistance than K562, maintaining an elevated cell viability when challenged with high concentrations (from 10 to 80 mM).

In the present work, the sensibility to  $\text{H}_2\text{O}_2$  was also tested in K562 and FEPS cells. The K562 cell line presented a reduction in the number of viable cells after 24h from  $\text{H}_2\text{O}_2$  exposure for all tested concentrations (Figure 2A), and reduction in the cell viability after 24h (Figure 2C) for the two higher concentrations (30 e 40 mM). On the other hand, FEPS cell line has demonstrated a diminishing in the number of viable cells, when compared with the control group, at the concentrations of 30 and 40 mM after 48h, and at the concentration of 20 mM, only 96h after treatment (Figure 2B). The drop in cell viability was observed only at the concentration of 40 mM after 72h from the exposure (figure 2D), indicating that  $\text{H}_2\text{O}_2$  was able to inhibit the cell proliferation at the concentrations of 20 and 30 mM and cause cytotoxicity only at the concentration of 40 mM in FEPS cell line.



As for cell death responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 24 and 48h from exposure, no significant differences were observed in the percentage of cell death by apoptosis or necrosis, when compared with the control group, for MDR FEPS cell line. The same was observed in the percentage of viable cells (Figure 4C and 4D), supporting the results obtained for the number of viable cells and cell viability observed in the present work. These data show that FEPS also is more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than K562. The absence of cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in FEPS can be supported by the work of Yamada and collaborators [23], when it was shown that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistant human leukemic cells (HP50-2 and HP100-1), present a higher expression of catalase, glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) when compared with the non-resistant cell line HL-60.

Indeed, many authors have been reporting that MDR are shown more resistant to oxidative agents. Votto and collaborators [12], while testing the toxin microcystin, that induced oxidative stress in the cells, have observed that MDR K562-Lucena 1 cells were more resistant than non-MDR K562 cells. This finding agree with the results shown by Trindade and collaborators [11], where UVA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> itself, the agents responsible for inducing oxidative stress, have caused the greater effect on the non-resistant K562 cell line. Both responses can be justified by the capability of MDR cells to develop a more efficient antioxidant system than that presented in MDR K562 cells, with a high catalase activity in K562-Lucena 1 cell line [11, 12].

According to this, no significant difference was found in the level of reactive oxygen species in the MDR FEPS cell line after 24h from exposure to 30mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 5B). These results suggest that FEPS cell line, similarly to K562-Lucena1, might probably present a high catalase activity, allowing a better protection against

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, as afore mentioned, in FEPS experiments presented here, the concentration of 40 mM was cytotoxic, and the concentrations of 20 and 30mM were able to inhibit proliferation. These findings support the hypothesis that MDR FEPS cell line might present higher antioxidants levels than K562 cell line, but FEPS and K562-Lucena 1 may present different types of intracellular defense mechanisms, especially because K562-Lucena 1 was resistant even when exposed to higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, up to 80mM, which is directly related to catalase activity observed for this cell line (Trindade *et. al.*, 1999).

In this sense, it is important to consider that FEPS cells line have, besides a high expression of ABCB1, an elevated expression of ABCC1, which is not overexpressed in K562-Lucena1 cell line [13]. This protein mainly transports GSH conjugated compounds by the antioxidant enzyme GST [24]. Thus, it can be suggested that FEPS cell line needs to demand energy to synthesize not only catalase, but also high GST levels.

Additionally, Acharya & Sahoo [25] have studied the relation between the redox imbalance and resistance to Imatinib chemotherapeutic. These authors have shown that K562R Imatinib resistant leukemic cells presented higher expression of the antioxidant enzymes SOD and catalase, when compared with K562 cell line. Therefore, the redox buffering of these enzymes can be considered the first defense mechanism of cancerous cells submitted to stress induced by ROS [25]. Beck and collaborators [26], using non-resistant cell lines, have demonstrated that K562 actually presents a lower catalase activity, when compared with the activity observed in non-tumoral leukocytes. Both studies from Acharya & Sahoo [25] and Beck and collaborators [26], support the

hypothesis that resistant cell lines might present more efficient antioxidant strategies than the non-MDR cell lines.

Concerning the UVB radiation sensibility, the K562 cell line was shown sensitive to all tested doses, 24h after exposure, by reducing the number of viable cells and viability, hence indicating cytotoxicity (Figures 3A and 3C). The same occurred in the MDR FEPS cell line, in which was observed significant drop on cell viability since 24h for all UVB doses tested (Figure 3D). For cell death results was demonstrate a significant increase, mostly by apoptosis, in MDR FEPS cell line 24h after exposure to UVB radiation, although these cells have also presented significant percentage of necrotic cells. Consequently, there was a great reduction in the percentage of viable cells (Figure 4A). After 48h from exposure to UVB, once again a significant difference was observed in the percentage of necrotic and apoptotic cells when compared with the control group. However, the number of necrotic cells was higher (Figure 4B). The elevated apoptosis induced by UVB observed in FEPS was expected, once this irradiation wavelength (290 a 320 nm) induce mutagenic damages in the DNA molecule [21]. Thus, UVB presents as a great death agent inductor in MDR FEPS cell line. The high cytotoxicity observed in the viability curves (figure 3D) presented here, supports this result.

Similar results were also observed by Trindade and collaborators [11] for K562 and MDR K562-Lucena 1 cell lines, when both were shown sensitive to an UVB dose of  $0.03 \text{ J/cm}^2$ . Considering that both resistant erythroleukemic cell lines, K562-Lucena 1 and FEPS, were sensitive to UVB action, it can be suggested that this agent might be able to transpose the MDR phenotype in FEPS. Besides that, with the results obtained in this experiments, the hypothesis that harmful agents to the DNA integrity

might allow the transposition of resistance in tumoral cells can be reinforced. The key to cancer treatment might be enclosed in these set of data, considering that DNA agents massively induce apoptosis, even in MDR cell lines. Indeed, some authors have been speculating that agents directly striking on the DNA might be able to sensitize tumoral MDR cells similarly to non-MDR [11,15].

Regarding ROS increment in FEPS cell line, a significant increase in reactive oxygen species was found after 24 h from exposure to 0,03 J/cm<sup>2</sup> of UVB (Figure 5A). Besides that, the UVB could have a combined effect of these ROS generated added the direct damages on the DNA. Mainly alterations in the binding of nucleotide bases such as pyrimidine dimers formation [28]. These alterations might lead the cells to an apoptotic cascade, which justifies a higher cytotoxic induction and greater drop in FEPS cell proliferation when challenged by this agent. Also, it supports the results of cell death presented here, in which FEPS clearly demonstrated apoptosis when submitted to UVB.

Higher UVB efficiency it also applies to K562, which although it has presented cytotoxicity when challenged by all agents, it also was more sensitized by UVB. Therefore, DNA agents might cause higher cytotoxicity and induce an apoptotic cascade in a more effective manner than agents with other cell targets, independently if the exposed cell lines are MDR or non-MDR.

Therefore, the results of this study suggest that no relation is found between the MDR phenotype and the target responsible for inducing resistance in FEPS cell line. Because UVB was shown non-specific by sensitizing both cell lines MDR (Lucena and FEPS) that developed resistance by different mechanisms. Thus, it might be concluded

that agents acting directly on the DNA molecule are more effective for the MDR phenotype transposition in chronic myeloid leukemic cell lines considered in this study.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Vivian Rumjanek (Tumoral Immunology Laboratory at the Medical Biochemistry Institute of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil) for providing and allowing the use of the K562 and FEPS cell lines. This work was funded by Programa Nacional de Cooperação Acadêmica da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROCAD-CAPES). F.S.S. received a graduate fellowship from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

#### REFERENCES

- [1] F. Albano, A. Zagaria, L. Anelli, et al., Gene expression profiling of chronic myeloid leukemia with variant t(9;22) reveals a different signature from cases with classic translocation. *Molecular Cancer*. 12 (2013) 1-5.
- [2] S. Marcé, L. Zamora, M. Cabezón, et al., Frequency of ABL gene mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib and results of treatment switch to second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Medicina Clinica*. 141 (2013) 95-99.

[3] V.M. Rumjanek, R.S. Vidal, R.C. Maia, Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines? *Bioscience Reports*. 33 (2013) 875-888.

[4] M.M. Zaharieva, G. Amudov, S.M. Konstantinov, et al., *Modern Therapy of Chronic Myeloid Leukemia*. Intech., Bulgaria, 2013, pp. 227-244.

[5] M.W.N. Deininger, J.M. Goldman, J.V. Melo, The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 96 (2000) 3343-3355.

[6] R. Katso, K. Okkenhaug, K. Ahmadi, et al., Cellular Function of Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17 (2001) 615-675.

[7] R.L. Fine, T.C. Chambers, C.W. Sachs, P-Glycoprotein, Multidrug Resistance and Protein Kinase C. *Stem Cells*. 14 (1996) 47-55.

[8] M.M. Gottesman, I. Pastan, Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 385-427.

[9] M.M. Gottesman, Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Med.* 53 (2002) 615-627.

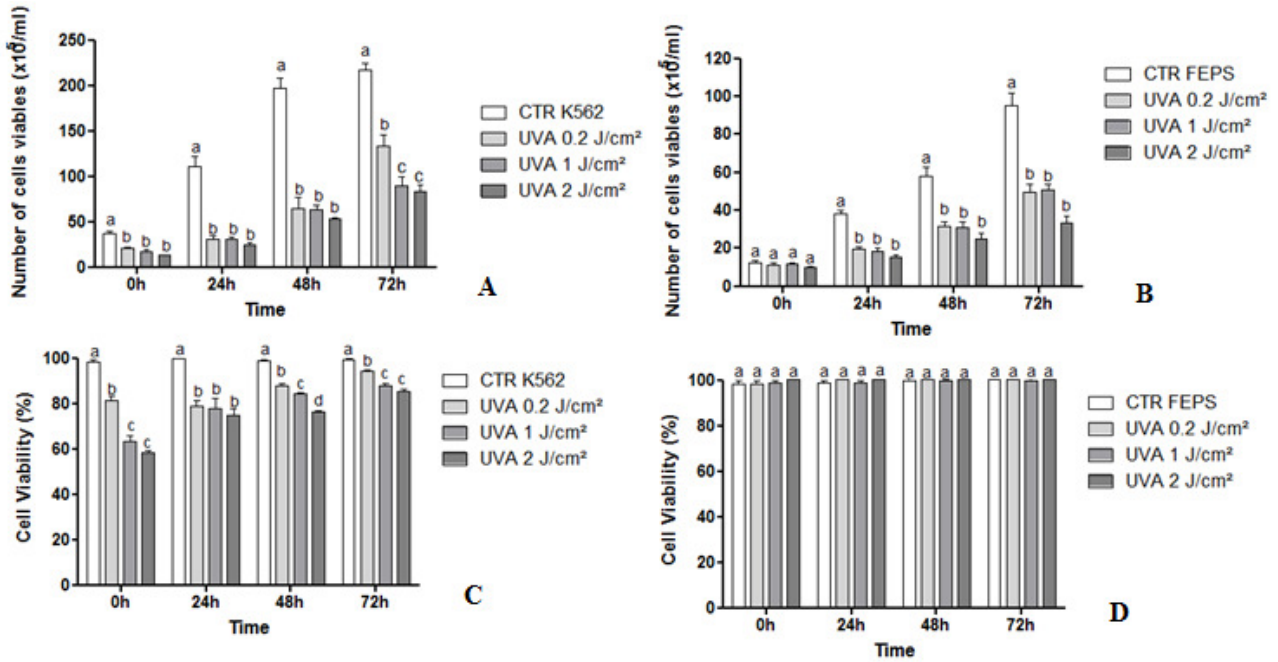
- [10] M. Carret-Dias, A.P. Votto, A.P. de S. Filgueira, et al., Anti-MDR and antitumoral action of acetylsalicylic acid on leukaemic cells. *Bioscience Reports*. 31 (2011) 391-398.
- [11] G.S. Trindade, M.A.M. Capella, L.S. Capella, et. al., Differences in Sensitivity to UVC, UVB and UVA Radiation of a Multidrug-Resistant Cell Line Overexpressing P-Glycoprotein. *Photochemistry and Photobiology*. 69 (1999) 694-699.
- [12] A.P.S. Votto, V.P. Renon, J.S. YUNES, et. al., Sensivity to microcystitis: A comparative study in human cell lines with and without multidrug resistance phenotype. *Cell Biology International*. 31 (2007) 1359-1366.
- [13] N. Daflon-Yunes, F.E. Pinto-Silva, R.S. Vidal, et. al., Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. *Molecular Cell Biochemistry*. (2013) 1-13.
- [14] V.M. Rumjanek, G.S. Trindade, K. Wagner-Souza, et. al., Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An. Acad. Bras. Ci.* (2001) 73 57-69.
- [15] A.P.S. Votto, D.M.V.B. Filgueira, R.M. Clementin, et. al., Toxicity mechanisms of onion (*Allium cepa*) extracts and compounds in multidrug resistant erythroleukemic cell line. *Biol. Res.* 43 (2010) 429-437.

- [16] J.P. McCormick, J.R. Fisher, J.P. Pachlatko, et. al., Characterisation of a cell-lethal product from the photooxidation of tryptophan: hydrogen peroxide. *Science*. 191 (1976) 468-669.
- [17] J. Chamberlain, S.H. Moss, Lipid Peroxidation and Other Membrane Damage Produced in *Escherichia coli* K1060 by near-UV Radiation and Deuterium Oxide. 45 (1987) 625-630.
- [18] H. Black, Potencial involvement of free radical cutaneous damage. *Photochemistry and Photobiology*. 46 (1987) 213-221.
- [19] F.R. de Gruijl, Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods in Enzimology*. 319 (2000) 359-366.
- [20] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research*. 571 (2005) 3-17.
- [21] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, et. al., Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *PNAS*. 103 (2006) 13765-13770.
- [22] D. Ribble, N.B. Goldstein, D.A. Norris, et. al., A simple technique for quantifying apoptosis in 96-Well plates. *BMC Biotechnology*. 112 (2005) 361-368.

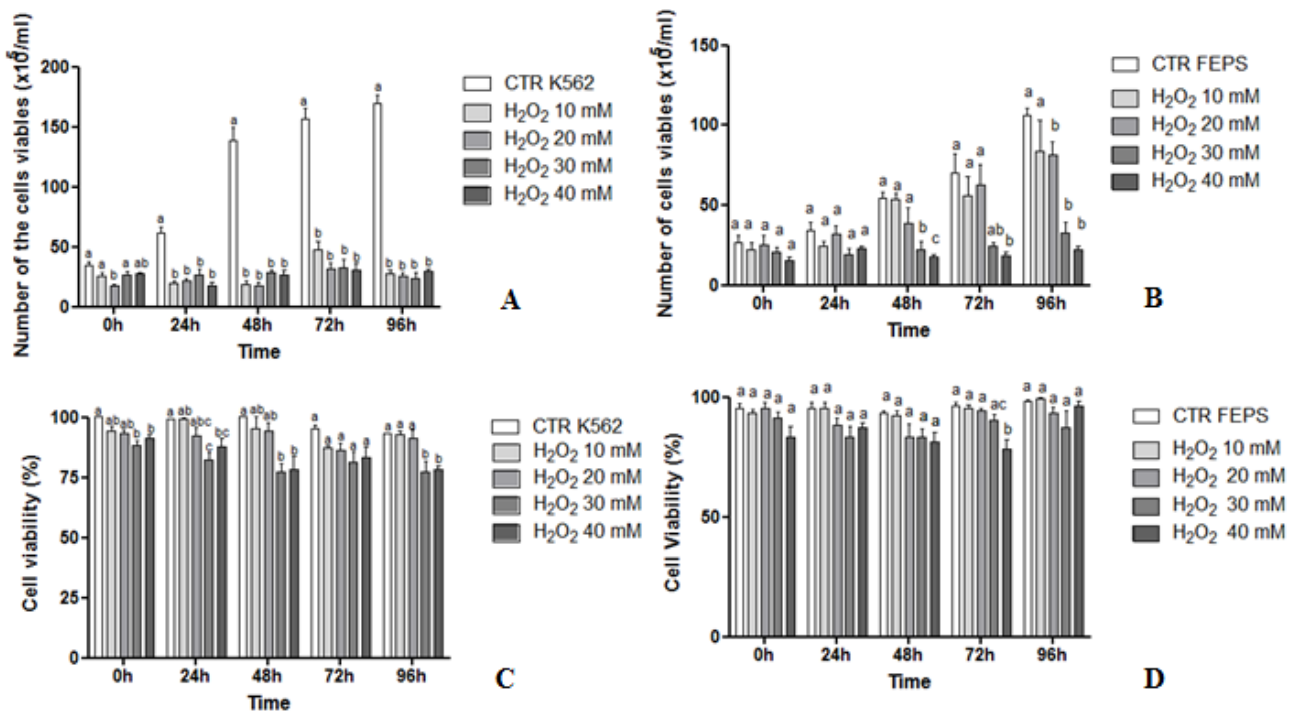


- [23] M. Yamada, K. Hashinaka, J. Inazawa, et. al., Expression of Catalase and Myeloperoxidase Genes in Hydrogen Peroxide-Resistant HL-60 Cells. *DNA and Cell Biology*. 10 (1991) 735-742.
- [24] M. Muller, C. Meuer, G.J.R. Zaman, et. al., Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 13033-13037.
- [25] S. Acharya, S.K. Sahoo, Exploitation of redox discrepancy in leukemia cells by a reactive oxygen species nanoscavenger for inducing cytotoxicity in imatinib resistant Cells. *Journal of Colloid and Interface Science*. 467 (2016) 180-191.
- [26] R. Beck, R.C. Pedrosa, N. Dejeans, et. al., Ascorbate/menadione-induced oxidative stress kills cancer cells that express normal or mutated forms of the oncogenic protein Bcr-Abl. An in vitro and in vivo mechanistic study. *Invest New Drugs*. 29 (2011) 891-900.
- [27] K. Scharffetter-Kochanek, P. Brenneisen, J. Wenk, et. al., Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experimental Gerontology*. 35 (2000) 307-316.
- [28] J-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 63 (2001) 88-102.

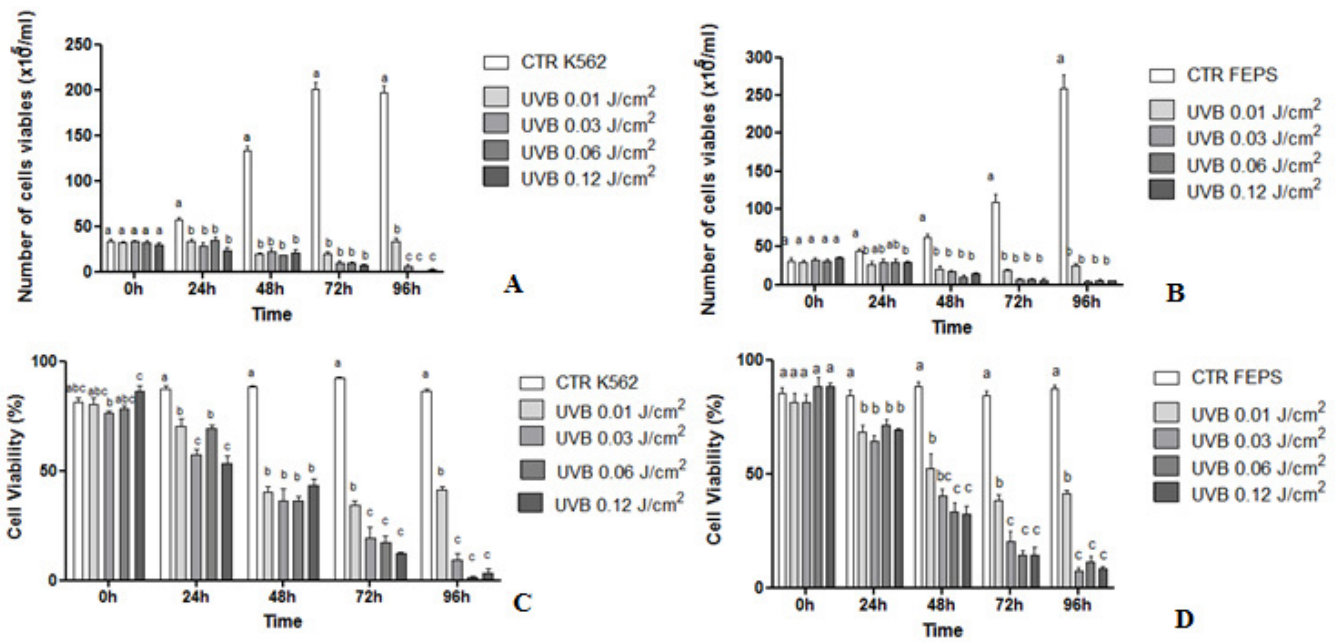
## FIGURES



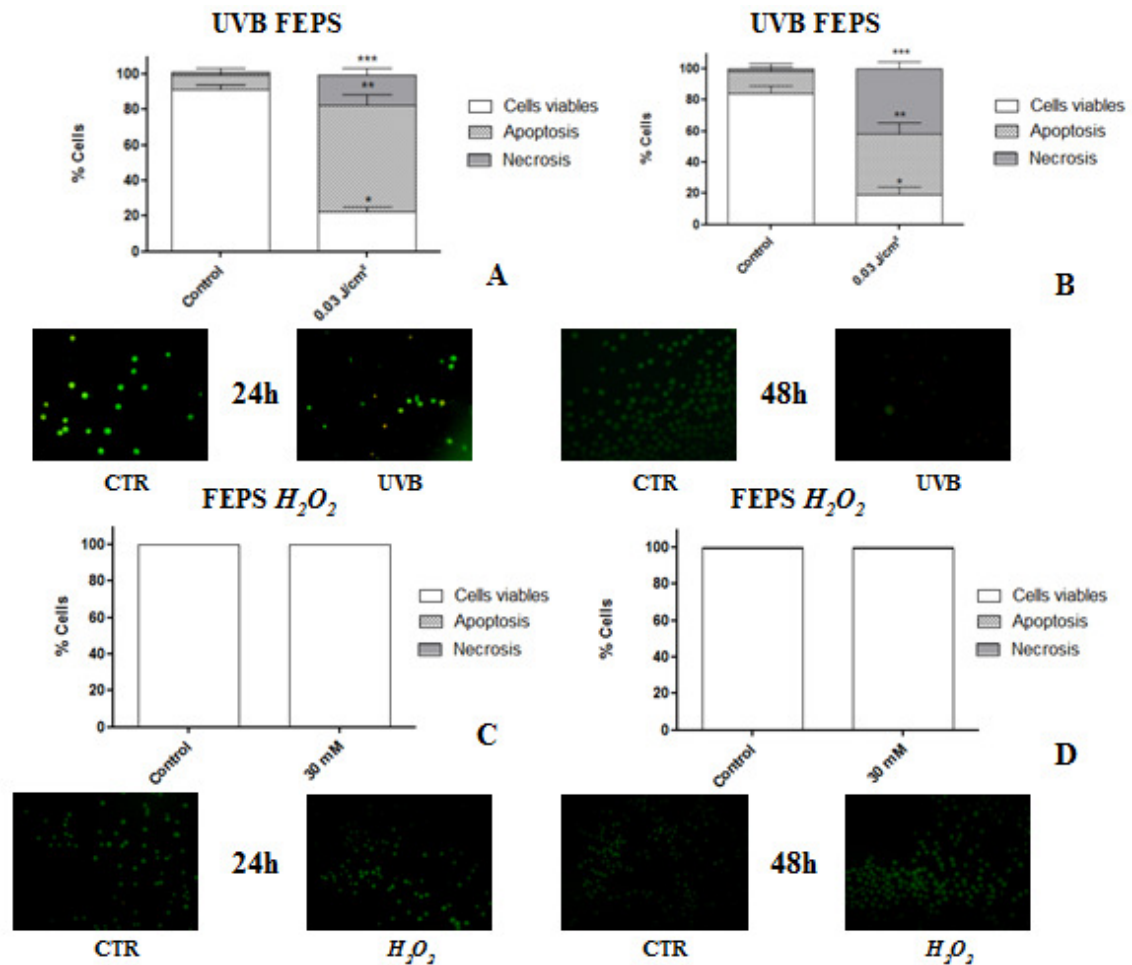
**Figure 1.** Cell viability curves from K562 non-MDR and FEPS MDR cell lines exposed to UVA radiation (doses de 0.2; 1; e; 2 J/cm<sup>2</sup>). (A) and (B) represent the number of viable K562 and FEPS cells (x10<sup>5</sup>/ml); (C) and (D) represent the cell viability of K562 and FEPS (%). Results are expressed as mean ± standard error, with p<0.05 and accessed by trypan blue exclusion method, from 0 to 96h after exposure.



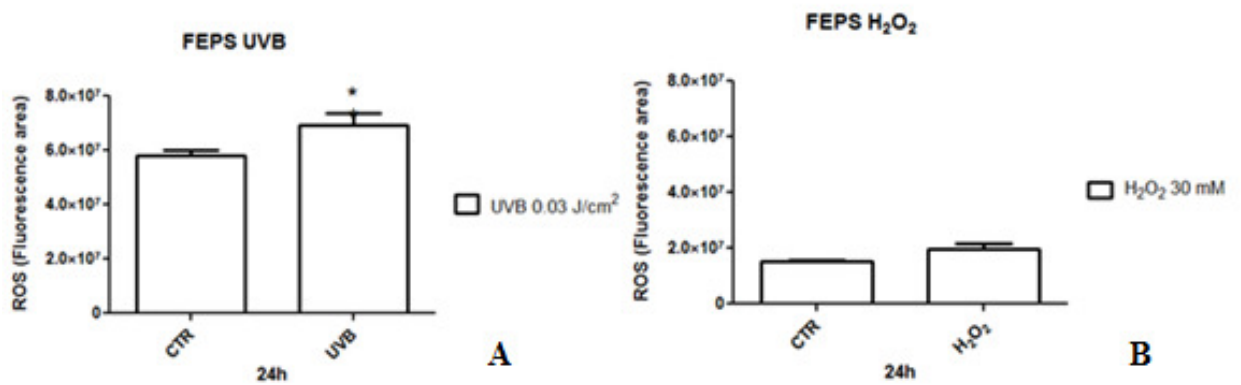
**Figure 2.** Cell viability curves from K562 non-MDR and FEPS MDR cell lines exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentrations of 10; 20; 30 and 40 mM). (A) and (B) represent the number of viable K562 and FEPS cells ( $\times 10^5/\text{ml}$ ); (C) and (D) represent the cell viability of K562 and FEPS (%). Results are expressed as mean  $\pm$  standard error, with  $p < 0.05$  and accessed by trypan blue exclusion method, from 0 to 96h after exposure.



**Figure 3.** Cell viability curves from K562 non-MDR and FEPS MDR cell lines exposed to UVB radiation (doses of 0.01; 0.03; 0.06 and 0.12 J/cm<sup>2</sup>). (A) and (B) represent the number of viable K562 and FEPS cells (x10<sup>5</sup>/ml); (C) and (D) represent the cell viability of K562 and FEPS (%). Results are expressed as mean ± standard error, with p<0.05 and accessed by trypan blue exclusion method, from 0 to 96h after exposure.



**Figure 4.** Cell death of MDR FEPS cell line exposed to UVB radiation (dose of 0.03 J/cm<sup>2</sup>) and to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentration of 30 mM). Percentage (%) of viable cells, apoptosis and necrosis exposure to UVB radiation after 24h (A) and 48h (B). Percentage (%) of viable cells, apoptosis and necrosis exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 24h (C) and 48h (D). \* show significant difference on percentage of viables cells between exposed cells and controls; \*\* show significant difference on percentage of apoptotic cells and; \*\*\* show significant difference on percentage of necrotic cells. Results are expressed as mean ± standard error, with p<0.05 and accessed by fluorescence microscopy using ethidium bromide (EB) and acridine orange (AO) staining (proportion 1:1).



**Figure 5.** Reactive oxygen species (ROS) generation in MDR FEPS cell line exposed to UVB radiation (dose of 0.03 J/cm<sup>2</sup>) and to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentration of 30mM). (A) ROS fluorescence area obtained from viable FEPS cells after exposure to UVB radiation; (B) ROS fluorescence area obtained from viable FEPS cells after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results are expressed as mean ± standard error, with p<0.05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

Através de testes de viabilidade celular, morte celular e avaliação na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) avaliamos a sensibilidade da linhagem MDR FEPS às radiações UVA e UVB, e ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A linhagem não MDR K562 também foi avaliada, a fim de sustentar parâmetros comparativos. Quanto às respostas encontradas, a linhagem K562 mostrou-se sensível a todas as doses de radiação de UVA imediatamente após a exposição (0h), exibindo queda no número de células viáveis e na viabilidade celular (Figura 1A e C). Enquanto a linhagem MDR FEPS demonstrou queda no número de células viáveis em relação ao controle a partir de 24h após exposição à radiação UVA, para todas as doses testadas (Figura 1B). Porém, nenhuma redução na viabilidade celular foi observada (Figura 1D), indicando apenas inibição de proliferação. Trindade *et. al.*, 1999 também mostrou um resultado semelhante em K562-Lucena1, onde a linhagem MDR foi mais resistente à radiação UVA do que a linhagem parental K562, a qual foi sensível desde o primeiro dia de exposição.

Como é conhecido, um dos principais produtos da radiação UVA são as espécies reativas de oxigênio (ERO) como oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (McCormick *et. al.*, 1976), Trindade e colaboradores também testaram a sensibilidade das duas linhagens ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Novamente a linhagem MDR K562-Lucena1 apresentou maior resistência do que a K562, mantendo uma alta viabilidade celular frente a concentrações elevadas (de 10 a 80 mM).

Nós também testamos a sensibilidade das células K562 e FEPS ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Neste estudo, a linhagem K562 apresentou redução no número de células viáveis a partir de 24h após exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para todas as concentrações testadas (Figura 2A). Entretanto apenas as duas maiores concentrações (30 e 40 mM) mostram efeito citotóxico a partir de 24h, uma vez que houve também redução da viabilidade celular (Figura 2C). Já na linhagem FEPS, foi observada uma diminuição no número de células viáveis em relação ao controle, nas concentrações de 30 e 40 mM a partir de 48h e na concentração de 20 mM somente em 96h após o tratamento (Figura 2B). A diminuição da viabilidade celular foi observada apenas na concentração de 40 mM após 72h da

exposição (Figura 2D). Isto indica que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi capaz de inibir proliferação celular nas concentrações de 20 e 30 mM, e causar citotoxicidade apenas na concentração de 40 mM na linhagem FEPS. Estes resultados mostram que a FEPS foi mais resistente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que a K562.

Tanto em nossa pesquisa, quanto na pesquisa de Trindade *et. al.*, 1999, linhagens MDR mostraram-se mais resistentes à UVA e ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que pode indicar que estas células podem apresentar um aporte de defesas antioxidantes maior do que linhagens não-MDR, como a K562. Uma destas defesas, elucidadas em Lucena por estes mesmos autores, foi um aumento na atividade de catalase, a enzima responsável por transformar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerado por UVA, em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, o que sustenta essa hipótese. Nos estudos de Acharya & Sahoo 2016 foi investigada a relação entre o desbalanço redox e a resistência a Imatinibe. Este autor elucidou que células leucêmicas resistentes ao Imatinibe - K562R mostraram maior expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase, em comparação à linhagem K562. Desta forma, o tamponamento redox destas enzimas pode ser considerado como o primeiro mecanismo de defesa de células cancerosas frente ao estresse induzido por ROS (Acharya & Sahoo 2016). Em linhagens não resistentes, Beck *et. al.*, 2011 elucidou que K562 possui de fato uma menor atividade de catalase, quando comparada a atividade observada em leucócitos não tumorais. Em seu estudo, ambas as linhagens foram expostas aos oxidantes ascorbato e menadiona combinados. Como visto, tanto as pesquisas de Acharya & Sahoo 2016, quanto de Beck *et. al.*, 2011, respaldam que as linhagens resistentes devam possuir estratégias antioxidantes mais eficazes que linhagens não MDR.

Em relação à sensibilidade a radiação UVB, a linhagem K562 mostrou-se sensível a todas as doses testadas, a partir de 24h após a exposição, reduzindo o número de células viáveis e sua viabilidade, indicando citotoxicidade (Figuras 3A e 3C). O mesmo ocorreu na linhagem MDR FEPS, onde também foi observada significativa queda na viabilidade celular a partir de 24h, para todas as doses de UVB testadas (Figura 3D). Portanto, a radiação UVB foi capaz de sensibilizar a linhagem FEPS, apesar de seu fenótipo MDR. Resultados semelhantes também foram observados por Trindade *et. al.* (1999), para as linhagens K562 e MDR K562-Lucena1. No estudo citado, ambas as linhagens foram sensíveis a dose de 0,03 J/cm<sup>2</sup> de UVB, uma das doses em



que observamos efeito significativo na redução da viabilidade em nossa pesquisa. Considerando que ambas as linhagens eritroleucêmicas resistentes K562-Lucena1 e FEPS sofreram com a ação do UVB, sugerimos que este agente possa ser capaz de transpor o fenótipo MDR na FEPS.

De fato, nossos resultados mostram um aumento significativo na morte celular, principalmente por apoptose na linhagem MDR FEPS após 24 h de exposição à radiação UVB, embora estas células tenham mostrado também significativa porcentagem de células em necrose. Em consequência, houve uma elevada diminuição na porcentagem de células viáveis (Figura 4A). Após 48h de exposição à radiação UVB, houve novamente diferença significativa na porcentagem daquelas em apoptose e necrose em relação ao controle. Entretanto, o número de células em necrose foi maior (Figura 4B).

Após 24h e 48h de exposição ao  $H_2O_2$ , não foram observadas diferenças significativas no percentual de morte celular por apoptose ou necrose quando comparado com o controle para a linhagem MDR FEPS. Bem como quaisquer diferenças na porcentagem de células viáveis (Figura 4C e D), o que reforça os resultados encontrados para o número de células viáveis e viabilidade celular observados neste trabalho. O fato de  $H_2O_2$  não ter induzido morte celular na FEPS pode ser respaldado pela pesquisa de Yamada *et. al.*, 1991. Estes autores, revelaram que células de leucemia humana resistentes à  $H_2O_2$  (HP50-2 e HP100-1) possuem uma maior expressão de catalase, glutathiona peroxidase (GPX) e SOD que a linhagem não resistente HL-60. Considerando que a FEPS também possua mecanismos de defesa semelhantes, sua resistência à morte celular por apoptose frente ao  $H_2O_2$  é totalmente justificada.

A elevada taxa apoptótica vista na FEPS induzida por UVB era esperada, pelo fato desta faixa de radiação (290 a 320 nm), induzir danos mutagênicos à molécula de DNA (Mouret *et. al.*, 2006). UVB, portanto, mostra-se como um ótimo agente indutor de morte celular na linhagem MDR FEPS. A elevada citotoxicidade observada em nossas curvas de viabilidade (Figura 3D), reforça ainda mais este resultado. Além disso, com a resposta deste experimento, reafirmamos a hipótese de que atuantes nocivos à integridade de DNA possam possibilitar a transposição de resistência em células tumorais. O que pode se revelar como a chave para a evolução do tratamento do

câncer, considerando que atuantes em DNA induzem apoptose massivamente, inclusive em linhagens MDR. De fato, alguns autores tem inferido que agentes que ataquem diretamente o DNA sejam capazes de sensibilizar células tumorais MDR de forma semelhante as não MDR (Trindade *et. al.*, 1999; Votto *et. al.*, 2010).

Em contrapartida, autores tem relatado que linhagens MDR se mostram mais resistentes a agentes oxidativos. Votto *et. al.*, 2007, testando a toxina microcistina, a qual induziu estresse oxidativo nas células, observaram que as células MDR K562-Lucena1 se mostraram mais resistentes do que as não MDR K562. Este achado corrobora com o demonstrado por Trindade *et. al.*, 1999, onde o agente indutor de radicais livres UVA, e o próprio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causaram maior efeito na linhagem não resistente K562. Ambas as respostas podem ser justificadas, pelas células MDR terem sido capazes de desenvolver um sistema antioxidante mais eficiente que as células não MDR K562, com uma alta atividade de catalase na linhagem K562-Lucena1 (Trindade *et. al.*, 1999 e Votto *et. al.*, 2007).

Para verificar tal possibilidade, foi analisado o nível de ERO na linhagem FEPS expostas à radiação UVB e ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Foi encontrado um significativo aumento no nível de espécies reativas de oxigênio na linhagem MDR FEPS após 24 h de exposição à dose de 0,03 J/cm<sup>2</sup> de radiação UVB (Figura 5A). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa no nível de espécies reativas de oxigênio na linhagem MDR FEPS após 24h da exposição a 30 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 5B). Estes resultados permitem sugerir que a linhagem FEPS, semelhantemente a K562-Lucena1, tenha provavelmente também uma alta atividade de catalase, o que possibilita uma maior proteção ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, como mencionado acima, em nossos experimentos com a FEPS, a concentração de 40 mM mostrou-se citotóxica, e as concentrações de 20 e 30 mM foram capazes de inibir proliferação. Estes achados sustentam a suposição de que a linhagem MDR FEPS deva possuir aportes antioxidantes maiores que a linhagem K562, frente a agentes oxidantes, mas que FEPS e K562-Lucena1 podem apresentar tipos diferentes de mecanismos de defesa intracelulares. Especialmente porque K562-Lucena1 mostrou-se resistente mesmo a doses mais altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de até 80 mM, o que está diretamente relacionado à alta atividade de catalase observada nesta linhagem (Trindade *et. al.*, 1999).

Neste sentido, é importante considerar que a linhagem FEPS possui, além da alta expressão de ABCB1, uma expressão elevada de ABCC1, a qual não está superexpressa na linhagem K562-Lucena1 (Daflon-Yunes *et. al.*, 2013). Esta proteína transporta preferencialmente compostos conjugados com GSH pela enzima antioxidante GST (Muller *et. al.*, 1994). Assim, é possível sugerir que a linhagem FEPS precise demandar energia para sintetizar não apenas catalase, mas também altos níveis de GST.

Em relação ao aumento de ERO causado pela radiação UVB, pode-se considerar que as espécies reativas de oxigênio principalmente geradas por esta faixa de radiação são além do próprio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do oxigênio singlete, radicais hidroxila (Scharffetter-Kochanek *et. al.*, 2000), o que explicaria a incapacidade da célula em evitar o estresse oxidativo da mesma forma que consegue ao combater o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A radiação UVB além de gerar ERO, é absorvido de forma direta pela molécula de DNA, induzindo alterações nas ligações entre bases, como a formação de dímeros de pirimidina (Ravanat *et. al.*, 2001). Estas alterações podem levar as células à cascata apoptótica. O que justifica uma maior indução na citotoxicidade e maior queda na proliferação celular da FEPS, frente a este agente. Além de corroborar com nossos resultados de morte celular, onde a FEPS visivelmente mostrou ocorrência de apoptose frente à UVB.

Uma maior eficácia de UVB também se aplica à K562, que embora tenha apresentado citotoxicidade a todos os agentes, também se mostrou mais sensibilizada por UVB. Desta forma, agentes que atuem em DNA parecem exercer maior citotoxicidade e induzirem uma cascata apoptótica de forma mais efetiva que agentes com outros alvos celulares. Independentemente das linhagens expostas serem MDR ou não MDR.

Em contrapartida, a radiação UVA e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não foram citotóxicos para a FEPS. Portanto, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ter sido neutralizado pela catalase na FEPS. A mesma justificativa se aplica a resposta observada após a exposição da FEPS diretamente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estes achados além de indicarem a possibilidade de linhagens resistentes desenvolverem estratégias antioxidantes mais precisas que linhagens não resistentes, frente a agentes indutores de estresse oxidativo, possibilitam a visão de que atuantes

em DNA, como radiação UVB possam oferecer uma alternativa mais eficaz na transposição do fenótipo MDR em linhagens eritroleucêmicas.

Desta forma, os resultados obtidos para o agente UVB mostraram que não há relação entre o fenótipo MDR e o alvo indutor de resistência na linhagem FEPS. Isso porque o UVB mostrou-se ser inespecífico, sensibilizando linhagens celulares que desenvolveram resistência por mecanismos diferentes (K562-Lucena1 e FEPS). Com isso, concluímos que agentes atuantes diretos na molécula de DNA são eficazes em transpor o fenótipo MDR nas linhagens de leucemias mielóides crônicas estudadas.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

ACHARYA, S.; SAHOO, S.K. Exploitation of redox discrepancy in leukemia cells by a reactive oxygen species nanoscavenger for inducing cytotoxicity in imatinib resistant Cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 467, p. 180-191, 2016.

AGGERHOLM, A.; GRONBACK, K.; GULDBERG, P.; HOKLAND, P. Mutational analysis of the tumour suppressor gene MMAC1/PTEN in malignant myeloid disorders. **Eur. J. Haematol.**, v. 65, p. 109-113, 2000.

AHUJA, H.; BAR-ELI, M.; ARLIN, Z. The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 2042-2047, 1991.

ALBANO, F.; ZAGARIA, A.; ANELLI, L.; COCCARO, N.; IMPERA, L.; MINERVINI, C.F.; ROSSI, A.R.; TOTA, G.; CASIERI, P.; SPECCHIA, G. Gene expression profiling of chronic myeloid leukemia with variant t(9;22) reveals a different signature from cases with classic translocation. **Molecular Cancer**, v. 12, p. 1-5, 2013.

BECK, R.; PEDROSA, R.C.; DEJEANS, N.; GLORIEUX, C.; LEVÊQUE, P.; GALLEZ, B.; TAPER, H.; EECKHOUDT, S.; KNOOPS, L.; CALDERON, P.B.; VERRAX, J. Ascorbate/menadione-induced oxidative stress kills cancer cells that express normal or mutated forms of the oncogenic protein Bcr-Abl. An in vitro and in vivo mechanistic study. **Invest New Drugs**, v. 29, p. 891-900, 2011.

BEER, J.Z.; OLVEY, K.M.; MILLER, S.A.; THOMAS, D.P.; GODAR, D.E. Non-nuclear damage and cell lysis are induced by UVA, but not UVB or UVC, radiation in three strains of L5178Y cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, p. 676-681, 1993.

BELLAMY, W.T. P-Glycoproteins and Multidrug Resistance. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 36, p. 161-183, 1996.

BLACK, H. Potencial involvement of free radical cutaneous damage. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, p. 213-221, 1987.

BLACK, S.M. & WOLF, R. The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. **Pharmac. Ther**, v. 51, p. 139-154, 1991.

CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. **Mutation Research**, v. 571, p. 3-17, 2005.

CALABRETTA, B. & PERROTTI, D. The biology of CML blast crisis. **Blood**, v. 103, 4010-4022, 2004.

CARRETT-DIAS, M.; ALMEIDA, L.K.; PEREIRA, J.L.; ALMEIDA, D.V.; FILGUEIRA, D.M.V.B.; MARINS, L.F.; VOTTO, A.P.S.; TRINDADE, G.M. Cell differentiation and the multiple drug resistance phenotype in human erythroleukemic cells. **Leukemia Research**, v. 42, p. 13-20, 2016.

CARRET-DIAS, M.; VOTTO, A.P de S.; FILGUEIRA, D. de M.V.B.; ALMEIDA, D.V.; VALLOCHI, A.L.; D'OCA, M.G.M.; MARINS, L.F.; TRINDADE, G.S. Anti-MDR and antitumoral action of acetylsalicylic acid on leukaemic cells. **Bioscience Reports**, v. 31, p. 391-398, 2011.

CHENG, L.; LUO, S.; JIN, C.; MA, H.; ZHOU, H. ; JIA, L. FUT family mediates the multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt signaling pathway. **Cell Death and Disease**, v. 4, p. 1-12, 2013.

CLARK, E.A.; BRUGGE, J.S. Integrins and Signal Transduction Pathways: The Road Taken. **Science**, v. 268, p. 233-239, 1995.

DAFLON-YUNES, N.; PINTO-SILVA, F.E.; VIDAL, R.S.; NOVIS, B.F.; BERGUETTI, T.; LOPES, R.R.S.; POLYCARPO, C.; RUMJANEK, V.M. Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. **Molecular Cell Biochemistry**, p. 1-13, 2013.

De GRUIJL, F.R.; Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. **Methods in Enzimology**, v. 319, p. 359-366, 2000.

DEININGER, M.W.N.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, p. 3343-3355, 2000.

DI BACCO, A.; KEESHAN, K.; MCKENNA, S.L.; COTTER, T.G. Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Deregulation of Cell Growth and Apoptosis. **The Oncologist**, v. 5, p. 405-415, 2000.

DIFFEY, B.L. What is light? **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 18, p. 68-74, 2002.

DING, S.; CHAMBERLAIN, M.; MCLAREN, A.; GOH, L-B.; DUNCAN, I.; WOLF, CR. Cross-talk between signaling pathways and the multidrug resistant protein MDR-1. **British Journal of Cancer**, v. 85, p. 1175-1184, 2001.

DOLE, M.; NUNEZ, G.; MERCHANT, A.K. Bcl-2 Inhibits Chemotherapy-induced Apoptosis in Neuroblastoma. **Cancer Research**, v. 54, p. 3253-3259, 1994.

DOLPHIN D.; PULSON R.; AVRAMOVIĆ, O. (eds). Glutathione, v. [...], p. [...],1989.

Earth Observatory. Disponível em:<  
<http://www.earthobservatory.nasa.gov/Features/UVB/>>. Acesso em 22 de fevereiro de 2016.

FERNANDES, J.; WEINLICH, R.; CASTILHO, R.O.; KAPLAN, M.A.C.; AMARANTE-MENDES, G.P.; GATTASS, C.R. Pomolic acid triggers mitochondria-dependent apoptotic cell death in leukemia cell line. **Cancer Letters**, v. 219, p. 49-55, 2005.

FINE, R.L.; CHAMBERS, T.C.; SACHS, C.W. P-Glycoprotein, Multidrug Resistance and Protein Kinase C. **Stem Cells**, v. 14, p. 47-55, 1996.

FORD, J.M.; HAIT, W. N. Pharmacology of Drugs That Alter Multidrug Resistance in Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 42, p. 155-199, 1990.

GODAR, D.E. & LUCAS, A.D. Spectral dependence of UV-induced immediate and delayed apoptosis: The role of membrane and DNA damage. **Photochemistry and Photobiology**, v. 62, p. 108-113, 1995.

GOTTESMAN, M.M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. **Annu. Rev. Med**, v. 53, p. 615-627, 2002.

GOTTESMAN, M.M. & LING, V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research. **FEBS Letters**, v. 580, p. 998-1009, 2006.

GOTTESMAN, M.M. & PASTAN, I. Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. **Annu. Rev. Biochem**, v. 62, p. 385-427, 1993.

HIMES, R.H.; KERSEY, R.N.; HELLER-BETTINGER, I. Action of the Vinca Alkaloids Vincristine, Vinblastine, and Desacetyl Vinblastine Amide on Microtubules in Vitro. **Cancer Research**, v. 36, p. 3798-3802, 1976.

HU, Y, P.; ROBERT, J. Inhibition of protein kinase C in multidrug-resistant cells by modulators of multidrug resistance. **J. Cancer Res. Clin. Oncol**, v. 123, p. 201-210, 1997.

JIANG, Y.; RABBI, M.; KIM, M.; KE, C.; LEE, W.; CLARK, R.L.; MIECZKOWSKI, P.A.; MARSZALEK, P.E. UVA Generates Pyrimidine Dimers in DNA Directly. **Biophysical Journal**, v. 96, p. 1151-1158, 2009.

JOHANSSON, B.; FIORETOS, T.; MITELMAN, F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. **Acta Haematol**, v. 107, p. 76-94, 2002.

KANTHARIDIS, P.; EL-OSTA, S.; de SILVA, M.; LEE, G.; HU, X.F.; ZALCBERG, J. Regulation of MDR1 gene expression: emerging concepts. **Drug Resistance Updates**, v. 3, p. 99-108, 2000.

KATSO, R.; OKKENHAUG, K.; AHMADI, K.; WHITE, S.; TIMMS, J.; WATERFIELD, D. Cellular Function of Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 17, p. 615-675, 2001.

KIM, E.S.; PARK, S.J.; GOH, M-J.; NA, Y-J.; JO, D.S.; JO, Y.K.; SHIN, J.H.; CHOI, E.S.; LEE, H-K.; KIM, J-Y.; JEON, H.B.; KIM, J.C.; CHO, D-H. Mitochondrial dynamics regulate melanogenesis through proteasomal degradation of MITF via ROS-ERK activation. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, p. 1051-1062, 2014.

KOHNO, K.; SATO, S-I.; TAKANO, H.; MATSUO, K-I.; KUWANO, M. The direct activation of human multidrug gene (MDR1) by anticancer agents. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 165, p. 1415-1421, 1989.

KOSMIDER, B.; OSIECKA, R.; CIESIELSKA, E.; SZMIGIERO, L.; ZYNER, E.; OCHOCKI, J. Induction of apoptosis and necrosis in lymphocytes by the *cis*-Pt (II) complex of 3-aminoflavone in comparison with *cis*-DDP. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 558, p. 169-179, 2004.

KULUNCSICS, Z.; PERDIZ, D.; BRULAY, E.; MUEL, B.; SAGE, E. Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 49, p. 71-80, 1999.

LEE, W-P. Purification and Characterization of Tubulin from Parental and Vincristine-Resistant HOB1 Lymphoma Cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 319, p. 498-503, 1995.

LEWIS, J.M.; BASKARAN, R.; TAAGEPERA, S.; SCHWARTZ, M.A.; WANG, J.Y.J. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. **Cell Biology**, v. 93, p. 15174-15179, 1996.

Lymphoma and Leukemia. Disponível em:< <https://www.verywell.com/lymphoma-and-leukemia-4014692>>. Acesso em 19 de fevereiro de 2016.

MAO, Z.; ZHOU, J.; LUAN, J.; SHENG, W.; SHEN, X.; DONG, X. Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, p. 179-183, 2014.

MARCÉ, S.; ZAMORA, L.; CABEZÓN, M.; XICOY, B.; BOQUÉ, C.; FERNÁNDEZ, C.; GRAU, J.; NAVARRO, J-T.; de SEVILLA, A.F. RIBERA, J-M.; FELIU, E.; MILLÁ, F. Frequency of ABL gene mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib and results of treatment switch to second-generation tyrosine kinase inhibitors. **Medicina Clinica**, v. 141, p. 95-99, 2013.

MCCORMICK, J.P.; FISHER, J.R.; PACHLATKO, J.P.; EISENSTSRK, A. Characterisation of a cell-lethal product from the photooxidation of tryptophan: hydrogen peroxide. **Science**, v.191, p. 468-669, 1976.

MELO, J.V & BARNES, D.J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature**, v. 7, p. 441-453, 2007.

MOURET, S.; BAUDOUIN, C.; CHARVERON, M.; FAVIER, A.; CADET, J.; DOUKI, T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. **PNAS**, v. 103, p. 13765-13770, 2006.



MULLER, M.; MEUER, C.; ZAMAN, G.J.R.; BORST, P.; SCHEPERS, R.J. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 13033-13037, 1994.

NEYFAKH, A.A. Use of Fluorescent Dyes as Molecular Probes for the Study of Multidrug Resistance. *Experimental Cell Research*, v. 174, p. 168-176, 1988.

NOWELL, P.C. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. **Review series personal perspective**, v. 117. p. 2033-2035, 2007.

OHGA, T.; KOIKE, K.; ONO, M. Role of the Human Y Box-binding Protein YB-1 in Cellular Sensitivity to the DNA-damaging Agents Cisplatin, Mitomycin C, and Ultraviolet Light. **Cancer Research**, v. 56, p. 4224-4228, 1996.

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. **Leukemia Research**, v. 7, p. 481-485, 1983.

OLMEDILLAS, J.L.S. & REGUEIRA, P.M. Síndromes Mieloproliferativos. Leucemia Mieloide Crônica. **Medicine**, v. 8, p. 2755-2763, 2001.

OWELLEN, R.I.; DONIGIAN, D.W.; HARTKE, C.A.; HAINS, F.O. Correlation of biologic data with physicochemical properties among the vinca alkaloids and their congeners. **Biochemical Pharmacology**, v. 26, p. 1213-1219, 1977.

PETERSON, L.F.; MITRIKESKA, E.; GIANNOLA, D.; LUI, Y.; SUN, H.; BIXBY, D.; MALEK, SN.; DONATO, NJ.; WANG, S.; T.M. p53 stabilization induces apoptosis in chronic myeloid leukemia blast crisis cells. **Leukemia**, v. 25, p. 761-769, 2011.

RAVANAT, J-L.; DOUKI, T.; CADET, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 63, p. 88-102, 2001.

REED, J.C.; JURGENSMEIER, J.M.; MATSUYAMA, S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1366, p. 127-137, 1998.

RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N.B.; NORRIS, D.A.; SHELLMAN, Y.G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-Well plates. **BMC Biotechnology**, v. 112, p. 361-368, 2005.

RUMJANEK, V.M.; TRINDADE, G.S.; WAGNER-SOUZA, K.; MELETTI-DE-OLIVEIRA, M.C.; MARQUES-SANTOS, L.F.; MAIA, R.C.; CAPELLA, M.A.M. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **An. Acad. Bras. Ci.**, v. 73, p. 57-69, 2001.

RUMJANEK, V.M.; VIDAL, R.S.; MAIA, R.C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines? **Bioscience Reports**, v. 33, p. 875-888, 2013.

SAGE, E. Distribution and Repair of Photolesions in DNA: Genetic Consequences and the role of sequence context. **Photochemistry and Photobiology**, v. 57, p. 163-174, 1993.

SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BRENNEISEN, P.; WENK, J.; HERRMANN, G.; MA, W.; KUHR, L.; MEEWES, C.; WLASCHEK, M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 307-316, 2000.

School of Chemical Sciences. Disponível em:<<http://www.scs.illinois.edu/>>. Acesso em 21 de fevereiro de 2016.

Sigma-Aldrich. Disponível em:< <http://www.sigmaaldrich.com>>. Acesso em 25 de fevereiro de 2016.

SIKIC, B.I. Modulation of Multidrug Resistance: At the Threshold. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, p. 1629-1635, 1993.

SurfScience. Learn More. Surf Better. Disponível em: <[www.surfscience.com](http://www.surfscience.com)>. Acesso em 22 de fevereiro de 2016.

The Canadian CML Network. Disponível em:<[www.cmlnetwork.ca](http://www.cmlnetwork.ca)>. Acesso em 21 de fevereiro de 2016.

TRINDADE, G.S.; CAPELLA, M.A.M.; CAPELLA, L.S.; AFFONSO-MITIDIERI, O.R.; RUMJANEK, V.M. Differences in Sensitivity to UVC, UVB and UVA Radiation of a Multidrug-Resistant Cell Line Overexpressing P-Glycoprotein. **Photochemistry and Photobiology**, v. 69, p. 694-699, 1999.

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 Research**, v. 41, p. 1967-1972, 1981.

TYRREL, R.M. & KEYSE, S.M. New trends in photobiology (Invited Review) the interaction of UVA radiation with cultured cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 4, p. 349-361, 1990.

UCHIUMI, T.; KOHNO, K.; TANIMURA, H.; MATSUO, K-I.; SATO, S.; UCHIDA, Y.; KUWANO, M. Enhanced Expression of the Human Multidrug Resistance 1 Gene in Response to UV Light Irradiation. **Cell Growth & Differentiation**, v. 4, p. 147-157, 1993.

VERFAILLIE, C.M. Direct Contact Between Human Primitive Hematopoietic Progenitors and Bone Marrow Stroma Is Not Required for Long-term In Vitro Hematopoiesis. **Blood**, v. 79, p. 2821-2826, 1992.

VOTTO, A.P.S.; RENON, V.P. ; YUNES, J.S.; RUMJANEK, V.M.; CAPELLA, M.A.M.; NETO, V.M.; de FREITAS, M.S.; GERACITANO, L.A.; MONSERRAT, J.M.; TRINDADE, G.S.

Sensitivity to microcystis: A comparative study in human cell lines with and without multidrug resistance phenotype. **Cell Biology International**, v. 31, p. 1359-1366, 2007.

VOTTO, A.P.S.; FILGUEIRA, D.M.V.B.; CLEMENTIN, R.M.; PRIMEL, E.G.; VALLOCHI, A.L.; FURLONG, E.B.; TRINDADE, G.S. Toxicity mechanisms of onion (*Allium cepa*) extracts and compounds in multidrug resistant erythroleukemic cell line. **Biol. Res.**, v. 43, p. 429-437, 2010.

YAMADA, M.; HASHINAKA, K.; INAZAWA, J.; ABE, T. Expression of Catalase and Myeloperoxidase Genes in Hydrogen Peroxide-Resistant HL-60 Cells. **DNA and Cell Biology**, v.10, p. 735-742, 1991.

Western Reserve Public Media. Disponível em:  
<[www.westernreservepublicmedia.org](http://www.westernreservepublicmedia.org)>. Acesso em 18 de fevereiro de 2016.

ZAHARIEVA, M.M.; AMUDOV, G.; KONSTANTINOV, S.M.; GUENOVA, M.L. Modern Therapy of Chronic Myeloid Leukemia. **Intech**, Bulgaria, 2013. Cap 7, p. 227-244.

ZELLE, B.; REYNOLDS, R.J.; KOTTENHAGEN, M.J.; SCHUITE, A.; LOHMAN, P.H.M. The influence of the wavelength of ultraviolet radiation on survival, mutation induction and DNA repair in irradiated chinese hamster cells. **Mutation Research**, v. 72, p. 491-509, 1980.