



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Caracterização do perfil de expressão e relação dos genes inflamatórios *ALOX5* e *COX2* com o fenótipo de resistência a múltiplas drogas em linhagens de Leucemia Mieloide Crônica

Biol. Mariana Teixeira Santos Figueiredo Salgado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de MESTRE em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Votto

RIO GRANDE, FEVEREIRO DE 2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que me conduziu e me iluminou até aqui. Sem Ele nada disso seria possível!

Agradeço a minha mãe, que mesmo sem ter o ensino fundamental completo, sempre nos ensinou sobre a importância da escola, nos incentivando a ingressar no ensino superior. Agradeço aos meus irmãos Rafael, Jésus, Júnior e Rodrigo, que sempre me deram força e me estimularam a seguir meus sonhos. Mesmo distante, vocês estavam sempre torcendo por mim e comemorando minhas conquistas. Foi difícil ficar longe de vocês, mas os levo sempre em meu coração. Amo muito vocês!

Agradeço a Naty, a minha amiga de longa data. Esteve comigo desde o ensino médio, e sempre torceu por mim. E nessa reta final do mestrado tornou meus momentos de distração e descanso muito mais alegres. Obrigada por participar da minha caminhada!

Agradeço ao meu esposo Edinho, que teve um papel essencial nessa trajetória do mestrado. Obrigada pelo companheirismo, compreensão e por me ajudar a concretizar esse sonho. Essa conquista é nossa!

Agradeço aos amigos do laboratório, que nesses anos aqui em Rio Grande se tornaram a minha família. Obrigado Edu pelas playlists animadas, Estelinha por sempre tornar o ambiente mais alegre com seus stand-up, Aline por todo o ensinamento, parceria e amizade. Muito do que sei hoje aprendi com você! Fran, uma menina tão doce e carinhosa, com certeza a melhor dupla do mundo! E também a Alê, uma pessoa incrível que sempre me incentivou e enxergou o melhor de mim, além de ser uma IC maravilhosa que não mediu esforços para me ajudar.

Agradeço a Michele por todos os ensinamentos quando entrei no laboratório, por acreditar em mim e por toda a ajuda com os experimentos iniciais. Agradeço também ao Marcelinho, que é nosso irmão emprestado e torna o nosso grupo muito mais iluminado.

Márcio agradeço também a você, não só por toda ajuda disponibilizando materiais para utilização durante os experimentos, mas principalmente pela amizade, palavras de incentivo e preocupação.

Agradeço a Daza por todos os ensinamentos sobre as células aderidas, com certeza você foi essencial na minha formação. Obrigada pela parceria desde a graduação! A

Gisele, que foi chegando de mansinho no laboratório, e hoje já faz parte da minha vida. Essa nutri querida e exemplo a se inspirar! A Tamiris, pela amizade e companhia desde o início da graduação. Meninas vocês foram muito importantes no meu processo de formação. Obrigada!

Agradeço a Júlia pela parceria, paciência e carinho durante a missão discente na UFRJ, uma amizade que se estende até hoje. Obrigada por toda ajuda sempre!

Agradeço a professora Dra. Vivian Rumjanek por me acolher em seu laboratório na UFRJ, por disponibilizar as linhagens leucêmicas que são o objeto de estudo dessa dissertação, e por abrir caminhos em minha trajetória acadêmica. Com certeza foi uma honra ter convivido com essa pesquisadora e pessoa maravilhosa.

Deixo também o meu obrigado ao grupo da professora Dra. Sandra Mascarenhas, em especial Luís, Deyse e Éssia que me auxiliaram nos experimentos de citometria e me acolheram durante o período que estive em João Pessoa.

Agradeço aos professores pelos ensinamentos durante as disciplinas, esses aprendizados foram essenciais para minha formação.

Agradeço ao ICB pelos espaços disponibilizados. A Maria e as porteiras Lizi e Inês por sempre estarem dispostas a ajudar e me recebiam todos os dias com um bom dia acompanhado de um sorriso.

E por último e mais importante agradeço imensamente a ti Ana, primeiramente por ser o motivo que me incentivou a entrar no laboratório; por toda partilha de conhecimento e experiências; por me acompanhar e ajudar na construção na minha carreira acadêmica; por todo carinho e paciência. Sabe o quanto te admiro como profissional e pessoa e sou muito grata por ter você como orientadora.

## Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO GERAL.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO GERAL .....	8
OBJETIVOS .....	22
Manuscrito.....	23
Título.....	24
ABSTRACT .....	25
INTRODUCTION .....	26
MATERIALS AND METHODS .....	28
Cell line and culture conditions.....	28
Treatment with AAS and analysis by trypan blue.....	28
Mitochondrial activity assay.....	28
Gene expression.....	29
Flow cytometric analysis of ABCB1 protein expression.....	29
Extrusion of Rhodamine 123.....	30
Protein-ligand docking.....	30
Evaluation of nitric oxide levels.....	31
Statistical analysis.....	31
RESULTS.....	31
Sensitivity of K562-Lucena and FEPS cell lines to ASA by the Trypan blue exclusion assay.....	31
Sensitivity of K562 cell line to Zileuton by the MTT assay.....	32
Gene expression.....	32
Protein expression of ABCB1.....	33
Protein-ligand docking.....	33
Activity of ABCB1 efflux protein in the presence of ASA.....	33
Production of nitric oxide in erythroleukemic lines.....	33
DISCUSSION.....	34
CONCLUSION.....	39
Acknowledgement.....	39
REFERENCES .....	39
Tables.....	43
Figures.....	44
DISCUSSÃO GERAL.....	50
CONCLUSÃO GERAL.....	57
BIBLIOGRAFIA GERAL.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

5- HPETE - Ácido 5S-hidroperoxyeicosa-tetraenóico  
5-LOX - Araquidonato 5-lipoxigenase  
AAS – ácido acetilsalicílico  
ABC - ATP *binding cassette*  
ABL1 - Tirosina quinase Abelson  
BCR - Breakpoint Cluster Region  
BCRP - Proteína relacionada ao câncer de mama  
CisLT - Cisteinil-leucotrieno  
COX – Ciclooxigenase  
COX-2 - Ciclooxigenase-2  
DAMPs - Padrões moleculares associados a danos  
DNR – Daunorrubicina  
DTMs - Domínios transmembrana  
EPs - Receptores de prostaglandinas  
FLAP – Proteína ativadora de 5-LOX  
HETE: Hidroxil 6 trans 8, 11, 14 ido cis eicosatetraenico  
IL – Interleucina  
LMC - Leucemia mieloide crônica  
LOX – Lipooxigenase  
LT – Leucotrienos  
MDR - Resistência a Múltiplas Drogas  
MEK - Quinase ativadora da MAP quinase  
MRP1 - Proteína de multirresistência  
NBDs - Domínios de ligação a nucleotídeos  
NF- $\kappa$ B - Fator nuclear kappa B  
NLRs – Receptores do tipo NOD  
NO – Óxido nítrico  
PAMPs - Padrões moleculares associados ao patógeno  
PGI<sub>2</sub> - Prostaciclina  
PG – Prostaglandinas  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
Ph – Cromossomo Philadelphia  
PRR - Receptores de reconhecimento de padrões  
TLRs - receptores do tipo Toll  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  
TRIF – Domínio TIR contendo Interferon- $\beta$  induzido por adaptador  
TX - Tromboxano  
VCR - Vincristina  
VP - Verapamil  
Zil – Zileuton

## Resumo Geral

A relação entre a inflamação e o câncer pode ser demonstrada pela superexpressão das proteínas inflamatórias COX-2 e 5-LOX em diversos tumores. Assim, objetivamos caracterizar a relação entre os genes *COX2* e *ALOX5*, bem como a ligação destes com o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) em células eritroleucêmicas sensíveis (K562) e MDR (K562-Lucena e FEPS). Para modulação desses genes realizamos a inibição das proteínas COX-2 e 5-LOX através da exposição ao ácido acetilsalicílico (AAS) e Zileuton, respectivamente, seguido do ensaio de viabilidade celular por Azul de trypan e MTT. A modulação de *ABCB1* foi avaliada em células silenciadas para esse gene. A expressão dos genes de interesse foi realizada por PCR-tempo real. A expressão proteica de ABCB1 foi avaliada por citometria, e sua atividade pelo ensaio Rho123 após a exposição ao AAS. A interação do inibidor e do produto de COX-2 com ABCB1 foi realizada pelo *docking* molecular. A inibição de 5-LOX não alterou a proliferação celular da linhagem K562, porém induziu um aumento na expressão de *ALOX5*. A linhagem celular FEPS foi mais sensível ao AAS que K562-Lucena na viabilidade celular. A inibição de COX-2 aumentou a expressão gênica de *COX2* e *ABCB1* nas duas linhagens MDR, e diminuiu a expressão de *ALOX5* na linhagem FEPS. A inibição de COX-2 estimulou a expressão proteica de ABCB1, e a atividade dessa proteína de efluxo foi alterada pelo tratamento imediato com AAS. Os níveis de óxido nítrico basais das linhagens eritroleucêmicas foram baixos e não diferiram entre si. Verificamos que a modulação de *COX2* pela exposição ao AAS foi capaz de alterar a expressão gênica e proteica de ABCB1, bem como a modulação *ABCB1* foi acompanhada por uma alteração na expressão de *COX2*. Além disso, ABCB1 pode estar atuando na regulação de *ALOX5* por via independente da alteração de *COX2*. Assim, caracterizamos um perfil de relação entre *ALOX5* e *COX2* via ABCB1, evidenciando a relação entre MDR e a inflamação.

Palavras-chave: Inflamação; prostaglandinas; leucotrienos; ácido acetilsalicílico; ABCB1.

## Abstract

The relationship between inflammation and cancer can be demonstrated by overexpression of COX-2 and 5-LOX inflammatory proteins in various tumors. Thus, we aimed to characterize the relationship between *COX2* and *ALOX5* genes, as well as the linkage of these with the multidrug resistance phenotype (MDR) in sensitive erythroleukemic cells (K562) and MDR (K562-Lucena and FEPS). For modulation of these genes, we inhibited the COX-2 and 5-LOX proteins by exposure to acetylsalicylic acid (ASA) and zileuton, respectively, followed by the trypan blue and MTT cell viability assay. The modulation of *ABCB1* was evaluated in silenced cells for this gene. Expression of the genes of interest was performed by real-time PCR. Protein expression of ABCB1 was assessed by cytometry, and its activity by the Rho123 assay after exposure to ASA. The interaction of the inhibitor and the COX-2 product with ABCB1 was performed by molecular docking. Inhibition of 5-LOX did not alter the cell proliferation of the K562 cell line, however it induced an increase in the expression of *ALOX5*. The FEPS cell line was more sensitive to ASA than K562-Lucena in the viability assay. Inhibition of COX-2 increased the gene expression of *COX2* and *ABCB1* in the two MDR lines and decreased the expression of *ALOX5* in the FEPS line. Inhibition of COX-2 stimulated the protein expression of ABCB1, and the activity of the efflux protein was altered by immediate treatment with ASA. The basal nitric oxide levels of erythroleukemic cells were low and did not differentiate between them. We verified that modulation of *COX2* by exposure to AAS was able to alter the gene and protein expression of ABCB1, as well as modulation *ABCB1* was accompanied by a change in *COX2* expression. In addition, ABCB1 may be acting in the regulation of *ALOX5* independently of the alter in *COX2*. Thus, we characterized a relationship profile between *ALOX5* and *COX2* via ABCB1, evidencing the relationship between MDR and inflammation.

Key words: Inflammation; prostaglandins; leukotrienes; acetylsalicylic acid; ABCB1.

## **Introdução**

### **1. Inflamação**

A inflamação é uma resposta que atua como mecanismo de defesa rápida para conter potenciais patógenos, limitar danos adicionais aos tecidos, além de estimular mecanismos de reparo (Munn, 2017). O processo inflamatório tem como função destruir rapidamente ou isolar a fonte da perturbação, remover o tecido danificado e restaurar a homeostase do tecido. A principal causa das respostas inflamatórias é a infecção mediada por invasores microbianos, entretanto, lesões ou traumas (na ausência de infecção parasitária) e exposição a partículas estranhas e poluentes, também são potentes ativadores da inflamação (Medzhitov 2008; Ashley et al., 2012).

O reconhecimento inicial é mediado principalmente por macrófagos e mastócitos residentes nos tecidos, que detectam patógenos ou lesões e enviam sinais de alerta através da produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanóides e produtos de cascatas proteolíticas. Esses mensageiros químicos amplificam a resposta local e recrutam outras células para a área afetada (Medzhitov 2008; Munn, 2017).

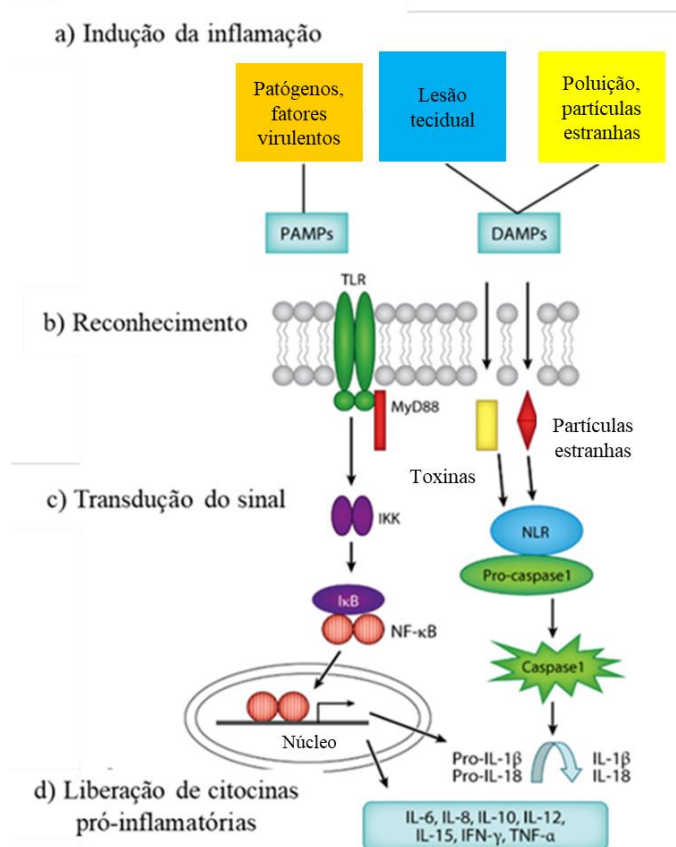
Os patógenos invasores como vírus e bactérias normalmente liberam peptídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, moléculas estranhas ao organismo que são chamadas de padrões moleculares associados ao patógeno (Pathogen-associated molecular pattern PAMPs). Da mesma forma, lesões nos tecidos liberam os padrões moleculares associados a danos (Damage-associated molecular patterns- DAMPs), que são substâncias como ácido úrico, ATP extracelular e outros detritos celulares (Ashley et al., 2012; Munn, 2017). Os PAMPs e DAMPs produzidos no local afetado são reconhecidos pelo receptor de reconhecimento de padrões (PRR) localizados na superfície de macrófagos residentes, granulócitos e células dendríticas (Figura 1a). A família dos receptores do tipo Toll (*TLR*) é uma importante família de PRR envolvidos na resposta inicial do processo inflamatório (Mogensen, 2009).

Os *TLR* são receptores de membrana geralmente presentes nas células do sistema imunológico, no entanto, eles também são expressos em células epiteliais, que entram em contato direto com patógenos. Esses receptores respondem tanto aos estímulos endógenos, quanto aos exógenos (Bhatelia et al., 2014). A ligação dos padrões



moleculares aos *TLR* induz a oligomerização do receptor, que subsequentemente desencadeia a transdução do sinal intracelular (Figura 1b).

A sinalização para desencadear o mecanismo inflamatório também pode ocorrer no interior das células. Os receptores do tipo NOD (*NLRs*) localizados no meio intracelular, respondem a um número crescente de DAMPs e alertam o sistema imunológico para lesão celular, ativando uma via rápida para detectar a exposição a possíveis toxinas ou poluentes no ambiente (Piccinini and Midwood, 2010) (Figura 1c).



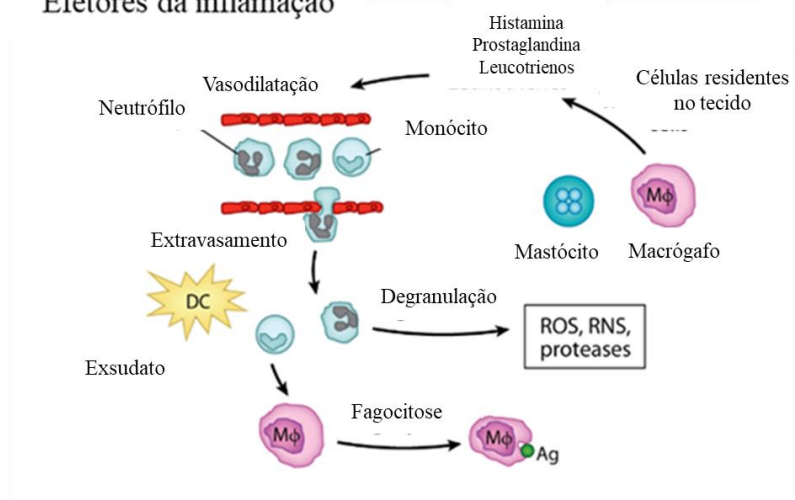
**Figura 1. Cascata inflamatória mediada por PRRs:** (a) Patógenos, lesão tecidual e partículas estranhas induzem inflamação. (b) *TLRs* transmembranares e *NLRs* intracelulares se ligam a PAMPs ou DAMP, respectivamente. (c) Os *TLR* ativam uma via de transdução de sinal que envolve a ativação de NF-κB que se desloca para o núcleo onde regula a transcrição genes inflamatórios. Os *NLRs* ativam a caspase-1 para converter as citocinas em formas ativas. (d) Uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas são produzidas e liberadas para promover as funções efetoras da inflamação. Abreviações: NF-κB, fator nuclear kappa B; DAMP, padrão molecular associado a danos; IκB, fator nuclear do promotor do gene do polipeptídeo kappa light no inibidor de células B; IKK, inibidor da capa k quinase; IFN-γ, interferon gama; IL, interleucina; MyD88, gene de resposta primária à diferenciação mieloide; *NLR*, receptor do tipo NOD; PAMP, padrão molecular associado a patógeno; *TLR*, receptor do tipo toll; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa. (Adaptado de Ashley et al., 2012).

A ativação de citocinas e quimiocinas (Figura 1d) recrutam e ativam a migração de leucócitos e monócitos para a área afetada, que por sua vez amplificam os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Piccinini and Midwood, 2010). Uma vez envolvidos e ativados, os neutrófilos respondem criando um ambiente citotóxico através da liberação de substâncias químicas dos seus grânulos citoplasmáticos (Figura 2). O conteúdo é composto por um potente coquetel de agentes antimicrobianos, enzimas, citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Essas substâncias destrutivas para os patógenos, afetam também o tecido e vasos sanguíneos locais (Nathan, 2002). As substâncias liberadas no local da lesão, como prostaglandinas e o óxido nítrico induzem a dilatação dos vasos sanguíneos, aumentando o fluxo sanguíneo para o tecido. A vasodilatação é uma característica clássica da inflamação aguda e é clinicamente caracterizada por vermelhidão e calor no local da lesão (Rock et al., 2010).

Outra característica do processo inflamatório é a formação de edema, que é causado pelo vazamento de líquido rico em proteínas plasmáticas do compartimento intravascular para o interstício. Esse fluxo ocorre devido a ação da histamina, leucotrienos, componentes do complemento, substância P e fator associado a plaquetas. Esses fatores alteram as junções das células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos aumentando a sua permeabilidade (Figura 2) (Rock et al., 2010; Munn, 2017).

O aumento da permeabilidade e a dilatação vascular acarretam em um maior transporte de células imunes circulantes para o tecido. Algumas das citocinas produzidas na inflamação atuam como quimiocinas, que criam gradientes químicos para fornecer pistas para a marginação, adesão e migração de leucócitos (Munn, 2017). Os neutrófilos são os primeiros e mais abundantes leucócitos a serem administrados em um local de infecção ou inflamação. Após a aderência, o neutrófilo deve penetrar no endotélio através das junções entre as células, e na membrana basal para entrar no ambiente inflamatório extravascular (Rock et al., 2010). Monócitos também migram para o tecido e no local podem sofrer diferenciação e se transformar em macrófagos. Além de auxiliar no processo inflamatório no sentido de produzir fatores pró e anti-inflamatórios, essas células atuam juntamente com os neutrófilos fagocitando microrganismos invasores, células e detritos (Figura 2) (Munn, 2017). A dor é a quarta característica marcante da inflamação, e é causada por citocinas incluindo prostaglandinas, TNF $\alpha$  e interleucinas, que sensibilizam os neuro-receptores para a amplificação da dor (Medzhitov, 2010).

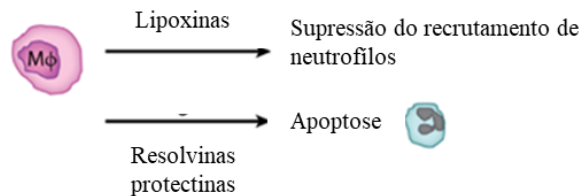
## Efetores da inflamação



**Figura 2.** Os neutrófilos e monócitos migram para o local da perturbação e passam através de células do endotélio (extravasamento). Esse fluxo de células é acompanhado por um líquido rico em proteínas (exsudato), e promove edema (inchaço). Os mastócitos e macrófagos residentes nos tecidos promovem essa migração liberando histamina, leucotrienos e prostaglandinas, que têm efeitos rápidos sobre a vasculatura, incluindo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Abreviações: RNS, espécies reativas de nitrogênio; EROs, espécies reativas de oxigênio; DC, célula dendrítica; M $\phi$ , macrófago, Ag, antígeno. (Adaptado de Ashley et al., 2012).

Quando a resposta inflamatória resulta na eliminação dos agentes infecciosos, temos então a última fase da inflamação, que é seguida pelo reparo do tecido afetado (Figura 3). A fase do reparo é crítica para diminuir os danos colaterais ao hospedeiro, sendo mediada principalmente por macrófagos residentes e recrutados (Serhan & Savill 2005). Os mecanismos regulatórios realizados durante o reparo consistem na mudança das células que passam a produzir mediadores anti-inflamatórios como lipoxinas, ao invés das pró-inflamatórias como prostaglandinas. As lipoxinas bloqueiam o recrutamento de neutrófilos e estimulam a infiltração de monócitos, que fazem a remoção de células mortas e iniciam o processo de cicatrização de feridas e remodelação tecidual (Medzhitov, 2010; Ashley, 2012). Outros mediadores lipídicos como as resolvinas e protectinas, fatores transformadores de crescimento  $\beta$  e fatores de crescimento produzidos por macrófagos, também têm um papel crucial na resolução da inflamação, incluindo o início do reparo tecidual (Medzhitov, 2008).

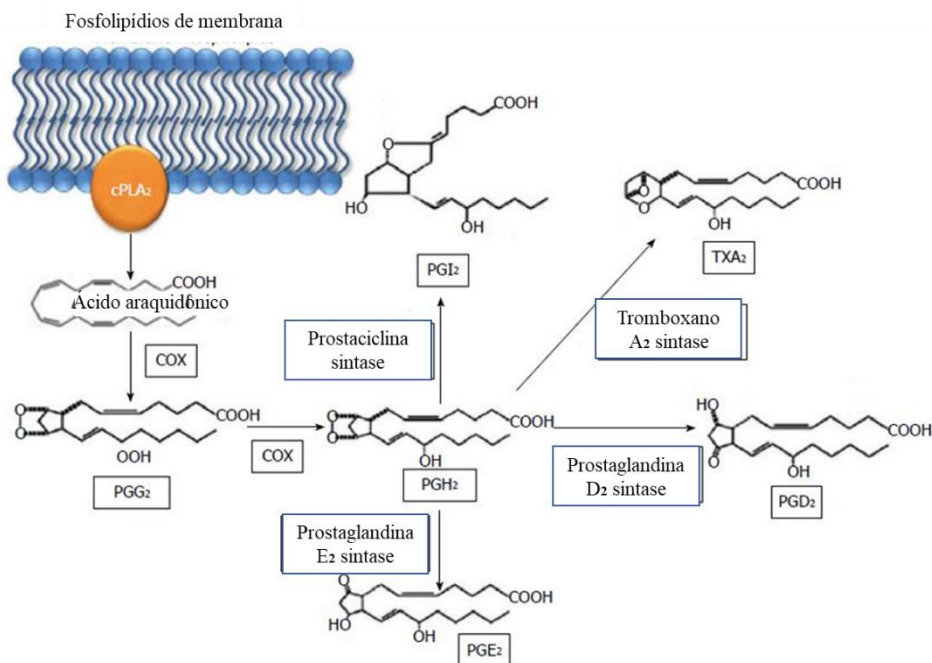
## Resolução



**Figura 3. A resolução da inflamação:** Ocorre quando os neutrófilos promovem a troca de leucotrienos produzidos por macrófagos e outras células por lipoxinas, o que inicia o término da inflamação. Abreviações: Mφ, macrófago (Adaptado de Ashley et al., 2012).

## 2. Atuação das enzimas COX-2 e 5-LOX na metabolização do ácido araquidônico

As ciclooxigenases (COX), também chamadas de prostaglandina G/H-sintase catalisam a conversão do ácido araquidônico (AA) em prostanóides, incluindo prostaglandinas (PG), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxanos (TXs) (Figura 4). Essas enzimas introduzem duas moléculas de oxigênio no AA para formar PGG<sub>2</sub>, que é subsequentemente reduzido em PGH<sub>2</sub>. PGH<sub>2</sub> é um produto altamente instável e é catabolizada em PGs por ação de enzimas sintases e isomerases específicas. A PG sintase forma uma série de PGs denominados E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> e D<sub>2</sub>, e a ação da PG isomerase forma PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>. O TXA<sub>2</sub> é instável, por isso é rapidamente hidrolisado no composto com baixa atividade: TXB<sub>2</sub> (Larsson et al., 2004, Gautam et al., 2017).



**Figura 4. Via metabólica das prostaglandinas via ciclooxigenase.** O ácido araquidônico é liberado dos fosfolípidios da membrana pela fosfolipase A<sub>2</sub> e convertido em PGG<sub>2</sub> e, posteriormente, PGH<sub>2</sub> por COX. A PGH<sub>2</sub> é então convertida em PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>. cPLA<sub>2</sub>: fosfolipase citosólica A<sub>2</sub>; COX: ciclooxigenase; PG: Prostaglandina; TX: Tromboxano (Adaptado de Knab et al., 2014).

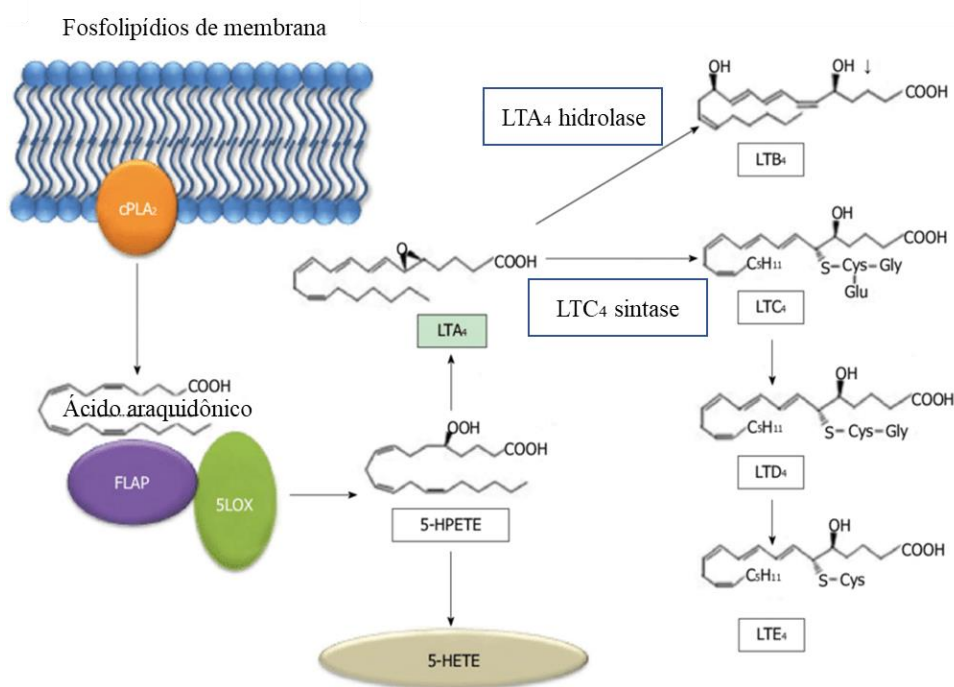
Existem duas isoformas da ciclooxigenase: COX-1 e COX-2. A COX1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, atuando na manutenção dos níveis basais de PGs. A ação dessa enzima é essencial para a manutenção da homeostase interna, participando de processos como agregação plaquetária, proteção da mucosa gástrica e funcionamento do músculo liso vascular. COX-2 é uma enzima de resposta imediata, normalmente está ausente na maioria das células, mas é altamente induzida em locais de inflamação e durante a progressão tumoral. A sua atividade pode ser estimulada por diversos agentes pró-inflamatórios, incluindo fatores de crescimento, citocinas, mitógenos e agentes cancerígenos (Pang et al., 2016).

O principal produto dessas enzimas, as prostaglandinas (PGs) exercem seus efeitos biológicos de maneira autócrina ou parácrina, através da ligação e ativação de receptores de superfície celular (receptores de prostaglandinas – EPs). A família EP compreende quatro membros EP1, EP2, EP3 e EP4, todos eles são receptores de membrana plasmática acoplados à proteína G. Cada EP interage com suas proteínas G específicas para ativar vias de sinalização específicas e desempenha papéis distintos tanto na biologia quanto na patologia (Tong et al., 2018).

Além da COX, a lipooxigenase (LOX) também participa de metabolização do AA, sendo COX-2 e a proteína 5-lipoxigenase (5-LOX) as principais atuantes nas vias de sinalização que envolve metabolização do AA. As LOXs são classificadas de acordo com sua especificidade posicional de oxigenação do AA em 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX e 15-LOX. A proteína 5-LOX catalisa a síntese de leucotrienos (LTs) e outros mediadores lipídicos bioativos a partir do AA (Schneider & Pozzi, 2011), tendo a sua atividade aumentada pela proteína ativadora de 5-LOX (FLAP) através da ligação e apresentação do AA (Figura 5).

5-LOX catalisa o primeiro passo na oxigenação do AA para produzir o ácido 5S-hidroperoxyeicosa-tetraenóico (5-HPETE) que é convertido no leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). LTA<sub>4</sub> é subsequentemente convertido em 5-HETE, ou hidrolisado no biologicamente ativo LTB<sub>4</sub> por LTA<sub>4</sub> hidrolase, ou em cisteinil-leucotrieno (CisLT), LTC<sub>4</sub>, por LTC<sub>4</sub> sintase. LTC<sub>4</sub> é em seguida convertido para outro CysLT, LTD<sub>4</sub>, que é sequencialmente metabolizado para a LTE<sub>4</sub>. LTB<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub> são os leucotrienos mais potentes, e exercem seus efeitos biológicos através da ativação de receptores acoplados a proteína G. LTB<sub>4</sub> pode ligar-se a dois receptores, BLT1 com alta afinidade e BLT2 com baixa

afinidade. Os CysLTs ligam-se a pelo menos dois receptores distintos, CysLT1 e CysLT2 (Wang & DuBois, 2010).



**Figura 5. Via metabólica do ácido araquidônico via 5-lipoxigenase.** O ácido araquidônico liberado dos fosfolípidios da membrana pela fosfolipase A<sub>2</sub> é convertido em 5-HPETE por 5-LOX e FLAP. O 5-HPETE pode então formar 5-HETE ou LTA<sub>4</sub>. LTA<sub>4</sub> então se torna LTB<sub>4</sub> ou LTC<sub>4</sub>. O LTC<sub>4</sub> pode então formar o LTD<sub>4</sub> e subsequentemente o LTE<sub>4</sub>. cPLA<sub>2</sub>: fosfolipase citosólica A<sub>2</sub>; LOX: lipoxigenase; FLAP: proteína ativadora de 5-LOX; HPETE: Ácido hidroperoxieicosatetraenóico; HETE: Hidroxil 6 trans 8, 11, 14 do cis eicosatetraeno; LT: leucotrieno (Adaptado de Knab et al., 2014).

### 3. Câncer e Inflamação

A relação entre a inflamação e o câncer tem sido caracterizada por diversos estudos. A primeira pesquisa que estabeleceu essa relação foi em 1863 quando Virchow propôs que o câncer pode surgir em locais de inflamação. Essa primeira via extrínseca, tem como base o surgimento de muitos cânceres em locais de infecção e inflamação crônica; e a presença de infiltrados inflamatórios no ambiente tumoral. Sendo assim, é possível inferir que a inflamação crônica pode iniciar ou promover o desenvolvimento dos tumores (Shalapour & Karin, 2015).

Outra via, a intrínseca é caracterizada pela inflamação ativada por eventos genéticos que causam neoplasia; nesse caso o câncer causa inflamação, criando um efeito de amplificação de sinais que perpetuam a progressão do tumor (Candido & Hagemann, 2012). No início do processo neoplásico, as células tumorais produzem mediadores

químicos que atraem neutrófilos e macrófagos, os quais liberam moléculas inflamatórias, amplificando a resposta (Bonavita et al., 2015). As células inflamatórias presentes no tumor atuam como promotores, produzindo um ambiente atraente para o crescimento do tumor, facilitando a instabilidade genômica e promovendo a angiogênese (Coussens & Werb, 2002).

As células neoplásicas podem amplificar o processo inflamatório sem a atração de células inflamatórias, devido a sua capacidade de super-expressar mediadores pró-inflamatórios. Diversos tumores expressam mediadores pró-inflamatórios, incluindo proteases, eicosanóides, citocinas e quimiocinas. Várias citocinas, como o fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-12, IL-23, IL-10, fator de crescimento transformador  $\beta$  e fator de inibição da migração de macrófagos, podem promover o desenvolvimento do tumor (Candido & Hagemann, 2012).

No câncer é possível observar a dupla face da inflamação, uma vez que o tumor se utiliza dos mecanismos de reparação para invadir outros tecidos do organismo e levá-lo à morte. Dessa forma, os mecanismos da inflamação, que seriam responsáveis pela reparação e formação de novos tecidos para a cura, são direcionados de forma a alimentar o crescimento e desenvolvimento do câncer (De Castro Barreto et al., 2011).

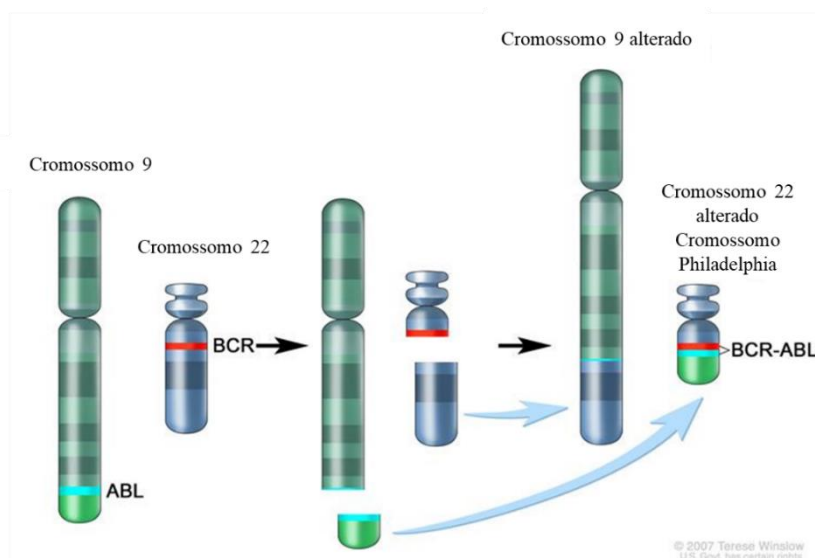
Da mesma forma que as células imunológicas agem para reparar os tecidos afetados, as células tumorais produzem e liberam exageradamente substâncias inflamatórias como citocinas, prostaglandinas e leucotrienos para manter o crescimento e desenvolvimento do tumor (Servan-Schreiber, 2011). Esses mediadores inflamatórios exercem efeitos autócrinos nas células tumorais e contribuem para várias características do câncer, como a aumento da proliferação e metástase (Crusz & Balkwill, 2015). Graças ao processo inflamatório, as barreiras que cercam o tumor se tornam permeáveis, facilitando a infiltração das células cancerosas nos vasos sanguíneos e linfáticos, e a sua invasão e colonização de tecidos vizinhos (Servan-Schreiber, 2011).

A conexão entre a inflamação e o tumor é tão intensa que é possível dizer que quanto mais os cânceres conseguem induzir e aumentar a reação local inflamatória, mais agressivo é o tumor, e maior a sua capacidade de se propagar por longas distâncias (Marx, 2004; De Castro Barreto et al., 2011). Esse processo é tão crucial que o nível e produção de fatores de inflamação pelos tumores permite prever a duração da sobrevivência do paciente em vários tipos de cânceres (Wallace, 2002).

#### 4. A Leucemia Mieloide Crônica

Dentre os diversos tipos de câncer, a Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal, que se origina de células hematopoiéticas precursoras da medula óssea, resultando em um excesso de granulócitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos). Essa neoplasia geralmente se inicia com a fase crônica, caracterizada pela expansão de células mieloides funcionalmente normais; se não tratada, a doença progride para uma leucemia aguda (fase blástica) que pode ser mieloide ou linfóide. A fase blástica apresenta prognóstico desfavorável, com desenvolvimento frequente e rápido, resistência ao tratamento e perda da capacidade de diferenciação terminal (O'Hare et al., 2011; Hanlon & Copland, 2017).

A LMC é caracterizada por uma mutação cromossômica que dá origem ao cromossomo Philadelphia (Ph). Este cromossomo é resultado da translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 –  $t(9;22)(q34;q11)$ . O segmento do gene da tirosina quinase Abelson (*ABL1*) localizado no cromossomo 9q34 se justapõe ao gene *Breakpoint Cluster Region (BCR)* no cromossomo 22q11 (Rowley, 1973; Reckel et al., 2017).



**Figura 6. Formação do cromossomo Philadelphia e BCR-ABL:** Fusão do braço longo do cromossomo 9 com o braço longo do cromossomo 22 (Adaptado do endereço eletrônico: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/bcr-abl-fusion-gene>. Data de acesso 14/02/2019).

Dependendo do ponto de quebra da translocação no gene *BCR*, a fusão dos genes pode dar origem a três diferentes isoformas da proteína quimérica BCR-ABL:



p190, p210 e p230. A proteína p190 apresenta maior atividade tirosina quinase e ocorre na maioria das leucemias linfoblásticas agudas de células B. A p230 está associada à trombocitose e a uma variante neutrofilica de LMC. A expressão de p210 é a mais frequente nos pacientes com LMC, sendo responsável pelas anomalias fenotípicas correspondentes à fase crônica (Andrikovics et al., 2007; Reckel et al., 2017).

A proteína de fusão BCR-ABL1 é uma tirosina quinase constitutivamente ativa que desempenha um papel crítico na patogênese da LMC. BCR-ABL1 permanece no citoplasma, e pode formar dímeros ou tetrâmeros seguido por uma autofosforilação que gera sítios de ligação de elevada afinidade para várias proteínas, formando um grande complexo proteico. As proteínas que se ligam ao complexo proteico são fosforiladas e conseqüentemente ativadas, e induzem a desregulação de várias vias de sinalização, como proliferação excessiva, resistência à apoptose e defeitos na adesão (Ren, 2005; Rumpold & Webersinke, 2011).

Nesse estudo foram utilizadas três linhagens celulares de LMC. Estas células apresentam o cromossomo Ph e, portanto, as suas funções são reguladas pela proteína BCR-ABL1. A linhagem celular K562 foi estabelecida por Lozio & Lozio (1975), a partir de células eritroleucêmicas retiradas de uma paciente em crise blástica. A linhagem celular K562-Lucena foi desenvolvida através do método de Tsuruo e colaboradores (1983), a partir da linhagem K562, através da adição de concentrações crescentes do quimioterápico vincristina (VCR), que tem como principal ação o bloqueio da polimerização da tubulina, causando alterações no citoesqueleto (Himes et al. 1976; Rumjanek et al., 2001). Algum tempo depois, a linhagem celular FEPS foi desenvolvida também a partir da linhagem K562, através da adição de concentrações crescentes do quimioterápico daunorrubicina (DNR), o qual age nas células através da ligação ao DNA e conseqüente bloqueio da síntese de DNA, RNA e proteínas (Capranico et al., 1986; Daflon-Yunes et al., 2013).

A principal diferença entre as linhagens celulares K562-Lucena e FEPS, que apresentam o fenótipo de resistência múltiplas drogas (MDR), e a linhagem K562, é a superexpressão de proteínas de efluxo pelas duas primeiras linhagens, sendo bons modelos para estudos que visam entender o fenótipo MDR, um dos principais mecanismos envolvidos no fracasso do tratamento do câncer. A linhagem K562-Lucena superexpressa ABCB1, e a linhagem FEPS superexpressa ABCB1 e ABCC1

apresentando maior resistência a quimioterápicos quando comparada as linhagens K562 e K562-Lucena (Daflon-Yunes et al., 2013).

## 5. Fenótipo de resistências a múltiplas drogas

O fenótipo MDR ocorre quando células tumorais se tornam resistentes a uma ampla gama de drogas anticancerígenas, que podem ter diferentes estruturas e mecanismos de ação (O'Connor et al., 2007; Zhang et al., 2017). Vários fatores podem contribuir para o fenótipo MDR, incluindo: alterações no transporte do quimioterápico através da membrana plasmática; mudança no metabolismo da droga; aumento na reparação do DNA e incapacidade em sofrer apoptose, mecanismos que prolongam a sobrevivência das células. O transporte alterado de quimioterápico é a principal forma de resistência e está relacionado com a expressão aumentada de membros da família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), que transportam ativamente o quimioterápico para fora da célula (Fletcher et al., 2010; Huber et al., 2010).

As proteínas ABC utilizam a energia derivada da hidrólise de ATP para transportar substratos específicos ou regular a atividade dos canais de membrana através do transporte ativo secundário. Na maioria dos transportadores ABC, a hidrólise de ATP é mediada por dois domínios de ligação a nucleotídeos (*NBD, nucleotide binding domains*), que interagem intimamente com dois domínios transmembrana (*TMD, transmembrane domains*). Mudanças na conformação que ocorrem no nível de *NBD*, após a hidrólise do ATP, são transmitidas às *TMD*, que se ligam ao substrato e o translocam através das membranas biológicas (Domenichini et al., 2019).

A superfamília de transportadores ABC inclui 49 proteínas distribuídas em sete subfamílias (ABCA-G), no entanto três principais transportadores têm sido extensivamente investigados como reguladoras da resistência em tumores. Dentre esses, o transportador ABCB1 (também conhecido como glicoproteína-P (P-gp) ou MDR1) foi o primeiro descrito e mais caracterizado, sendo capaz de transportar um amplo espectro de substratos. Além deste, a proteína de multirresistência MRP1 (ABCC1) e a proteína relacionada ao câncer de mama BCRP (ABCG2), são associadas ao fenótipo MDR sendo superexpressas em diversos tipos de câncer (Cojoc et al., 2015).

A superexpressão dos transportadores ABC pelas linhagens K562-Lucena e FEPS age reduzindo os níveis de fármaco intracelular, tais como os conhecidos compostos anticancerígenos vinblastina, vincristina e doxorrubicina (Thimmaiah et al., 1990, Belinsky et al., 2002) levando a uma insensibilidade ao fármaco utilizado e a outros não relacionados. Esses transportadores desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da resistência aos medicamentos, levando à falha do tratamento e consequente recidiva do tumor (Zhang et al., 2017). Visto isso, se torna essencial encontrar nas células eritroleucêmicas vias celulares que estão relacionadas ao fenótipo MDR.

## **6. Expressão da enzima pró-inflamatória COX-2 e o fenótipo MDR**

Uma ampla linha de evidências tem mostrado que a enzima cicloxigenase 2 (COX-2) que atua no processo inflamatório é capaz de alterar a expressão das proteínas ABCs em vários tipos de neoplasias. Estudos em diferentes tipos celulares evidenciam que o aumento na expressão de COX-2 por diferentes mecanismos é capaz de estimular a expressão de transportadores ABCs, principalmente ABCB1. A inibição de COX-2 em células de osteossarcoma que superexpressam COX-2 (Liu et al., 2017) induziu um aumento na expressão das proteínas ABCB1, ABCC1e ABCG2. Resultado semelhante foi encontrado em células de câncer de colo, no entanto apenas o aumento de ABCB1 foi evidenciado (Rahman et al., 2012). Outros estudos que realizaram a indução da expressão de COX-2 por transfecção com adenovírus (Patel et al., 2002) ou adição de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Achari et al., 2011) também observaram um aumento na expressão de ABCB1 após a superexpressão de COX-2.

A relação entre expressão de COX-2 e fenótipo MDR também foi vista em células de LMC resistentes ao imatinib (K562-IR). Na linhagem K562-IR, a superexpressão de ABCB1 e COX-2 foi acompanhada pelo desenvolvimento da resistência ao imatinib. O tratamento com celecoxib para inibição de COX-2 provocou uma diminuição na expressão das proteínas ABCB1, ABCC1-5 e ABCG2. Os autores mostraram que a via PGE<sub>2</sub>-cAMP-PKC-NF-κB estaria sendo ativada por COX-2 na regulação da expressão de ABCB1 (Arunasree et al., 2008). Para os transportadores ABCC1-5 e ABCG2 a superexpressão estaria sendo regulada por COX-2 através das vias de sinalização Wnt e Ras - quinase ativadora da MAP quinase (MEK) (Dharmapuri1 et al., 2015).

## **7. *ALOX5* e células tronco tumorais**

Além do seu papel no processo inflamatório, estudos tem mostrado que 5-LOX é importante para a manutenção das características das células tronco cancerígenas. Seus produtos  $LTB_4$  e  $LTD_4$  estimulam a proliferação de células-tronco hematopoiéticas e neurais progenitoras, regulando o seu crescimento e maturação (Wang & DuBois, 2010). Além disso, o gene *ALOX5* que codifica para proteína 5-LOX é superexpresso em células tronco leucêmicas de rato, sendo considerado um regulador crítico para as funções dessas células. A deficiência ou inibição de *ALOX5* preveniu o início da LMC induzida por BCR-ABL por influenciar na diferenciação, divisão celular e sobrevivência das células tronco leucêmicas, sem alterar as células troncos normais (Chen et al., 2009). A 5-LOX também parece estar envolvida na função das células estaminais da CML humana sendo expressa diferencialmente em células CML CD34+ (marcador de células tronco), em comparação com células normais CD34 + (Graham, et al., 2007, Roos, 2016). As células tronco do câncer podem ser a fonte de todas as células malignas em um tumor primário, elas podem compor o pequeno reservatório de células resistentes a drogas que são responsáveis pela recaída após uma remissão induzida por quimioterapia (Jordan et al., 2006).

## **8. Superexpressão de COX-2 e 5-LOX em tumores**

A superexpressão de COX-2 e 5-LOX e seus produtos bioativos  $LTB_4$  e  $PGE_2$  tem sido investigada por vários estudos que visam entender a atuação dessas proteínas em células neoplásicas. Diversas pesquisas apontam que a COX-2 está envolvida no desenvolvimento de muitos tumores através da produção de PGs, que por sua vez, afetam diversas características biológicas essenciais para o funcionamento celular, como a proliferação, angiogênese, apoptose e adesão (Tsuji et al., 1995, 1998; Gautam et al., 2017). Os níveis de COX-2 são elevados em vários tipos de tumores, como mama, próstata, pâncreas, pele, pulmão e da cabeça e pescoço (Crusz & Balkwill 2015).

A enzima 5-LOX é geralmente ausente nos epitélios normais, porém pode ser induzida por estímulos pró-inflamatórios, sendo frequentemente expressa constitutivamente em vários cânceres epiteliais, incluindo os do cólon, esôfago, pulmão, próstata e mama (Pidgeon et al., 2007). Os leucotrienos produzidos pela ação de 5-LOX exercem ação pró-inflamatória e aumentam a permeabilidade microvascular (Schneider & Pozzi, 2011). Os produtos metabólicos de 5-LOX são evidenciados por aumentar a

proliferação de células tumorais e inibir a maquinaria apoptótica, através do estímulo de vários fatores de crescimento (Gautam et al., 2017).

Dessa forma, a presença dessas enzimas estabelece uma ligação entre o câncer e a inflamação. As PGs e LTs podem modular a progressão tumoral através da ativação de seus receptores nas células tumorais, que regulam diversos mecanismos como: proliferação, apoptose, migração e invasão celular. Esses mediadores lipídicos também podem induzir as células epiteliais adjacentes ao tumor a secretar fatores de crescimento, mediadores pró-inflamatórios e fatores angiogênicos que alteram o microambiente tumoral estimulando o crescimento e disseminação do tumor (Wang & DuBois, 2010).

Devido à associação dessas enzimas com a progressão do câncer, estudos contemporâneos têm apontado um papel promissor dos inibidores de COX-2 e 5-LOX na quimioprevenção do câncer (Gautam et al., 2017). Estudos *in vitro* realizados por Ye e colaboradores (2005), mostraram que no grupo de células de câncer de colón tratado com inibidor da COX-2, o nível de PGE<sub>2</sub> diminuiu enquanto o nível de LTB<sub>4</sub> aumentou. Em contraste, no grupo tratado com inibidor de 5-LOX, o nível de LTB<sub>4</sub> foi reduzido e o nível de PGE<sub>2</sub> permaneceu inalterado. Estes resultados indicam que a inibição da COX-2 pode conduzir a uma derivação do metabolismo do ácido araquidônico para a via dos leucotrienos durante o desenvolvimento do tumor, estabelecendo assim uma conexão entre essas duas vias.

O perfil de expressão gênica dos genes *ALOX5* que codifica para a proteína 5-LOX, e *COX2* que codifica para a proteína COX-2 é conhecido nas linhagens de LMC K562, K562-Lucena, FEPS, sendo observada uma relação inversa na expressão desses genes. As linhagens MDR apresentam uma maior expressão do gene *COX2* (Fernandes e Silva et al., 2018), e uma menor expressão de *ALOX5* (Carrett-Dias et al., 2016), quando comparadas a linhagem parental K562. É interessante observar que a maior expressão dos genes relacionados ao fenótipo MDR é acompanhado pela maior expressão de *COX2*. Visto isso, o presente estudo tem como objetivo estabelecer como ocorre a regulação entre os genes *ALOX5* e *COX2*, bem como a ligação destes com o fenótipo MDR nas linhagens de LMC, buscando entender as principais mudanças que ocorreram durante a pressão seletiva por quimioterápicos na aquisição/seleção de resistência, e estabelecer a relação entre a inflamação e a LMC em busca de novos caminhos moleculares que podem levar a um melhor diagnóstico e tratamento.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral:**

Avaliar a relação dos genes *COX2* e *ALOX5* após a inibição dos seus produtos COX-2 e 5-LOX, bem como a relação destes com o fenótipo de resistências a múltiplas drogas (MDR) em linhagens de LMC.

### **2.2 Objetivos específicos:**

-Analisar se a inibição de COX-2 nas linhagens K562-Lucena e FEPS, e a inibição de 5-LOX na linhagem K562 altera a expressão dos genes *COX2*, *ALOX5*, *ABCB1* e *ABCC1*.

-Verificar se o silenciamento do gene *ABCB1* nas linhagens K562-Lucena e FEPS altera a expressão dos genes *ALOX5* e *COX2*;

-Investigar a expressão proteica de ABCB1 após a inibição de COX-2 e 5-LOX nas linhagens K562, K562-Lucena e FEPS;

-Analisar a atividade da proteína ABCB1 após exposição ao AAS nas linhagens K562-Lucena e FEPS;

-Verificar a interação do produto de COX-2 (PGE2) e do AAS com a proteína ABCB1 através de análise *in silico* de *docking*;

-Caracterizar os níveis de óxido nítrico basais e após o tratamento com Zileuton e AAS nas linhagens K562, K562-Lucena e FEPS.

Manuscrito

Relation between ABCB1 overexpression and *COX2* and *ALOX5* genes in human erythroleukemic cell lines

(Manuscrito submetido ao The International Journal of Biochemistry & Cell Biology)

## **Relation between ABCB1 overexpression and *COX2* and *ALOX5* genes in human erythroleukemic cell lines**

Mariana Teixeira Santos Figueiredo Salgado <sup>a,b</sup>, Alessandra Costa Lopes <sup>a,c</sup>, Estela Fernandes e Silva <sup>a</sup>, Julia Quarti Cardoso <sup>d</sup>, Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva <sup>e</sup>, Deyse Cristina Madruga Carvalho <sup>e</sup>, Sandra Rodrigues Mascarenhas <sup>e</sup>, Karina dos Santos Machado <sup>f</sup>, Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek <sup>d</sup>, Ana Paula de Souza Votto <sup>\*a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Cultura Celular, ICB, FURG, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, ICB, FURG, RS, Brazil

<sup>c</sup> Escola de Química e Alimentos, EQA, FURG, RS, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Imunologia Tumoral, IBqM, UFRJ, RJ, Brazil.

<sup>e</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brazil

<sup>f</sup> Centro de Ciências Computacionais, FURG, RS, Brazil

\*Corresponding author e-mail: [anavotto@yahoo.com.br](mailto:anavotto@yahoo.com.br) (Ana P. S. Votto)

Institutional E-mail address: [anavotto@furg.br](mailto:anavotto@furg.br)

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

Avenida Itália, Km 8, s/n, Zip code 96203-900, Rio Grande/RS – Brazil



## **Abstract**

This study aimed to characterize the relationship between the *COX2* and *ALOX5* genes, as well as the linkage of these with the multidrug resistance phenotype (MDR) in susceptible erythroleukemic (K562) and MDR cells (K562-Lucena and FEPS). The modulation of 5-LOX by zileuton did not alter the cell proliferation of the K562 cells, however, increased the gene expression of *ALOX5*. After inhibition of the COX-2 protein by exposure to acetylsalicylic acid (ASA) we observed that the FEPS cell line was more sensitive to ASA than the K562-Lucena. Inhibition of COX-2 increased the gene expression of *COX2* and *ABCB1* in the two MDR lines and decreased the expression of *ALOX5* in the FEPS. Silencing of the *ABCB1* gene induced an increase in *COX2* expression and a decrease in the *ALOX5* gene. Cytometric data showed that ABCB1 protein was induced by inhibition of COX-2. Through molecular anchoring we have found that prostaglandin E<sub>2</sub> is the preferred ligand for ABCB1, but AAS is capable of binding to the efflux pump. This result was confirmed by the increase in ABCB1 activity in the K562-Lucena cell line, soon after exposure to ASA. We have shown that the increase in *COX2* gene expression was accompanied by increase of the gene and protein expression of ABCB1, and the change in expression *ABCB1* was followed by alteration of *COX2* expression. In addition, when the *ABCB1* gene was altered, the expression of *ALOX5* presented an inverse alteration, independent of the *COX2* alteration. Our study established for the first time the link between the *COX2* and *ALOX5* and the expression of *ABCB1* in the erythroleukemic lines.

**Keywords:** Inflammation, prostaglandins, leukotrienes, MDR, P-glycoprotein

## 1. Introduction

Several pieces of evidences demonstrate the relationship between cancer and inflammation. The presence of inflammatory infiltrates in solid tumors, observed in the 19th century by Rudolf Virchow, indicated for the first time this connection [1]. It is now known that cancer can originate in sites of inflammation, as well as the tumor environment can also induce an inflammatory process by signaling to immune cells to migrate to the site of the tumor perpetuating its progression [2]. From this, become increasing the researches that seek to understand in a more profound way this relation between cancer and inflammation.

Neoplastic cells can amplify the inflammatory process without attracting cells from the immune system, because of their ability to overexpress pro-inflammatory mediators including proteases, eicosanoids, cytokines, and chemokines [3]. Moreover, cancer benefits from these substances to induce its own proliferation and permeate the barriers that surround it. Thus, the mechanisms of inflammation that would be responsible for the repair and formation of new tissues for healing are directed in order to nourish the growth and development of the tumor [4].

Among the proteins that act in the inflammatory process we can highlight the cyclooxygenases (COX) and the lipoxygenases (LOX). These enzymes catalyze the steps of the biosynthesis of the respective lipid mediators; prostaglandins (PGs) and leukotrienes (LTs) from arachidonic acid [5]. Several studies have shown increased expression of 5-LOX, COX-2 and its products (LTB<sub>4</sub> and PGE<sub>2</sub>) in several types of cancers, including colon [6], pancreas [7] and prostate [8]. In addition, the products of these enzymes act by modulating tumor biology through various mechanisms, such as induction of proliferation, migration and cell invasion, as well as protect against programmed cell death [9]. Due to the association of these enzymes with the progression of cancer, some studies have pointed to a promising role of double inhibitors (COX-LOX) in cancer chemoprevention [10].

There are two forms of the COX enzyme; COX1 is constitutively expressed in most tissues, whereas COX-2 is induced by growth factors, cytokines and cancerous molecules [11]. COX-2 has shown a regulatory effect on the expression of proteins related to the phenotype of multi-drug resistance (MDR) through the activation of signaling pathways involving the transcription factor NF- $\kappa$ B [12, 13].

The MDR phenotype is a phenomenon in which tumor cells are resistant to a wide range of anticancer drugs and it may have different structures and mechanisms of action [14, 15]. This phenomenon is characterized mainly by the overexpression of proteins belonging to the ABC family (ATP-binding cassette), which facilitate the unidirectional translocation of several substrates. For instance, P-glycoprotein (P-gp / MDR1 / ABCB1), multidrug resistant protein (MRP1 / ABCC1) and breast cancer-related protein (BCRP / ABCG2) are associated with chemical resistance of tumor [16].

The K562-Lucena and FEPS erythroleukemic cell lines present the phenotype of resistance to multiple drugs and they were selected from the K562 lines, by the addition of increasing concentrations of chemotherapeutic agents; vincristine (VCR) and daunorubicin (DNR) respectively. The K562-Lucena cell line overexpresses ABCB1, whereas the FEPS line shows an overexpression of ABCB1 and ABCC1 [17, 18]. Studies with the imatinib-resistant K562 chronic myeloid leukemia (CML) cell line have shown that COX-2 overexpression leads to positive regulation of ABC transporters (ABCB1 and ABCC1-5) through the signaling pathways NF- $\kappa$ B, Wnt and MEK [19,20].

The MDR K562-Lucena and FEPS cell lines MDR lines show a greater expression of the *COX2* gene encoding the COX-2 protein [21], and a lower expression of *ALOX5* encoding the 5-LOX protein [22], when compared to the K562 parental cell line. Therefore, it is interesting to investigate and characterize the relationship between inflammation and MDR phenotype in CML lines in search of new molecular pathways that can lead to better diagnosis and treatment.

Here, we aim to evaluate the correlation between expression of *COX2* and *ALOX5* inflammatory genes, and the modulation of these genes through the inhibition of their COX-2 and 5-LOX products. Moreover, if this event is able to regulate the MDR phenotype in these human erythroleukemic cell lines. Through this characterization it will be possible to increase the understanding of the possible inflammatory mechanisms that would be regulating or being regulated during the selection process of the K562-Lucena and FEPS cells from the K562 line, opening the way for research that develops more targeted treatments.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Cell line and culture conditions**

The K562, K562-Lucena and FEPS cell lines, and the K562-Lucena and FEPS silenced for the *ABCB1* gene were obtained from Tumoral Immunology Laboratory at the Medical Biochemistry Institute Leopoldo De Meis of the Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. The cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Sigma), supplemented with sodium bicarbonate (2.0 g/l (Synth), L-glutamine (0.3g/l) (Vetec), with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 1% antibiotic and antimycotic (penicillin [100 U/mL], streptomycin [100µg/mL], and amphotericin B [0.25µg/mL]) (Gibco). The non-silenced cell lines were maintained in plastic flasks, and silenced cell lines were maintained in 24-well plates, both with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. To preserve the MDR phenotype, the K562-Lucena line was maintained with 60 nM vincristine (VCR) and the FEPS line with 532nM daunorubicin. In the silenced cell lines 500 µg/ml of the antibiotic geneticin (G418) were added to maintain gene silencing.

### **2.2. Treatment with ASA and analysis by trypan blue**

The K562-Lucena and FEPS lines cell were treated with ASA a COX-2 inhibitor, since these lines cell present higher expression of the *COX2* gene when compared to the K562 parent line cell. The non-silenced K562-Lucena and FEPS cell lines (2x10<sup>4</sup> cells/mL) were treated with the concentrations of 0.5; 1; 1.5; 2 and 2.5 mM acetylsalicylic acid (ASA) (Sigma). ASA was purified by recrystallization [23] and stored in a vacuum desiccator. Stock solutions were dissolved in ethanol and prepared at the time of each experiment. After the treatment, cells were incubated at 37°C in culture plate and cell viability was assessed immediately (0h), 24, 48 and 72h after treatment with ASA by the Trypan blue exclusion assay. This assay provides two variables: number of viable cells and cell viability. Through the assay the concentration of 1 mM and the exposure time 48 h were chosen for the following analyzes.

### **2.3. Treatmet with Zil and mitochondrial activity assay**

The K562 cell line was treated with Zileuton (Sigma), a 5-LOX inhibitor, since it presented a higher gene expression of *ALOX5* when compared to the K562-Lucena and

FEPS lines. The cell viability was analyzed by the (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) method - (Sigma-Aldrich, USA) immediately (0h), 24, 48 and 72h after exposure. Cells ( $2 \times 10^4$  cells/mL) were plated at concentrations of 10, 20, 30 and  $40 \mu\text{M}$  zileuton and incubated at  $37^\circ\text{C}$ . The cells were then centrifuged for removal of the culture medium and washed with phosphate buffer saline (PBS). After centrifugation ( $524 \times g$ , 5 min), the PBS was removed and added 200  $\mu\text{l}$  of medium and 20  $\mu\text{l}$  of the MTT solution (5 mg/mL) to each well, and cells were incubated for 3 h at  $37^\circ\text{C}$ . Supernatant was removed after centrifugation and formazan crystals were dissolved in 200  $\mu\text{l}$  of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma). Absorbance values were determined at 490 nm on a multiwell plate reader (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-TEK). Through the assay the concentration of 20  $\mu\text{M}$  and the exposure time 48 h were chosen for the following analyzes.

#### 2.4. Gene expression

The gene expression was analyzed in the cells K562-Lucena and FEPS silenced for ABCB1, non-silenced cell lines K562-Lucena and FEPS incubated with 1 mM ASA, and the K562 cell line incubated with zileuton at the concentration of 20  $\mu\text{M}$ . The mRNA expression of *COX2*, *ALOX5*, *ABCB1* and *ABCC1* genes was analyzed 48 hours after exposure to treatments. Total RNA was extracted using TRIzol® reagent (Invitrogen) according to the protocol suggested by the manufacturer. The integrity of the RNA extract was confirmed by electrophoresis in 1.5% agarose gel with ethidium bromide staining (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and quantified in the BioDrop  $\mu\text{Lite}$  spectrophotometer (BioDrop, England). Synthesis of cDNA was performed with approximately 1  $\mu\text{g}$  of total RNA, using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, Brazil). Gene expression analysis was performed by quantitative real-time PCR (qPCR) using the equipment ABI 7300 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Brazil) and the detection system Gotaq qPCR Master Mix (Promega Corporation, Brazil). The primers of the analyzed genes were designed according to the genetic sequences available from GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Table 1). Primer efficiencies (Table 1) were evaluated using serial dilutions of cDNA. *EF1 $\alpha$*  and *B2M* were used as reference genes, the geometric mean of the expression values of these genes were calculated by the geNorm application [24] in order to obtain the normalization factor.

## **2.5. Flow cytometric analysis of ABCB1 protein expression**

The cell lines were plated and incubated with their respective treatments for 48h at 37°C. To determine the protein expression of ABCB1, cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were washed with PBS at 5% FBS and labeled with anti-P-gp antibody (Mouse Anti-Human P-glycoprotein – FITC, BD Biosciences) in the 1:5 dilution, at final volume of 10  $\mu$ L. Cells were maintained for 30 min at 4 ° C. After the incubation period, cells were centrifuged (220g, 8min), resuspended in PBS with 5% FBS, and 10,000 events were acquired by flow cytometry. The K562 cell line samples were read in a FACSCalibur-BD and data analysis was performed in Summit v4.3 software. The BD FACSCanto equipment was used to capture the events of the K562-Lucena and FEPS cells, and the subsequent analysis was performed in the FlowJo software.

## **2.6. Extrusion of Rhodamine 123**

Analysis of the activity of the ABCB1 efflux protein in the presence of ASA was investigated by the accumulation assay of Rhodamine 123 (Rho 123). The K562-Lucena and FEPS cell lines were incubated with 1mM ASA for 48h at 37°C. The cells ( $5 \times 10^4$  cells/ml) were centrifuged (197g, 2min), washed with PBS, resuspended in RPMI 1640 medium and Rho 123 dye (300 ng/ml) was added. For inhibition of P-gp, 10  $\mu$ M of verapamil (VP) was added to the group of untreated cells, another group received AAS at the concentration of 1 mM. The K562-Lucena cell line was incubated for 1 h at 37°C, and the FEPS line for 30 min with Rho 123 in the presence or absence of VP and ASA (cells incubated with ASA for 48h received only Rho 123). After incubation, the cells were washed with PBS and re-incubated in the presence or absence of VP and ASA for 1h (K562-Lucena) and 10 min (FEPS) in RPMI 1640 medium in the absence of the dye for analysis of their extrusion. Subsequently, the cells were washed with PBS and the accumulation of Rho 123 was analyzed by capture areas under epifluorescence microscope (Olympus IX 81). Fluorescence intensity was measured and expressed in relation to the number of cells determined with ImageJ Software.

## **2.7. Protein-ligand docking**

ABCB1 structure was obtained from PDB (PDB ID: 4KSB) and prostaglandins and aspirin structure (ligands) were obtained from ZINC database (Zinc IDs: 15111010 and 53 respectively) [25,26]. Receptor input and ligand files were prepared using the AutoDockTools 4 software for AutoDockVina [27] prior to molecular coupling

simulation. The receiver input PDB file was prepared by removing heteroatoms, ligands and crystallographic water molecules. Besides, polar hydrogen atoms were added to protein receptor and partial atomic charges were calculated. Processed receptor structure file was saved in PDBQT file format, which contains a protein structure with hydrogen's in all polar residues. We added polar and non-polar hydrogen atoms and calculated the charges of Gasteiger to the whole binder to prepare the binder's input file, saving the binder in the format PDBQT. To perform docking simulations, we configure grid box as: size x= 60 Å; size y= 64 Å; and size z= 44 Å; and center box coordinates are x= 56.024 Å center; y= 1 -14.282 Å center; z= 20.107 Å; considering exhaustiveness as 128. Molecular docking simulations were performed with Autodock Vina [27]. During the anchoring process, the protein was held rigid, while the ligand molecules were kept flexible. The binding-free energy (BFE) of the anchored binder-receptor was estimated in Kcal/mol, considering that the more negative FEB indicates the greater stability of the ligand-receptor complex. Visual analysis of results was performed with VMD.

## **2.8. Evaluation of nitric oxide levels**

Indirect nitric oxide (NO) dosing was performed by measuring nitrite accumulation; a product of NO oxidation, in the cell culture medium. Briefly, 50 µl of supernatant of cells previously exposed to Zil (k562) and ASA (K562-Lucena and FEPS) for 48h was mixed with 50 µl Griess solution (0.1% N-(1-naphthyl) ethyl-enediamine and 1% p-aminobenzenesulfonamide in 5% ortho-phosphoric acid) and incubated for 10 min at room temperature. Absorbance at 540 nm was recorded using a microplate spectrophotometer. Sodium nitrite was used for standard curve.

## **2.9. Statistical analysis**

All experiments were performed with at least three replicates (n=3) of each sample. Data were expressed as mean ± standard error and analyzed with by Student's t-tests or ANOVA followed by Tukey's post-test. Normality and variance homogeneity were previously verified. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1. Sensitivity of K562-Lucena and FEPS cell lines to ASA by the Trypan blue exclusion assay**

The treatment with ASA was able to decrease the number of viable cells concentration-time dependent manner in both cell lines. For the K562-Lucena cell line all concentrations, except for 0.5 mM, caused a decrease in the number of viable cells 48 h after exposure to ASA, well as 72h after exposure (Figure 1A). In the FEPS cell line, treatment with ASA at concentrations of 1.5, 2.0 and 2.5 mM caused decrease the number of viable cells, 48 hours after exposure. At 72 h of induction, all concentrations were capable of to decrease the number of viable cells (Figure 1 C). The ASA treatment did not have a cytotoxic effect in any of the cell lines (Figure 1 B and D). Take these results, the concentration of 1 mM was chosen for the subsequent analyzes, since it was the lowest concentration that caused effect in both cell lines.

#### **3.2. Sensitivity of K562 cell line to Zileuton by the MTT assay**

Neither of the Zil concentrations showed cytotoxic effect, since it did not decrease mitochondrial activity in the K562 cell line at all analysis times. However, treatment with 10  $\mu$ M concentration resulted in an increase in mitochondrial activity 72h after exposure (Fig. 2). As noone concentration showed cytotoxic effect, the concentration of 20  $\mu$ M was chosen for the subsequent analyzes, since its ability to inhibit 5-LOX is known for K562 line [28,29].

#### **3.3. Gene expression**

##### **3.3.1. Gene expression after gene silencing of *ABCBI* gene**

The K562-Lucena and FEPS silenced cell lines showed a decrease in *ABCBI* gene expression, confirming the effectiveness of the silencing. The silenced cells also presented a decrease in the *COX2* gene expression. The expression of the *ALOX5* gene was increased after silencing in both cell lines (Fig. 3).

##### **3.3.2. Gene expression after exposure to ASA in cells MDR**

The treatment with ASA induced an increase in *COX2* gene expression in both K562-Lucena and FEPS cell lines. This increase was also observed for the *ABCBI* gene. In contrast, *ALOX5* gene had its expression decreased in the FEPS cells and remained



unchanged in the K562-Lucena cells. Expression of *ABCC1* was not altered following inhibition of COX-2 in both cell line (Fig. 4).

### **3.3.3. Gene expression after exposure to Zileuton in the K562 cells**

Treatment with Zil induced an increase in the gene expression of *ALOX5*, but in opposite way, it was not able to alter the expression of *COX2*, *ABCC1* and *ABCB1* genes (Fig. 5).

### **3.4. Protein expression of ABCB1**

After demonstrating that the treatment with ASA was able to alter the gene expression of *ABCB1*, we analyzed the expression of the protein encoded by this gene. Exposure to COX-2 inhibitor increased the expression of ABCB1 in comparison with the control for both K562-Lucena and FEPS cells (Fig. 6 A, 6B). Protein expression of ABCB1 was also analyzed in the K562 cells following treatment with Zileuton, however inhibition of 5-LOX was not able to affect the protein expression of ABCB1 (Fig. 6C).

### **3.5. Protein-ligand docking**

Molecular docking experiments estimated a lower free-binding energy (FEB) for PGs (-7.3 Kcal / mol) when compared to aspirin (-6.0 Kcal / mol). The final position predicted was located within the same cavity of the binding site for both ligands (Fig. 7).

### **3.6. Activity of ABCB1 efflux protein in the presence of ASA**

The extrusion capacity of the dye in the treated K562-Lucena and FEPS cells was compared to the control group. Treatment with ASA (48h) showed a decreasing tendency in ABCB1 activity, however, was not significantly different from control (8A e 8B). Exposition to ASA during the assay (ASA 0h) induced an increase in ABCB1 activity only in the K562-Lucena cell line (compared to the control group by Student's t-test) (Fig 8A).

### **3.6. Production of nitric oxide in erythroleukemic lines**

The production of nitric oxide was analyzed in the Zil-treated K562 cell line and after the AAS treatment in the K562-Lucena and FEPS. The basal levels of nitrite accumulation of the K562, K562-Lucena and FEPS cell lines were 0.93, 0.87 and 0.92  $\mu\text{M}$ , respectively. NO production levels were not affected by Zil and ASA treatment.

#### 4. Discussion

This study analyzed the relationship between inflammation and multidrug resistance phenotype (MDR) in chronic myeloid leukemia (CML), sensitive (K562) and resistant (K562-Lucena and FEPS) cells, with the aim of increasing knowledge about these cell lines and find new molecular targets for the treatment of leukemia. We demonstrated the relationship between COX-2 and ABCB1 in the K562-Lucena and FEPS. From the results, we show that modulation of *COX2* alters the *ABCB1* gene, once the gene silencing of *ABCB1* was capable of decreasing *COX2* expression. Moreover, we confirmed that in these cell lines the regulation pathway of *ALOX5* by *ABCB1* is not dependent on the regulation of the *COX2* pathway.

As long as *COX2* had higher expression in relation to K562, the K562-Lucena and FEPS cell lines were treated with acetylsalicylic acid (ASA), a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) widely used for inhibition of the COX-2 enzyme. Through the number of viable cells analyzed by the Trypan blue assay, the FEPS cell line was more sensitive than K562-Lucena and its number of cells was affected by the concentration of 0.5 mM. However, this effect was only observed 72h after exposure to the drug, whereas for the K562-Lucena cell the effect was perceived in 48h with a higher concentration (1 mM) (Fig. 1A, 1C). This result can be explained by the fact that the FEPS cells presents a slower doubling rate than the K562-Lucena cells [18], associated with the fact that probably the effect of ASA on the mitotic process is only perceived when most cells are dividing (after 72h). Our sensitivity results corroborate with the study by Carret-Dias [30] which confirm that ASA is a potential drug with anti-MDR action, exerting a greater effect on cells with MDR phenotype.

The K562 cell line was treated with Zileuton (Zil) to inhibit 5-LOX, since it had a higher expression of *ALOX5* compared to the K562-Lucena and FEPS cell lines [22]. The mitochondrial activity measured by the MTT assay was not decreased after treatment with Zil, revealing that the modulation of 5-LOX activity did not interfere in the cell viability of the K562 cells (Fig 2). These results show that treatment with clinically relevant concentrations [31] of Zil does not affect the sensitivity of K562 different of other types of cancer in which 5-LOX inhibition is antiproliferative [32, 33, 34, 35].

It is possible that the use of higher concentrations of Zil is more effective in suppressing K562 cell viability, otherwise, but inhibition of cell duplication by 5-LOX inhibitors may affect several cell pathways not directly related to 5-LOX activity [36], which is not the focus of our study. Besides to not suppressing cell viability, the 10  $\mu$ M

concentration of Zil stimulated the mitochondrial activity of K562 72h after exposure (Fig. 2). This stimulus may have occurred mainly because treatment with low concentrations of Zil would be activating the transcription of *ALOX5* and the product of the 5-LOX gene, increasing production of leukotrienes which is an important pathway for growth and survival of CML cells [31].

Although Zil does not show an antiproliferative effect on the K562 cells, it induced increase of gene expression of *ALOX5* (Fig. 5) that may be acting on cell signaling pathways related, for example, to cell indifferenciation. Thus, the cell needs to activate mechanisms to increase the transcription of this gene, increasing its energy expenditure which would explain the greater mitochondrial activity observed in the MTT assay. It is known that *ALOX5* plays a critical role as a regulator of leukemic stem cells in CML [37], being this gene important for the survival of the K562 cells.

In this context, we sought to modulate the expression of *ALOX5* via inhibition of 5-LOX in the K562 cell line and later to evaluate the possible regulation effect on the expression of *COX2* and *ABCB1*. Our results showed that the expression of *ALOX5* increased by exposure to Zileuton did not generate effects of these genes (Fig. 5). In fact, that the *ALOX5* gene has no regulatory effect on *ABCB1* in the K562 cell (Fig. 7C) line and this may indicate that increased *ABCB1* expression and decreased *ALOX5* during selection of the K562-Lucena and FEPS cell lines are not due to *ALOX5* signaling.

We then analyzed whether modulation of *COX2* by exposure to ASA would influence *ALOX5* expression. Our results revealed that treatment with the COX-2 inhibitor was able to alter the expression of *COX2* and *ALOX5* only for the FEPS cell line, since the induction in *COX2* expression was accompanied by the decrease of *ALOX5* (Fig. 4B). As observed in the basal expression of these genes, the correlation of *COX2* and *ALOX5* gene expression is inverse, where the high expression of one of the genes is accompanied by the low expression of the other. This correlation could occur via regulation of *ABCB1*.

In order to confirm this hypothesis, we used cells in which the expression of *ABCB1* was altered (silenced) and evaluated the effect on *ALOX5* and *COX2*. In the K562-Lucena and FEPS silenced cell lines, we observed a pattern of gene expression like the K562 sensitive cell line: high expression of *ALOX5* and low expression of *COX2* and *ABCB1* (Fig. 3). In these cells, the decrease of *ABCB1* would be signaling for an increase in *ALOX5* expression and decrease of *COX2*. This hypothesis is also confirmed in the FEPS cell line treated with ASA. Interestingly, the increase of the *COX2* gene would be

stimulating *ABCB1* and in turn would be decreasing the expression of *ALOX5* (Fig. 4). The direct relationship between *COX2* and *ABCB1* and the inverse of *ALOX5* was observed in a study with the K562-Lucena cell line, in which treatment with C-phycoerythrin increased the gene expression of *COX2* and *ABCB1*, while *ALOX5* expression was decreased [21].

These results show that whenever *ABCB1* expression was altered (augmented or decreased), there was also a change in the *ALOX5* gene, but in the reverse way. Therefore, the decrease in *ALOX5* that occurs during the selective (chemotherapeutic-induced) pressure for the generation of MDR mechanisms in the K562 cells may be dependent on the overexpression of *ABCB1*. Recent studies have pointed to the role of ABC transporters, including ABCB1, as exporters of lipids and signaling molecules that promote tumor progression and cancer-associated inflammation [38]. Thus, ABCB1 can act in the regulation of the expression of *ALOX5* through the transport of lipid mediators that act in the modulation of this gene.

It is interesting to emphasize that the signaling mechanisms related to the induction of the inflammatory process by the arachidonic acid metabolism pathway of the erythroleukemic lines are distinct from other types of cancers that present high expression of 5-LOX and COX-2 [10]. Our studies have shown that treatment with COX-2 inhibitor does not necessarily lead to the derivation of inflammatory pathways via 5-LOX, and exposure to the 5-LOX inhibitor also does not stimulate COX-2. Thus, in the cell lines used in this study, the correlation between *ALOX5* and ABCB1 does not necessarily depend on a change in the *COX2* pathway.

After characterizing the relationship between the *COX2* and *ALOX5* genes, we evaluated the effect of *COX2* modulation on genes related to the MDR phenotype: *ABCB1* and *ABCC1*. In treating the cells with an inhibitor of the *COX2* gene product we noticed an increase in the expression of this gene, which may indicate the efficiency of COX-2 protein suppression (Fig 4). We presume that in the initial exposure to ASA inhibits the COX-2 enzyme which activated a compensatory mechanism increasing the gene expression observed 48h after exposure. This increase in mRNA was converted into an increase in the synthesis of COX-2 and prostaglandins (PGs). These findings suggest that cellular pathways involving the COX-2 enzyme play an important role in the carcinogenesis associated with PGs production in K562-Lucena and FEPS cells. Results from the literature show that increased production of PGs in cancerous tissues, especially PGE<sub>2</sub>, increases the growth of tumor cells [39], and suppression of COX-2 activity in

leukemia cells exhibiting the MDR phenotype leads to reduced PG production and consequent inhibition of cell growth [17].

The relevance of COX-2 to MDR lines is again evidenced when modulation of the *COX2* gene was accompanied by an increase expression of the *ABCB1* gene (Fig. 4). Studies on different cell types show that COX-2, as well as its products, are able to positively regulate the expression of *ABCB1* mRNA [40]. It is likely that in the K562-Lucena and FEPS cell lines, COX-2 leads to induction of *ABCB1* due to an increase in the production of PGs and possible activation of Nuclear Kappa B Factor (NF-kB). Studies have shown that NF-KB can regulate the expression of *ABCB1* in adriamycin and imatinib resistant (K562) leukemia cells [41,20]. Thus, COX-2 leads to induction of *ABCB1* via PGs, which in turn activates a signaling pathway that results in the activation and transfer of NF-kB to the nucleus [13,20]. As a transcription factor, NF-KB binds to a promoter region of the *ABCB1* gene, activating its expression (42,13].

Our results from *in silico* evaluation through molecular *docking* demonstrate that PGE<sub>2</sub> has higher affinity for *ABCB1* compared to ASA, since it has lower binding energy and is probably the preferred ligand. It is therefore possible that the effects generated during prolonged exposure to ASA on gene and protein expression are due to the increase of PGE<sub>2</sub> and its binding to the *ABCB1* protein. Molecular *docking* has also demonstrated that the binding site of ASA and PGE<sub>2</sub> are very similar, practically in the same region of *ABCB1* (Fig 6). Specifically, these two molecules were located in the transmembrane domains of *ABCB1*, and it is possible that this region plays a prominent role in the binding of molecules involved in the pro and anti-inflammatory cascade.

Another protein related to the MDR phenotype is *ABCC1*, which is overexpressed by the FEPS line [20]. *ABCC* transporters are involved in the trafficking of lipids and inflammatory mediators, such as leukotrienes and PGs [38]. PGs are substrates for *ABCC1* and can be transported alone [43] or conjugated with glutathione [44] altering pump activity. Nevertheless, treatment with ASA and inhibition of *COX2* had no effect on the *ABCC1* gene expression, so the decrease in COX-2 activity and alteration in prostaglandin production did not significantly modulate the *ABCC1* gene expression (Fig 4).

After we checked the increase of *ABCB1* gene expression in AAS-treated cells, we performed labeling with anti-*ABCB1* antibody to evaluate the protein expression of *ABCB1* in these cells. It is likely that the increase in *ABCB1* observed is due to increased

mRNA levels, which has been converted into an increase in its protein synthesis (Fig 7A, 7B).

In order to further understand the biological effects resulting from increased gene and protein expression of ABCB1, we performed Rho123 accumulation assays to evaluate the activity of ABCB1. Our results revealed that the ASA added at the time of the assay (0h) may be acting as a substrate for ABCB1, since its activity was higher when compared to the control group. We believe that exposure to the drug stimulates the activity of ABCB1, which transports the AAS and Rho123 out of the cell, resulting in a lower fluorescence as observed for the K562-Lucena cell (Fig. 8A). Molecular docking confirms that although it is not the preferred ligand, ASA is capable of binding to the structure of ABCB1 (Fig. 6). This result was not observed for the FEPS cell line due to its high basal extrusion capacity, transporting almost all the dye outside the cell, and it was not possible to observe a significant difference between the control and ASA (0h) (Fig 8B).

Furthermore, our results show that 48 h after exposure to ASA, ABCB1 activity returns to its normal levels and possibly carries PGs produced after the induction of *COX2* gene expression, which would explain a slight increase in fluorescence due to accumulation of dye in the cells, when compared to the control (Fig. 8).

Studies on resistant tumor cells have shown that increased levels of nitric oxide (NO) via inducible nitric oxide synthase (iNOS) are able to stimulate COX-2 overexpression [45,46]. NO exert diverse role in tumor biology, being an important mediator of signaling cascades that stimulate the growth of tumor cells [47]. To better understand the relationship between inflammation and the cell resistance phenotype, we performed for the first time a comparative study of baseline NO levels in the K562, K562-Lucena and FEPS cell lines.

We observed that the basal NO levels in the studied cell lines are low (less than 2  $\mu$ M), when compared to the values obtained in the standard curve of nitrite accumulation. Although the K562-Lucena and FEPS cell lines show a different phenotype of K562 parental cell line, NO levels do not differ, which may indicate that this molecule does not act directly in the signaling process in MDR cells. Moreover, treatment with 5-LOX and COX-2 inhibitors was not able to alter NO levels after 48 hours of exposure (Fig. 9). In the K562-Lucena and FEPS cell lines, the mechanism of regulation of inflammation involving *COX2* should not be directly mediated by the induction of NO. This characterization of the inflammatory profile via NO of the erythroleukemia cell lines is

interesting, once it proves that it is not always possible to seek treatments based on results obtained in other tumor lines, and the characterization of each tumor type is fundamental for the development of more specific treatments.

## 5. Conclusion

We conclude that in the K562, K562-Lucena and FEPS cell lines there is a positive correlation between the *COX2* and *ABCB1* genes. As same as in other types of cancer, modulation of COX-2 by ASA was able to alter the expression of ABCB1. In addition, the silencing of the *ABCB1* gene was accompanied by a decrease in the expression of *COX2*. In these cell lines studied, when the *ABCB1* gene was altered *ALOX5* expression was also modified, however, in a reverse manner, independently of the *COX2* alteration. Based on these results, we presume the *COX2* and *ABCB1* genes are correlated in the erythroleukemic cells and are upregulated during the transformation of the K562 cell line. This increase of *ABCB1* during the selection of these MDR cell lines may be regulates the expression of *ALOX5*, explaining the expression profile presented by these lines.

## 6. Acknowledgments

The author thanks Dr. Vivian Rumjanek (Laboratório de Imunologia Tumoral of Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil) for providing and allowing the use of the K562-Lucena and FEPS cell lines. This work was supported by the National Program for Academic Cooperation (PROCAD/CAPES) [grant numbers 2951/2014]. Salgado, MTSF. received a graduate fellowship from CAPES.

## 7. References

- [1] Shalapour, S., Karin, M. 2015. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest.* 125, 3347-3355.
- [2] Munn, L.L., 2017. Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 9, e1370.
- [3] Candido, J., Hagemann, T., 2013. Cancer-Related Inflammation. *J. Clin. Immunol.* 33, 79–84.
- [4] Schreiber-Servan David. 2011. *Anticancer*. 2° ed. Objetiva. Rio de janeiro.

- [5] Smith, W.L., Murphy, R.C., 2016. The Eicosanoids: Cyclooxygenase, Lipoxygenase and Epoxygenase Pathways. *Biochem. Lipids, Lipoproteins Membr.* 259–296.
- [6] Ye, Y.N., Wu, W.K.K., Shin, V.Y., Bruce, I.C., Wong, B.C.Y., Cho, C.H., 2005. Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses colon cancer formation promoted by cigarette smoke. *Carcinogenesis* 26, 827–834.
- [7] Ding, X., Zhu, C., Qiang, H., Zhou, X., Zhou, G., 2011. Enhancing antitumor effects in pancreatic cancer cells by combined use of COX-2 and 5-LOX inhibitors. *Biomed. Pharmacother.* 65, 486–490.
- [8] Altavilla D., Minutoli, L., Polito, F., Irrera, N., Arena, S., Magno, C., et al. Effects of flavocoxid, a dual inhibitor of COX and 5-lipoxygenase enzymes, on benign prostatic hyperplasia. 2012. *Br J Pharmacol.* 167, 95–108
- [9] Wang, D., Dubois, R.N., 2010. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 181–193.
- [10] Gautam, S., Roy, S., Ansari, M.N., Saeedan, A.S., Saraf, S.A., Kaithwas, G., 2017. DuCLOX-2/5 inhibition: a promising target for cancer chemoprevention. *Breast Cancer* 24, 180–190.
- [11] Reddy, K.K., Vidya Rajan, V.K., Gupta, A., Aparoy, P., Reddanna, P., 2015. Exploration of binding site pattern in arachidonic acid metabolizing enzymes, Cyclooxygenases and Lipoxygenases. *BMC Res. Notes* 8, 152.
- [12] Achari, C., V. Reddy, G., C.M. Reddy, T., Reddanna, P., 2011. Chebulagic Acid Synergizes the Cytotoxicity of Doxorubicin in Human Hepatocellular Carcinoma Through COX-2 Dependant Modulation of MDR-1. *Med. Chem. (Los. Angeles).* 7, 432–442.
- [13] Gu, K.-S., Chen, Y., 2012. Mechanism of P-glycoprotein Expression in the SGC7901 Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line Induced by Cyclooxygenase-2. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 13, 2379–2383.
- [14] Gottesman, M.M., 2002. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Med.* 53, 615–627.
- [15] Zhang, Q., Feng, Y., Kennedy, D., 2017. Multidrug-resistant cancer cells and cancer stem cells hijack cellular systems to circumvent systemic therapies, can natural products reverse this? *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 777–801.
- [16] Pan, S.-T., Li, Z.-L., He, Z.-X., Qiu, J.-X., Zhou, S.-F., 2016. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 43, 723–737.
- [17] 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., 2001. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73, 57–69.
- [18] Daflon-Yunes, N., Pinto-Silva, F.E., Vidal, R.S., Novis, B.F., Berguetti, T., Lopes, R.R.S., Polycarpo, C., Rumjanek, V.M., 2013. Characterization of a multidrug-resistant



chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* 383, 123–135.

[19] Arunasree, K.M., Roy, K.R., Anilkumar, K., Aparna, A., Reddy, G.V., Reddanna, P., 2008. Imatinib-resistant K562 cells are more sensitive to celecoxib, a selective COX-2 inhibitor: Role of COX-2 and MDR-1. *Leuk. Res.* 32, 855–864.

[20] Dharmapuri, G., Doneti, R., Philip, G.H., Kalle, A.M., 2015. Celecoxib sensitizes imatinib-resistant K562 cells to imatinib by inhibiting MRP1-5, ABCA2 and ABCG2 transporters via Wnt and Ras signaling pathways. *Leuk. Res.* 39, 696–701.

[21] Fernandes e Silva, E., Figueira, F.S., Lettnin, A.P., Salgado, M.T.S.F., Lopes, A.C., Rehbein, F., Kalil, S.J., Votto, A.P.S., 2018. Modulation of reactive oxygen levels and gene expression in sensitive and resistant tumoral cells by C-phyocyanin. *Mol. Biol. Rep.* 0, 0.

[22] Carrett-Dias, M., Almeida, L.K., Pereira, J.L., Almeida, D.V., Filgueira, D.M.V.B., Marins, L.F., Votto, A.P. de S., Trindade, G.S., 2016. Cell differentiation and the multiple drug resistance phenotype in human erythroleukemic cells. *Leuk. Res.* 42, 13–20.

[23] Vogel, A. I. 1971 *Química Orgânica-Análise Orgânica Qualitativa*, Vol. 1, 3rd edn, pp. 136–154, O livro técnico S. A., Rio de Janeiro.

[24] Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.

[25] Baspinar, A., Cukuroglu, E., Nussinov, R., Keskin, O., Gursoy, A., 2014. PRISM: a web server and repository for prediction of protein-protein interactions and modeling their 3D complexes. *Nucleic Acids Res.* 42, W285-9.

[26] Irwin, J.J., Shoichet, B.K., 2005. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* 45, 177–82.

[27] Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–61.

[28] Haynes, J., Baliga, B.S., Obiako, B., Ofori-Acquah, S., Pace, B., 2004. Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the l-arginine–nitric oxide signaling pathway. *Blood* 103, 3945–3950.

[29] Woessner, D.W., Lim, C.S., 2013. Disrupting BCR-ABL in Combination with Secondary Leukemia-Specific Pathways in CML Cells Leads to Enhanced Apoptosis and Decreased Proliferation. *Mol. Pharm.* 10, 270–277.

[30] Carrett-Dias, M., Votto, A.P., Filgueira D.M., Almeida, DV., Vallochi, A.L., D'Oca, MG., Marins, L.F., Trindade, G.S. 2011. Anti-mdr and antitumoral action of acetylsalicylic acid on leukaemic cells. *Biosci. Rep.* 31: 391–398.

- [31] Yektaei-Karin, E., Zovko, A., Nilsson, A., Näsman-Glaser, B., Kanter, L., Rådmark, O., Wallvik, J., Ekblom, M., Dolinska, M., Qian, H., Stenke, L., 2017. Modulation of leukotriene signaling inhibiting cell growth in chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* 58, 1903–1913.
- [32] Chen, X. Wang S, Wu N, Sood S *et al.* 2004. Overexpression of 5-lipoxygenase in rat and human esophageal adenocarcinoma and inhibitory effects of zileuton and celecoxib on carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* 10, 6703–6709.
- [33] Li, N., Sood, S., Wang, S., Fang, M., Wang, P., Sun, Z., Yang, C.S., Chen, X., 2005. Overexpression of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase 2 in hamster and human oral cancer and chemopreventive effects of zileuton and celecoxib. *Clin. Cancer Res.* 11, 2089–2096.
- [34] Gounaris, E., Heiferman, M.J., Heiferman, J.R., Shrivastav, M., Vitello, D., et al., 2015. Zileuton, 5-lipoxygenase inhibitor, acts as a chemopreventive agent in intestinal polyposis, by modulating polyp and systemic inflammation. *PLoS One* 10, e0121402.
- [35] Zhou, G.-X., Ding, X.-L., Wu, S.-B., Zhang, H.-F., Cao, W., Qu, L.-S., Zhang, H., 2015. Inhibition of 5-lipoxygenase triggers apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncol. Rep.* 33, 661–668.
- [36] Fischer, A.S., Metzner, J., Steinbrink, S.D., Ulrich, S., Angioni, C., Geisslinger, G., Steinhilber, D., Maier, T.J., 2010. 5-Lipoxygenase inhibitors induce potent anti-proliferative and cytotoxic effects in human tumour cells independently of suppression of 5-lipoxygenase activity. *Br. J. Pharmacol.* 161, 936–949.
- [37] Chen, Y., Li, D., Li, S., 2009. The Alox5 gene is a novel therapeutic target in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle* 8, 3488–3492.
- [38] Domenichini, A., Adamska, A., Falasca, M., 2019. ABC transporters as cancer drivers: Potential functions in cancer development. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1863, 52–60.
- [39] Cao, Y., Prescott, S.M., 2002. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J. Cell. Physiol.* 190, 279–286.
- [40] Sorokin, A., 2004. Cyclooxygenase-2: Potential Role in Regulation of Drug Efflux and Multidrug Resistance Phenotype. *Curr. Pharm. Des.* 10, 647–657.
- [41] Yang N, Zhai J, Wang D, Chen Y, Jiang L. 2010. The study of the reversal effect of PDTC on multidrug resistance of K562/AO\_2 cells and its mechanism. *ACS Nano* 4, 887.
- [42] Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M.-P., Bours, V., 2003. NF- $\kappa$ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 22, 90–97.
- [43] de Waart DR., Paulusma CC., Kunne C, Oude Elferink, RP. 2006. Multidrug resistance associated protein 2 mediates transport of prostaglandin E2. *Liver Int.* 26: 362–368.

[44] Evers, R, Cnubben NH, Wijnholds J, van Deemter L *et al.* 1997. Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1. *FEBS Lett.* 419, 112–116.

[45] Fantappiè, O., Masini, E., Sardi, I., Raimondi, L., Bani, D., Solazzo, M., Vannacci, A., Mazzanti, R., 2002. The MDR phenotype is associated with the expression of COX-2 and iNOS in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatology* 35, 843–852.

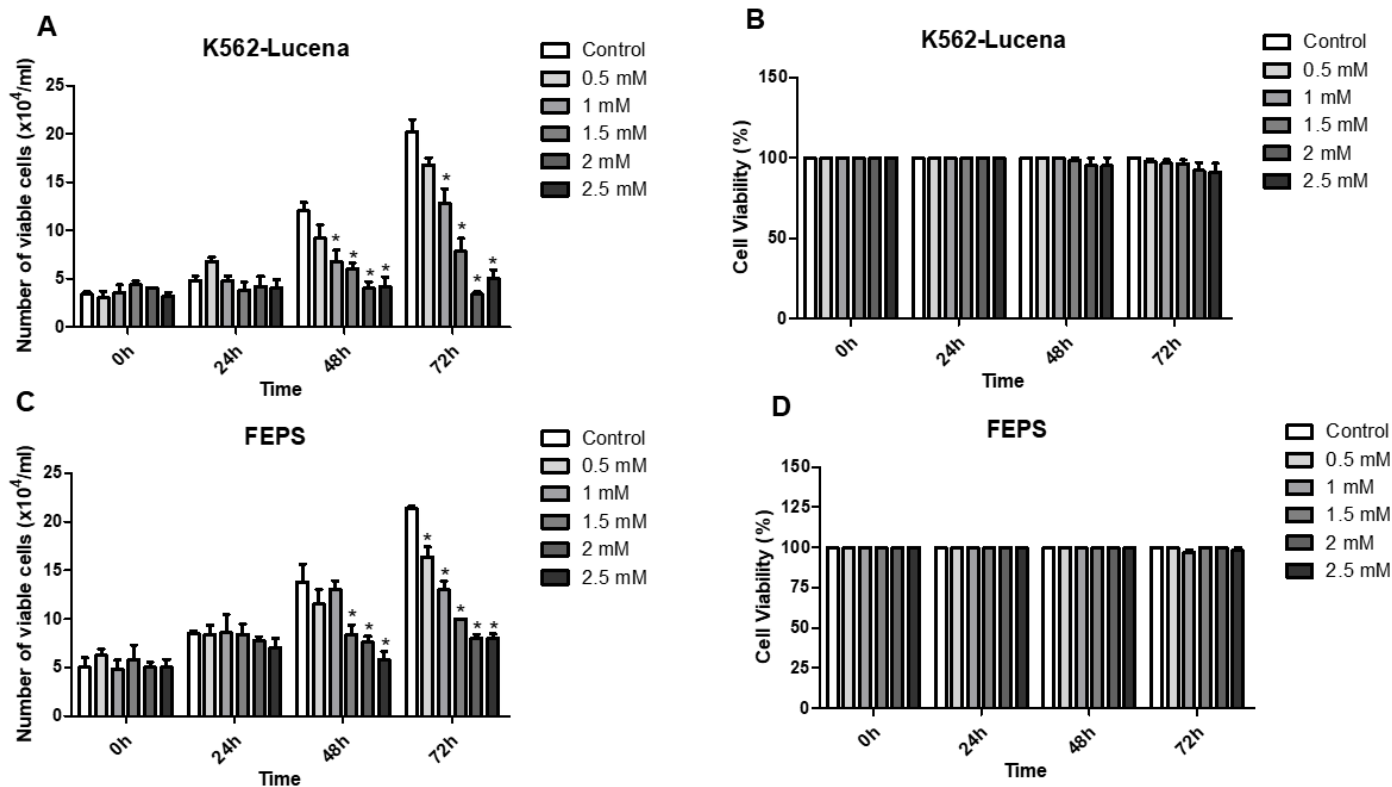
[46] Fantappiè O, Sassoli C, Tani A, Nosi D, Marchetti S, Formigli L, Mazzanti R. 2015. Mitochondria of a human multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell line constitutively express inducible nitric oxide synthase in the inner membrane. *J Cell Mol Med.* 19: 1410–1417.

[47] Ridnour, L. A., Cheng, R. Y. S., Weiss, J. M., Kaur, S., Soto-Pantoja, D. R., Basudhar, D., et al. 2015. NOS inhibition modulates immune polarization and improves radiation-induced tumor growth delay. *Cancer Res.* 75, 2788–2799.

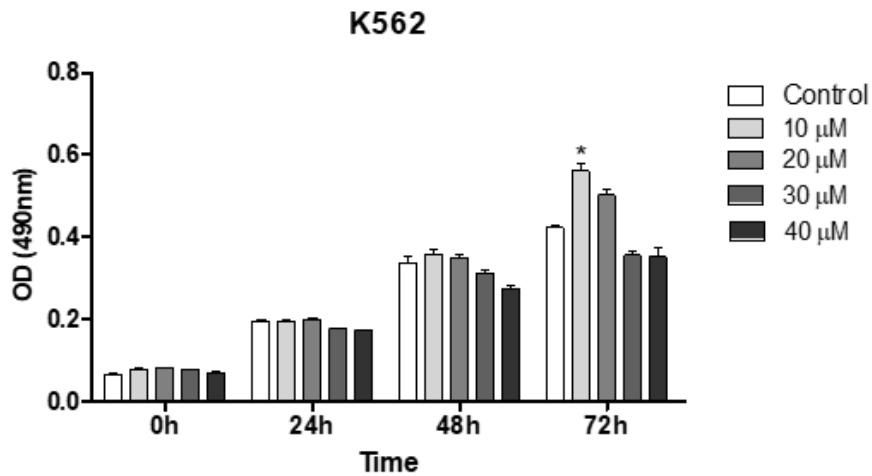
Table 1: Primers sequences used in gene expression analysis

Gene	Primers sequence 5'-3'	Primers Efficiency (%)	GenBank Accession Number
<i>ABCB1</i>	F: CCTCAGTCAAGTTCAGAGTCTTCA R: CTCCACTTGATGATGTCTCTCACT	102,01	NM_000927
<i>ABCC1</i>	F: GGATCTCTCCAGCCGAAGTCT R: GTGATGGGAGCCAGAAGCA	99,25	XM_017023237.1
<i>ALOX5</i>	F: GTGGCGCGGTGGATTC R: TGGATCTCGCCAGTTCCT	94,99	XM_011539564
<i>COX2</i>	F: ACGCTTTATGCTGAAGCCCT R: GCCGAGGCTTTTCTACCAGA	102.51	NC_000001.11
<i>EF1α</i>	F: GCCAGTGGAACCACGCTGCT R: ATCCTGGAGAGGCAGGCGCA	103,14	NM_001402
<i>B2M</i>	F: CTCACGTCATCCAGCAGAGAA R: TCGGATGGATGAAACCCAGAC	98,19	NM_004048.2

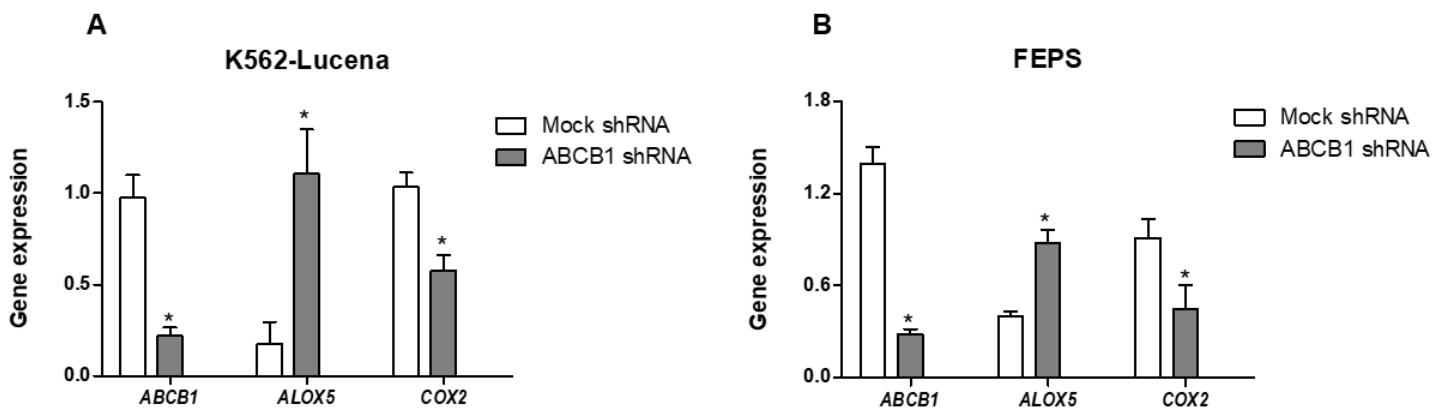
*ABCB1*: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), *ABCC1*: ATP Binding Cassette, subfamily C (MRP1), *ALOX5* arachidonate 5-lipoxygenase (5-LOX), *COX2* prostaglandin-endoperoxide synthase 2/ Cyclooxygenase 2, *EF1α*: eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, *B2M*: Beta-2-Microglobulin



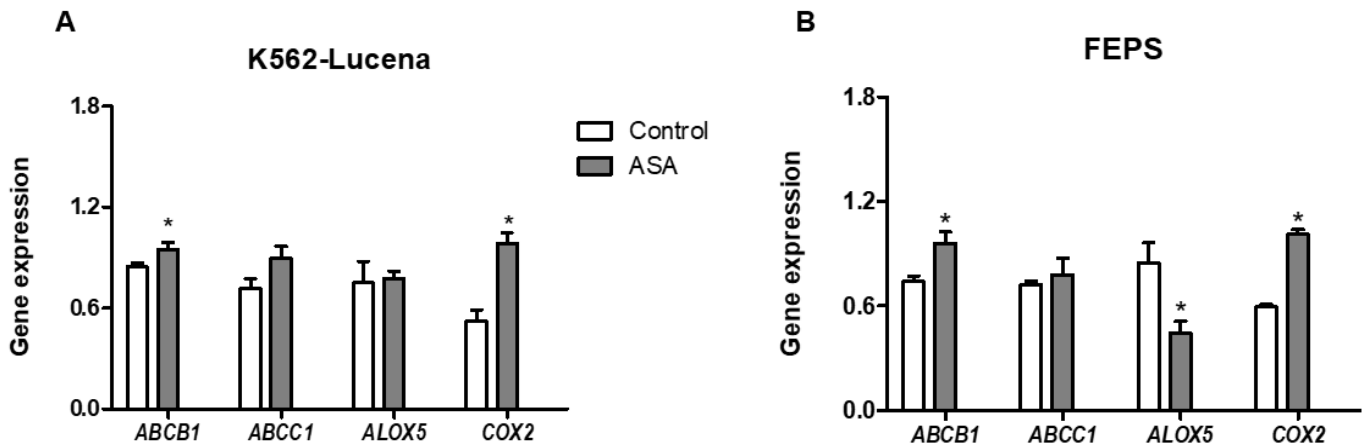
**Fig 1: Viable cell number and cellular viability of K562-Lucena and FEPS cell lines to ASA.** Trypan blue assay. Number of viable cells ( $\times 10^4$ ) and cell viability (%) of K562-Lucena (A, B) e FEPS (C, D) cell lines treated with different concentrations of ASA at different times of exposure, according to Trypan Blue exclusion test. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M and (\*) indicate  $p < 0.05$  when compared with control at each time by the ANOVA test followed by Tukey,  $n=5$ .



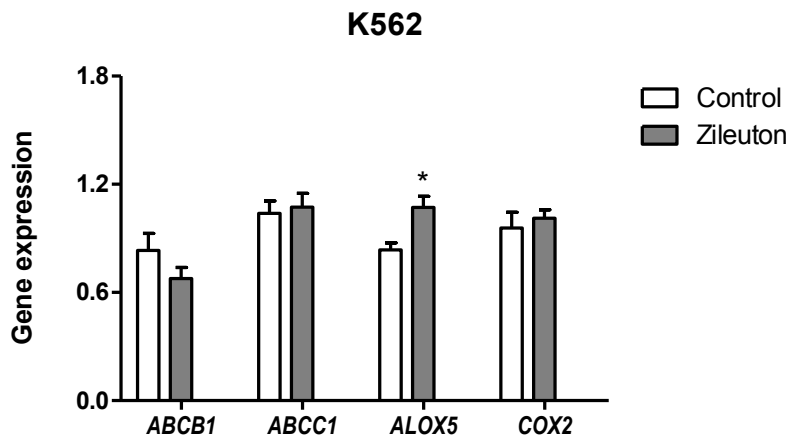
**Fig 2: Mitochondrial activity of K562 cell line to Zileuton.** MTT assay. Optical density (OD) of K562 cell line after exposure to Zil for until 72 h, analyzed by the MTT assay. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M and (\*) indicate  $p < 0.05$  when compared with control at each time by the ANOVA test followed by *Tukey*,  $n=5$ .



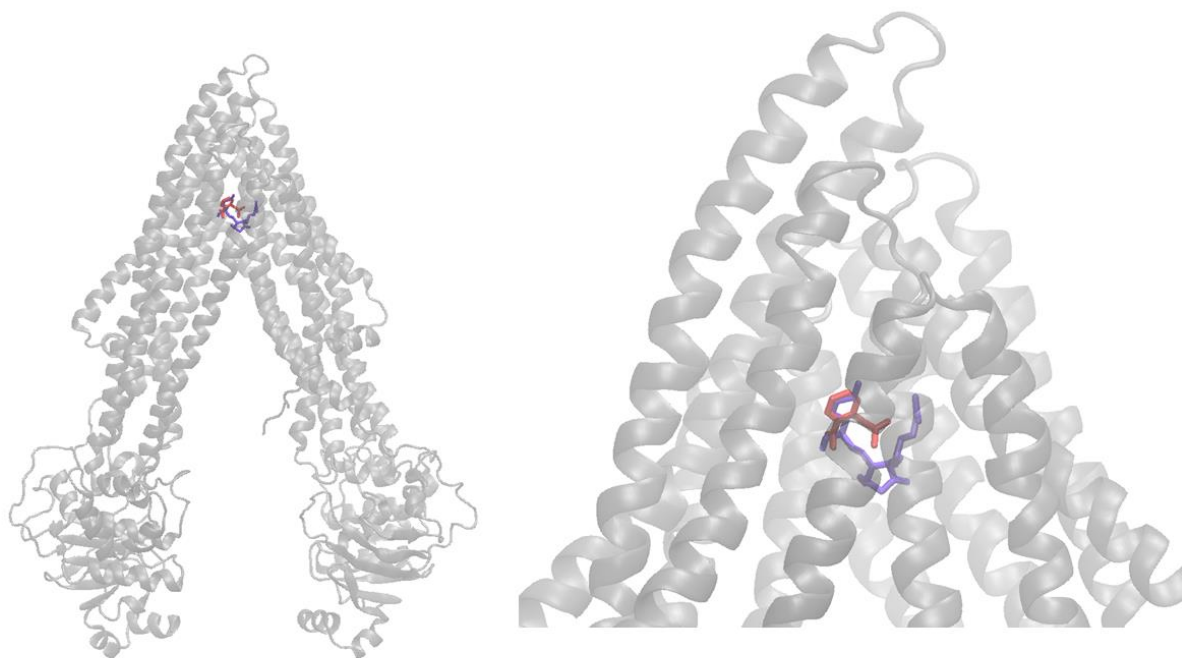
**Fig 3: Gene expression after gene silencing of ABCB1.** Gene expression cells silenced. Gene expression of *ABCB1*, *ALOX5* and *COX2* in K562-Lucena (A) and FEPS (B) cell lines silenced for gene *ABCB1*. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M and (\*) indicate  $p < 0.05$  when compared with control (Mock) by t-test,  $n=5$ .



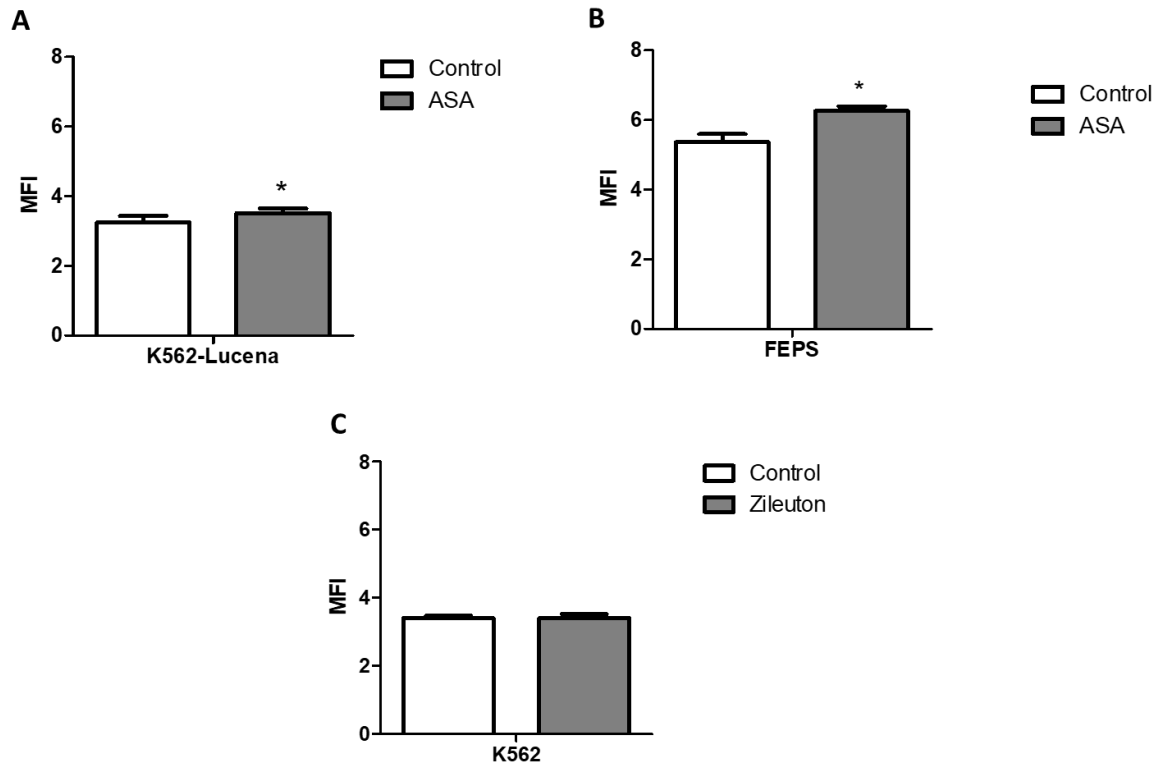
**Fig 4: Gene expression after exposure to ASA in K562-Lucena and FEPS cell lines.** Gene expression after treatment with ASA. Gene expression of *ABCB1*, *ABCC1*, *ALOX5* and *COX2* in K562-Lucena (A) and FEPS (B) of cells treated with 1 mM ASA for 48 h. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M and (\*) indicate  $p < 0.05$  when compared with control (Mock) by t-test,  $n=5$ .



**Fig 5: Gene expression after the inhibition of 5-LOX by exposure to Zileuton in the K562 cells.** Gene expression after exposure at Zil. Gene expression of *ABCB1*, *ALOX5* and *COX2* in K562 cell line treated with 20  $\mu$ M Zil at 48 h. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M and (\*) indicate  $p < 0.05$  when compared with control (Mock) by t-test,  $n=5$ .

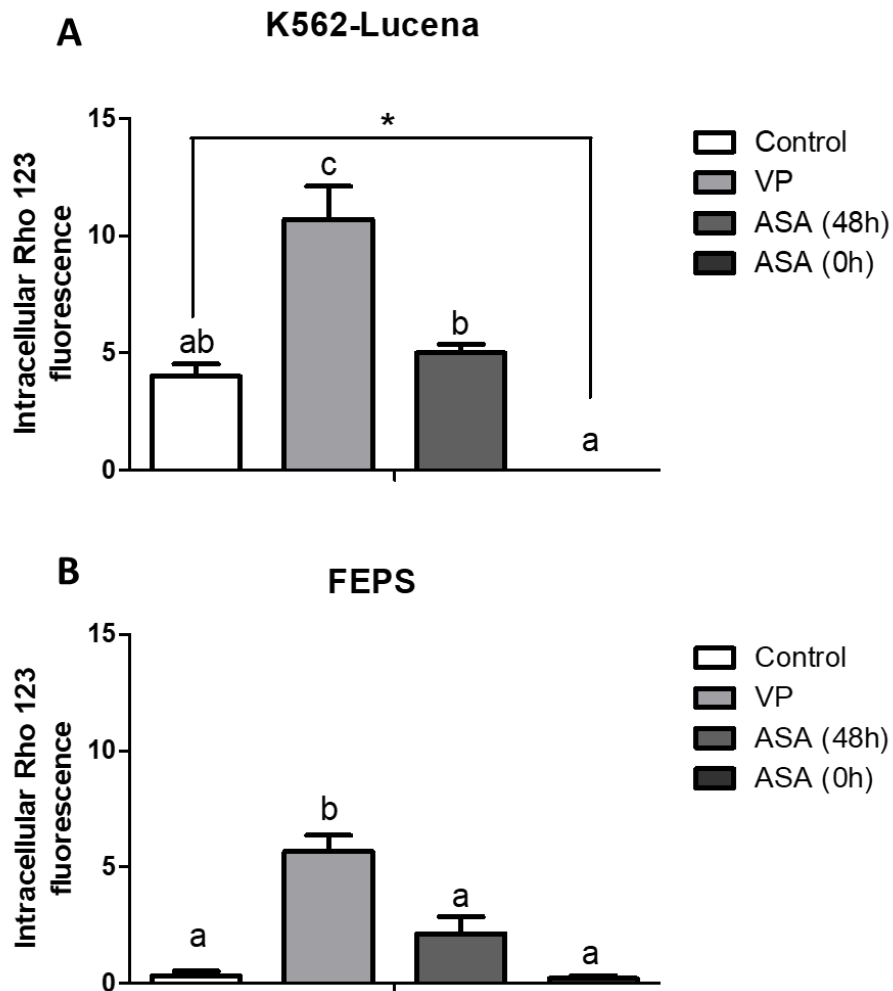


**Fig 6: Protein-ligand docking ABCB1:** Interaction of ASA (red) and Prostaglandin E2 (violet) ligands on the ABCB1 protein structure Protein ABCB1 (Grey).

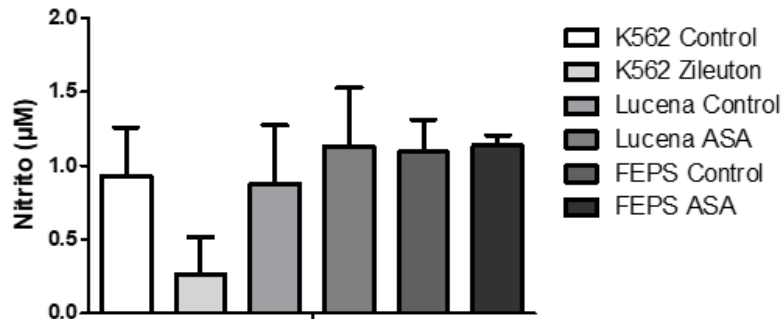


**Fig 7: Protein expression of ABCB1 after exposure to ASA.** Protein expression of ABCB1. Median fluorescence intensity of ABCB1 in K562-Lucena (A) and FEPS (B) cells treated with ASA and K562 (C) after treatment with Zil, at 48 h. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M and (\*) indicate  $p < 0.05$  when compared with control by t-test,  $n=3$ .





**Fig 8: Activity of ABCB1 efflux protein in the presence of ASA.** ABCB1 activity based on Rhodamine accumulation in K562-Lucena and FEPS cells. Fluorescence intensity/cell in K562-Lucena (A) and FEPS (B) treated with 1 mM of ASA during 48h or during the Rhodamine assay, and cells that did not receive ASA treatment with and without verapamil (VP). Results are expressed as means  $\pm$ S.E.M. Different letters indicate statistical difference between treatments by the ANOVA test followed by Tukey ( $p < 0.05$ ),  $n=3$ . \* indicate statistical difference when compared by t-test.



**Fig 9: Production of nitric oxide in cell lines K562, K562-Lucena e FEPS after treatments with inhibitors.** NO production in erythroleukemic cells. Nitrite accumulation in the culture supernatant of the K562 (Zil-treated), K562-Lucena and FEPS (ASA-treated) lines after 48 h of incubation. Nitrite was determined by the Griess assay. Results are expressed as means,  $\pm$ S.E.M. Comparison between treatments was performed by the ANOVA test followed by Tukey,  $n=3$ .

### 3. Discussão Geral

A superexpressão das enzimas 5-LOX e COX-2 em diversos tipos de neoplasias levantou o interesse na relação entre o processo inflamatório e o câncer. Vários estudos indicam que a dupla inibição dessas proteínas leva a uma alteração do metabolismo do ácido araquidônico (AA) (Gautam et al., 2017), sendo considerada um novo alvo molecular para o tratamento de alguns tipos de câncer, incluindo próstata (Altavilla et al., 2012) e cólon (Cianchi et al., 2006).

As linhagens de leucemia mielóide crônica (LMC) K562, K562-Lucena e FEPS utilizadas nessa dissertação apresentam uma expressão basal inversa dos genes *ALOX5* (codifica 5-LOX) e *COX2* (codifica COX-2). Além disso, as linhagens K562-Lucena e FEPS que apresentam o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), com alta expressão das proteínas transportadoras ABCB1 (K562-Lucena e FEPS) e ABCC1 (FEPS) possuem uma maior expressão de *COX2* e menor expressão de *ALOX5*, despertando interesse em entender a relação destes genes inflamatórios com o fenótipo MDR nas células eritroleucêmicas (Daflon-Yunes et al., 2013; Fernandes-Silva et al., 2018, Carrett-Dias et al., 2016).

Visto isso, realizamos o tratamento com inibidores de COX-2 e 5-LOX nas linhagens utilizadas neste estudo. A linhagem celular K562 que apresenta maior expressão de *ALOX5* foi tratada com Zileuton (Zil), um inibidor de 5-LOX. As linhagens K562-Lucena e FEPS que apresentam um perfil de expressão de *COX2* maior foram expostas ao ácido acetilsalicílico (AAS), um anti-inflamatório não esteroide (AINE) bastante utilizado para inibição da enzima COX-2.

O ensaio de viabilidade celular por Azul de trypan foi utilizado para avaliar a sensibilidade das linhagens K562-Lucena e FEPS ao AAS, com o intuito de eliminar as concentrações com efeito citotóxico. Nossos resultados mostraram que o AAS apresenta efeito tempo e concentração dependente. Observamos que a linhagem celular FEPS foi mais sensível ao tratamento, tendo o número de células viáveis afetado pela menor concentração utilizada (0,5 mM), porém esse efeito foi percebido apenas 72h após a exposição ao fármaco. Para a linhagem K562-Lucena o efeito foi percebido em 48h, porém com uma concentração maior (1 mM). Esse resultado pode ser explicado pelo fato da linhagem FEPS apresentar uma taxa de duplicação mais lenta que as células K562-

Lucena (Daflon-Yunes et al., 2013), associado ao fato de que provavelmente o efeito do AAS no processo mitótico só é percebido quando a maioria das células estão se dividindo (após 72h). A partir desses resultados, associado ao estudo feito por Carrett-Dias e colaboradores (2011), podemos presumir que a administração de AAS em concentrações menores que 2,5 mM tem como principal mecanismo a diminuição da duplicação celular, já as concentrações maiores que 5mM (utilizadas pelos autores) são citotóxicas e causam morte celular. Além disso, confirmamos que o AAS é um potencial fármaco com ação anti-MDR, uma vez que exerce maior efeito quanto mais resistente for a linhagem.

A sensibilidade da linhagem celular K562 ao Zil foi analisada pelo ensaio MTT. Observamos que a atividade mitocondrial não foi diminuída após o tratamento, de forma que a modulação da atividade de 5-LOX não interferiu na viabilidade celular. Esses resultados mostram que o tratamento com concentrações clinicamente relevantes (Yektaei-Karin, 2016) de Zil não afetam a sensibilidade da linhagem K562, diferente de outros tipos de câncer em que a inibição de 5-LOX tem caráter antiproliferativo (Chen et al., 2004; Li et al., 2005; Gounaris et al., 2015; Zhou et al., 2015).

É possível que a utilização de concentrações maiores de Zil seja mais efetiva para suprimir a viabilidade celular de K562. Pesquisas realizadas por Yektaei-Karin e colaboradores (2016) detectaram inibição moderada no crescimento das células K562 apenas em concentrações muito elevadas de Zil (acima de 80  $\mu$ M). No entanto, a inibição da duplicação celular por inibidores de 5-LOX pode afetar outras vias celulares não relacionadas diretamente à atividade de 5-LOX (Fischer, 2010), o que não é o foco do nosso estudo.

Outro resultado observado foi o aumento na atividade mitocondrial 72h após a exposição a concentração de 10  $\mu$ M. Esse efeito também foi observado para a concentração de 20  $\mu$ M, porém o resultado não foi estatisticamente significativo. A indução na atividade mitocondrial causada por essas concentrações, pode ter ocorrido porque o tratamento com baixas concentrações de Zil estaria ativando a transcrição gênica de *ALOX5* e consequente aumento da proteína 5-LOX, aumentando a produção de leucotrienos que é uma via importante para crescimento e sobrevivência de células da leucemia mieloide crônica (LMC) (Yektaei-Karin et al., 2016).

Apesar do tratamento com Zil na concentração de 20  $\mu$ M não mostrar efeito na viabilidade celular, este induz aumento da expressão gênica de *ALOX5* na linhagem celular K562, o qual pode estar atuando em outras vias de sinalização celular. Assim, a célula necessita ativar mecanismos para aumentar a transcrição desse gene, aumentando

seu gasto energético o que explicaria a maior atividade mitocondrial observada no ensaio de MTT. Um estudo realizado por Chen e colaboradores (2009) apontou que o gene *ALOX5* desempenha importante papel como regulador das células troncos leucêmicas na LMC, sendo esse gene importante para a sobrevivência da linhagem K562.

A modulação da expressão de *ALOX5* via exposição ao Zil não alterou a expressão de *COX2* na linhagem celular K562, indicando que alteração na via da 5-LOX não altera a expressão de *COX2*. Já a modulação da expressão gênica de *COX2* pela exposição ao AAS nas linhagens K562-Lucena e FEPS foi acompanhada pela alteração na expressão de *ALOX5* apenas na linhagem FEPS. É interessante ressaltar que esses mecanismos relacionados à indução do processo inflamatório nas linhagens eritroleucêmicas estudadas é distinto de outros tipos de cânceres que apresentam alta expressão de 5-LOX e COX-2 (Gautam et al., 2017). Nossos estudos mostram que a exposição ao inibidor de COX-2 não necessariamente leva a derivação de vias inflamatórias via 5-LOX, e a exposição ao inibidor de 5-LOX também não estimula COX-2. Assim, nas linhagens celulares utilizadas nesse estudo a diminuição na expressão de *ALOX5* nas linhagens MDR durante a seleção não é acompanhado pelo aumento de *COX2*.

Em seguida avaliamos o papel da modulação de *ALOX5* na expressão de *ABCB1*. Nossos dados mostraram que a expressão aumentada de *ALOX5* pelo tratamento com Zil na linhagem K562 não foi capaz de alterar a expressão gênica e proteica de *ABCB1*. Esses resultados indicam que o aumento da expressão de *ABCB1* e diminuição de *ALOX5* durante a seleção das linhagens K562-Lucena e FEPS não são devido a regulação de *ALOX5*, mas poderia ser via *ABCB1*.

Para confirmar essa hipótese, utilizamos células em que a expressão de *ABCB1* foi alterada (silenciadas) e avaliamos o efeito em *ALOX5* e *COX2*. Nas linhagens K562-Lucena e FEPS silenciadas, observamos um padrão de expressão gênica semelhante à linhagem sensível K562: alta expressão de *ALOX5* e baixa expressão de *COX2* e *ABCB1*. Nessas células, a diminuição de *ABCB1* estaria relacionada ao aumento na expressão de *ALOX5* e diminuição de *COX2*. Essa hipótese é confirmada na linhagem FEPS tratada com AAS, uma vez que o aumento do gene *COX2* foi acompanhado pelo aumento na expressão de *ABCB1* e diminuição na expressão de *ALOX5* (Fig. 7).

Essa relação direta entre *COX2* e *ABCB1* e inversa de *ALOX5* foi observada em um estudo com a linhagem K562-Lucena, no qual o tratamento com C-ficocianina aumentou a expressão gênica de *COX2* e *ABCB1*, enquanto a expressão de *ALOX5* foi diminuída (Fernandes e Silva et al., 2018). Em conjunto esses resultados evidenciam que

toda vez que a expressão de *ABCB1* foi alterada (aumentada ou diminuída), houve também uma alteração no gene *ALOX5* no sentido inverso. Então, a diminuição de *ALOX5* que ocorre durante a pressão seletiva (induzida por quimioterápicos) para a geração de mecanismos MDR na linhagem K562 pode estar correlacionado com a superexpressão de *ABCB1* e independente de *COX2* (Fig. 7).

Após caracterizarmos a relação entre os genes *COX2* e *ALOX5*, avaliamos o efeito da modulação de *COX2* nos genes relacionados ao fenótipo MDR: *ABCB1* e *ABCC1*. Ao tratarmos as células com inibidor do produto do gene *COX2*, percebemos um aumento na expressão desse gene, o que indica a eficiência da supressão proteica de COX-2. É provável que a exposição inicial ao AAS tenha inibido a enzima COX-2, o que ativou um mecanismo compensatório aumentando a expressão gênica, que é observada 48h após a exposição. Esse aumento no mRNA foi convertido em um aumento na síntese de COX-2 e de seus produtos como as prostaglandinas (PGs). Esses achados sugerem que vias celulares envolvendo a enzima COX-2 desempenham um papel importante na resistência relacionada à produção de PGs nas células K562-Lucena e FEPS. Resultados da literatura mostram que a produção excessiva de PGs nos tecidos cancerosos, principalmente de PGE<sub>2</sub>, aumenta o crescimento de células tumorais (Cao & Prescott, 2002), e a supressão da atividade de COX-2 em células de leucemia que apresentam o fenótipo MDR acarreta na redução da produção de PGs e a consequente inibição do crescimento celular (Arunasree et al., 2008).

Nossos resultados de expressão gênica após tratamento com AAS e silenciamento de *ABCB1* confirmaram a relação positiva entre a expressão de *COX2* e *ABCB1*. Quando houve uma indução da expressão do gene *COX-2* pelo tratamento com AAS, o gene *ABCB1* foi aumentado; e quando o gene *ABCB1* foi silenciado e sua expressão foi diminuída, houve uma diminuição na expressão do gene *COX2*. Assim mostramos pela primeira vez nas células eritroleucêmicas que silenciar o gene *ABCB1* altera a expressão de *COX2*.

Estudos recentes têm apontado o papel de alguns transportadores ABCs como sinalizadores, exportando moléculas sinalizadoras como lipídios bioativos que promovem a progressão do câncer e inflamação associada ao câncer (Domenichini et al, 2019). Visto isso, sugerimos que com a diminuição da proteína ABCB1, o efluxo de PGE<sub>2</sub> seria diminuído, diminuindo a estimulação de mRNA de *COX2* nas células silenciadas.

A modulação de *COX2* acompanhada pelo aumento na expressão de *ABCB1* evidencia a relevância de COX-2 para as linhagens eritroleucêmicas MDR. Estudos

realizados em diferentes tipos celulares confirmam que COX-2, através de seus produtos são capazes de regular positivamente a expressão do mRNA de *ABCB1* (Sorokin, 2004). Presumimos que nas linhagens K562-Lucena e FEPS, o aumento de COX-2 causado pelo aumento na expressão gênica do gene *COX2* leva a indução de *ABCB1* devido a um aumento na produção de PGs (Fig. 7) e possível ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B). Estudos demonstram que NF- $\kappa$ B pode regular a expressão de *ABCB1* em células de leucemia (K562) resistentes a adriamicina e imatinibe (Yang et al., 2010; Dharmapuri et al., 2015). Assim, COX-2 leva a indução de *ABCB1* via PGs, que por sua vez ativa uma via de sinalização que resulta na ativação e transferência de NF- $\kappa$ B para o núcleo (Gu & Chen, 2012; Dharmapuri et al., 2015). Atuando como um fator de transcrição, NF- $\kappa$ B se liga a uma região promotora do gene *ABCB1*, ativando a sua expressão (Bentires-Al et al., 2003; Gu & Chen, 2012).

Para entender o papel das PGs exclusivamente a  $PGE_2$ , na regulação de *ABCB1*, avaliamos a sua interação bem como a do AAS com a proteína *ABCB1* através do ensaio *in silico* de *docking* molecular. Nossos resultados demonstraram que  $PGE_2$  possui maior afinidade pela proteína *ABCB1* em comparação ao AAS, sendo provavelmente o ligante preferencial. Então, é possível que os efeitos gerados durante a exposição prolongada ao AAS na expressão gênica e proteica sejam devido ao aumento de  $PGE_2$  e sua ligação à proteína *ABCB1*. O *docking* molecular também demonstrou que o sítio de ligação do AAS e da  $PGE_2$  são muito semelhantes, praticamente na mesma região da *ABCB1*. Especificamente, essas duas moléculas se localizaram nos domínios transmembrana (DTMs) da *ABCB1*, sendo possível que essa região desempenhe um papel de destaque para ligação de moléculas envolvidas na cascata pró e anti-inflamatória. Os DTMs são importantes para o funcionamento de *ABCB1*, uma vez que é nesse local que se ligam os substratos durante a translocação através das membranas biológicas, dessa forma tanto AAS como  $PGE_2$  podem ser substratos de *ABCB1* (Domenichini et al., 2019).

Outra proteína relacionada ao fenótipo MDR é a *ABCC1*, a qual é superexpressa pela linhagem FEPS. Transportadores *ABCC* estão envolvidos no tráfego de lipídios e mediadores inflamatórios, como leucotrienos e PGs (Domenichini et al., 2019). As PGs são substratos para a *ABCC1* podendo ser transportadas sozinhas (Waart et al., 2006) ou conjugadas com glutathione (Evers et al., 1997) alterando a atividade da bomba. O transporte de moléculas bioativas por *ABCC1* tem desempenhado papéis-chave na regulação da progressão tumoral, então era esperado a mudança na via de produção dos LTs e PGs seria capaz de alterar a expressão de *ABCC1*. Apesar disso, o tratamento com

inibidores de COX-2 (AAS) e 5-LOX (Zil) e posterior alterações gênicas não exerceu efeito na expressão gênica de *ABCC1*. Dharmapuri e colaboradores (2015) mostraram que a inibição de COX-2 por celecoxibe foi capaz de alterar a expressão de *ABCC1* na linhagem K562 resistente ao imatinibe, porém nas linhagens estudadas onde a seleção foi feita por quimioterápicos com alvos celulares diferentes, a regulação de *COX2* é mais direcionada à *ABCB1*.

Após verificarmos o aumento da expressão gênica de *ABCB1* nas células tratadas com AAS, e a interação de PGE<sub>2</sub> e AAS com *ABCB1* avaliamos qual o efeito na expressão proteica. Os dados de citometria mostraram um aumento na expressão proteica de *ABCB1* nas linhagens K562-Lucena e FEPS após exposição ao AAS. É provável que o aumento de *ABCB1* seja devido a indução dos níveis de mRNA, o que foi convertido em um aumento na síntese proteica. Nossos resultados corroboram com os ensaios feitos por Arunasree e colaboradores (2008), evidenciando que a modulação de COX-2 altera não apenas a expressão proteica, mas também a expressão gênica de *ABCB1*. A maior intensidade de fluorescência observada na linhagem FEPS tratada com AAS quando comparada a K562-Lucena, pode ser devido a maior sensibilidade da linhagem ao AAS, o que gera um efeito regulatório maior, sendo importante para as células investirem energia na síntese da proteína de efluxo. Dessa forma evidenciamos que COX-2 é um importante alvo celular nas células eritroleucêmicas com o fenótipo MDR.

Para investigar os efeitos biológicos da regulação positiva da expressão gênica e proteica de *ABCB1*, avaliamos a atividade de *ABCB1* através do ensaio de acumulação do corante Rho123. Observamos que as células expostas ao AAS por 48h possivelmente estariam transportando as PGs produzidas após a indução da expressão gênica de *COX2* e de seu produto COX-2, o que explicaria um leve aumento na fluorescência devido a acumulação do corante nas células, quando comparado ao controle. O *docking* molecular confirmou que PGE<sub>2</sub> é um possível ligante para *ABCB1*, no domínio responsável pelo transporte de substratos.

Além disso, nossos resultados mostram que o AAS adicionado no momento do ensaio (0h) pode estar atuando como um substrato para *ABCB1*, aumentando a atividade de *ABCB1* na linhagem K562-Lucena quando comparado ao grupo controle. Acreditamos que a exposição ao fármaco estimula a atividade de *ABCB1*, que passa a transportar AAS e o corante Rho123 para a fora da célula, o que explica a menor fluorescência observada. Esse resultado não foi observado para a linhagem FEPS devido a sua alta capacidade de extrusão, transportando quase todo o corante para fora da célula,



não sendo possível observar diferença significativa entre o controle e AAS (0h). O *docking* molecular confirma que apesar de não ser o ligante preferencial, o AAS é capaz de se ligar a estrutura de ABCB1, sendo um possível substrato.

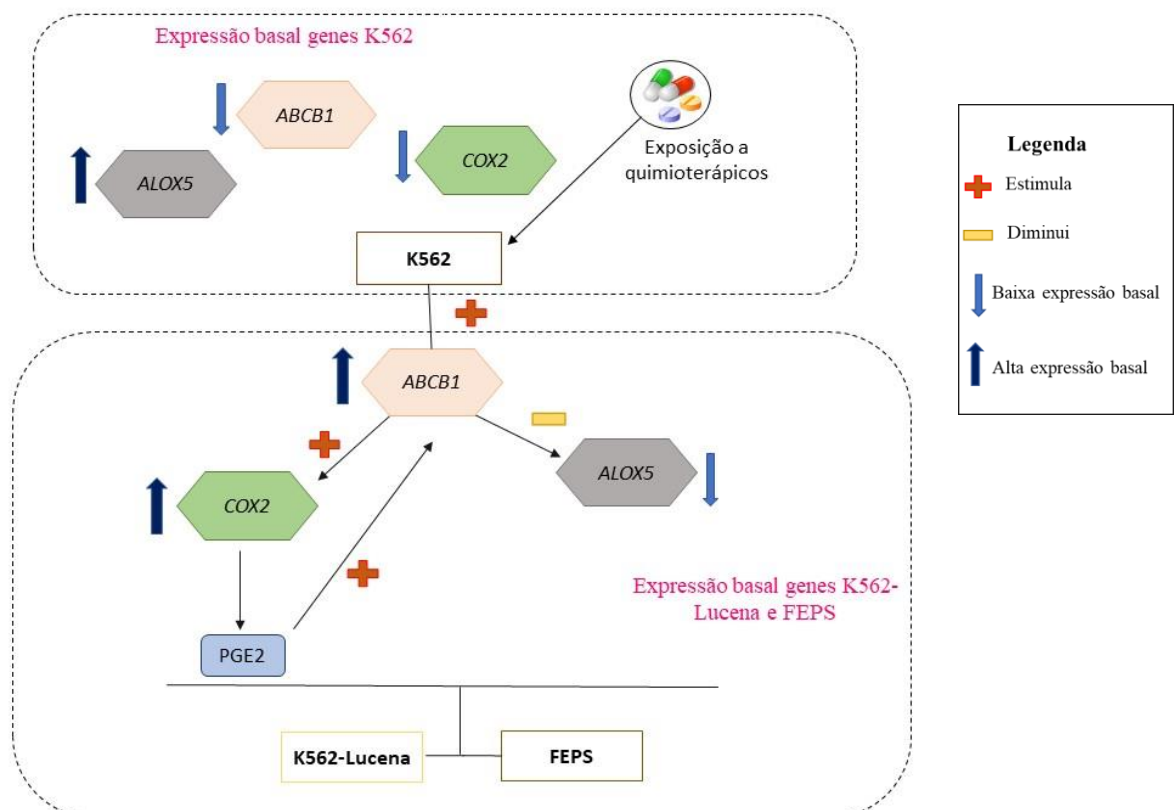
É importante ressaltar a grande diferença na atividade basal das linhagens K562-Lucena e FEPS. Nesse estudo, o protocolo do ensaio foi adaptado, diminuindo 6 vezes o tempo de incubação para extrusão do corante na linhagem FEPS, uma vez que as células foram capazes de expulsar grande parte do corante em menos de 10 min, mesmo na presença do inibidor VP. Já na linhagem K562-Lucena o tempo de incubação para extrusão do corante foi de 60 min.

Por fim realizamos um estudo comparativo dos níveis basais de óxido nítrico (NO) nas linhagens K562, Lucena e FEPS, a fim de entender melhor a relação entre a inflamação e o fenótipo de resistência celular, além de avaliar o efeito inibitório de Zil e AAS na produção de NO. O NO atua no processo inflamatório em concentrações maiores que a fisiológica causando efeito citotóxico em microorganismos (Filho & Zilberstein, 2000), além de atuar como mensageiro químico em baixas concentrações, atuando como um importante mediador de cascatas de sinalização que estimulam o crescimento das células tumorais (Ridnour et al., 2015). Observamos que os níveis basais de NO das células de LMC são baixos (menores que 2  $\mu\text{M}$ ), quando comparados aos valores obtidos na curva padrão de acumulação de nitrito. Apesar das linhagens K562-Lucena e FEPS apresentarem um fenótipo diferente da linhagem parental K562, os níveis de NO não são distintos, o que pode indicar que essa molécula não atua diretamente no processo de sinalização nas células MDR.

Alguns estudos têm demonstrado que o aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) via óxido nítrico sintase induzível (iNOS) são capazes de estimular a superexpressão de COX-2 em células tumorais resistentes (Fantappiè et al., 2002, 2015). O tratamento com inibidores de 5-LOX e COX-2 não foi suficiente para estimular ou diminuir os níveis de NO. Nas linhagens MDR K562-Lucena e FEPS, o mecanismo de regulação da inflamação que envolve *COX2* não é diretamente mediado pela indução de NO. Essa caracterização do perfil inflamatório das linhagens eritoleucêmicas é interessante, mostrando que nem sempre é possível buscar tratamentos extrapolando resultados obtidos em outras linhagens, e a caracterização facilita o desenvolvimento de tratamentos mais específicos.

## Conclusão Geral

Este estudo analisou a relação entre a inflamação e fenótipo MDR nas células eritroleucêmicas K562 (não MDR), K562-Lucena e FEPS (MDR), de forma a aumentar o conhecimento sobre essas linhagens e encontrar novos alvos moleculares para o tratamento da leucemia. Verificamos que o aumento na expressão gênica de *COX2* causada pela exposição ao AAS foi seguida por um aumento na expressão gênica e proteica de *ABCB1*. Além disso, a modificação do gene *ABCB1* através do silenciamento foi acompanhado pela diminuição da expressão de *COX2*, estabelecendo uma relação positiva entre esses genes nas linhagens eritroleucêmicas. Presumimos que *ABCB1* pode estar modulando a expressão de *ALOX5* através do transporte de lipídios bioativos por uma via independente da alteração de *COX2*. As células apresentam uma correlação entre *COX2* e *ABCB1* que são regulados positivamente durante a transformação da linhagem celular K562 por ação dos quimioterápicos, enquanto o aumento de *ABCB1* estaria regulando a diminuição de *ALOX5* observado nas linhagens MDR K562-Lucena e FEPS.



**Figura 7.** Mecanismo proposto para o perfil de expressão basal de *COX2*, *ALOX5* e *ABCB1* durante a seleção das linhagens celulares K562-Lucena e FEPS a partir da linhagem celular K562 pela exposição aos quimioterápicos.

#### 4. Bibliografia Geral

Achari, C., V. Reddy, G., C.M. Reddy, T., Reddanna, P., 2011. Chebulagic Acid Synergizes the Cytotoxicity of Doxorubicin in Human Hepatocellular Carcinoma Through COX-2 Dependant Modulation of MDR-1. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. 7, 432–442.

Altavilla D., Minutoli, L., Polito, F., Irrera, N., Arena, S., Magno, C., et al. Effects of flavocoxid, a dual inhibitor of COX and 5-lipoxygenase enzymes, on benign prostatic hyperplasia. 2012. *Br J Pharmacol*. 167, 95–108

Andrikovics, H., Nahajevszky, S., Szilvási, A., Bors, A., Ádám, E., Kozma, A., Kajtár, B., Barta, A., Poros, A., Tordai, A., 2007. First and second line imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia patients expressing rare e1a2 or e19a2 BCR–ABL transcripts. *Hematol. Oncol*. 25, 143–147.

Arunasree, K.M., Roy, K.R., Anilkumar, K., Aparna, A., Reddy, G.V., Reddanna, P., 2008. Imatinib-resistant K562 cells are more sensitive to celecoxib, a selective COX-2 inhibitor: Role of COX-2 and MDR-1. *Leuk. Res*. 32, 855–864.

Ashley, N.T., Weil, Z.M., Nelson, R.J., 2012. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*. 43, 385–406.

Belinsky, M.G; Chen, Z.S; Shchaveleva, I.; Zeng, H.; Kruh G.D. 2002. Characterization of the Drug Resistance and Transport Properties of Multidrug Resistance Protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* 62, 6172–6177.

Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M.-P., Bours, V., 2003. NF- $\kappa$ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 22, 90–97.

Bhatelia, K., Singh, K., Singh, R., 2014. TLRs: Linking inflammation and breast cancer. *Cell. Signal*. 26, 2350–2357. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.035>

Bonavita, E., Galdiero, M.R., Jaillon, S., Mantovani, A., 2015. Phagocytes as Corrupted Policemen in Cancer-Related Inflammation, in: *Advances in Cancer Research*. pp. 141–171.

Candido, J., Hagemann, T., 2013. Cancer-Related Inflammation. *J. Clin. Immunol*. 33, 79–84.

Cao, Y., Prescott, S.M., 2002. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J. Cell. Physiol*. 190, 279–286.

Capranico, G., Soranzo, C., Zunino, F., 1986. Single-Strand DNA Breaks Induced by Chromophore-modified Anthracyclines in P388 Leukemia Cells1, *CANCER RESEARCH*.

Carrett-Dias, M., Almeida, L.K., Pereira, J.L., Almeida, D.V., Filgueira, D.M.V.B., Marins, L.F., Votto, A.P. de S., Trindade, G.S., 2016. Cell differentiation and the multiple drug resistance phenotype in human erythroleukemic cells. *Leuk. Res*. 42, 13–20.

- Carrett-Dias, M., Votto, A.P., Filgueira D.M., Almeida, DV., Vallochi, A.L., D'Oca, MG., Marins, L.F., Trindade, G.S. 2011. Anti-mdr and antitumoral action of acetylsalicylic acid on leukaemic cells. *Biosci. Rep.* 31: 391–398.
- Chen, X. Wang S, Wu N, Sood S et al. 2004. Overexpression of 5-lipoxygenase in rat and human esophageal adenocarcinoma and inhibitory effects of zileuton and celecoxib on carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* 10, 6703–6709.
- Chen, Y., Li, D., Li, S., 2009. The Alox5 gene is a novel therapeutic target in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle* 8, 3488–3492.
- Cianchi, F., Cortesini, C., Magnelli, L., Fanti, E., Papucci, L., Schiavone, N., et al. 2006. Inhibition of 5-lipoxygenase by MK886 augments the antitumor activity of celecoxib in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 5, 2716–26.
- Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M.H., Dubrovska, A., 2015. A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* 31, 16–27.
- Coussens, L.M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- Crusz, S.M., Balkwill, F.R., 2015. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12, 584–596.
- Daflon-Yunes, N., Pinto-Silva, F.E., Vidal, R.S., Novis, B.F., Berguetti, T., Lopes, R.R.S., Polycarpo, C., Rumjanek, V.M., 2013. Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* 383, 123–135.
- De Castro Barreto, R., Pereira, G.A.S., João, L., Costa, D.A., Rosi Barreto, H., Cavalcanti, B., 2011. O Duplo Papel da Inflamação no Surgimento das Lesões Cancerígenas. The Double Role of Inflammation in the Emergence of Cancerous Lesions. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde.* 14, 107–114.
- Dharmapuri, G., Doneti, R., Philip, G.H., Kalle, A.M., 2015. Celecoxib sensitizes imatinib-resistant K562 cells to imatinib by inhibiting MRP1-5, ABCA2 and ABCG2 transporters via Wnt and Ras signaling pathways. *Leuk. Res.* 39, 696–701.
- Domenichini, A., Adamska, A., Falasca, M., 2019. ABC transporters as cancer drivers: Potential functions in cancer development. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1863, 52–60.
- Evers, R, Cnubben NH, Wijnholds J, van Deemter L et al. 1997. Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1. *FEBS Lett.* 419, 112–116.
- Fantappiè O, Sassoli C, Tani A, Nosi D, Marchetti S, Formigli L, Mazzanti R. 2015. Mitochondria of a human multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell line constitutively express inducible nitric oxide synthase in the inner membrane. *J Cell Mol Med.* 19: 1410–1417

Fantappiè, O., Masini, E., Sardi, I., Raimondi, L., Bani, D., Solazzo, M., Vannacci, A., Mazzanti, R., 2002. The MDR phenotype is associated with the expression of COX-2 and iNOS in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatology* 35, 843–852.

Fernandes e Silva, E., Figueira, F.S., Cañedo, A.D., Machado, K.S., Salgado, M.T.S.F., Silva, T.K., Wagner, E.F., Mattozo, F.H., Lima, A., Sales-Neto, J.M., Ferreira, V.U., Comitre, A.A., Mascarenhas, S.R., Kalil, S.J., Votto, A.P.S., 2018. C-phycoyanin to overcome the multidrug resistance phenotype in human erythroleukemias with or without interaction with ABC transporters. *Biomed. Pharmacother.* 106, 532–542.

Fernandes e Silva, E., Figueira, F.S., Lettnin, A.P., Salgado, M.T.S.F., Lopes, A.C., Rehbein, F., Kalil, S.J., Votto, A.P.S., 2018. Modulation of reactive oxygen levels and gene expression in sensitive and resistant tumoral cells by C-phycoyanin. *Mol. Biol. Rep.* 0, 0.

Fischer, A.S., Metzner, J., Steinbrink, S.D., Ulrich, S., Angioni, C., Geisslinger, G., Steinhilber, D., Maier, T.J., 2010. 5-Lipoxygenase inhibitors induce potent anti-proliferative and cytotoxic effects in human tumour cells independently of suppression of 5-lipoxygenase activity. *Br. J. Pharmacol.* 161, 936–949.

Fletcher, J.I., Haber, M., Henderson, M.J., Norris, M.D., 2010. ABC transporters in cancer: More than just drug efflux pumps. *Nat. Rev. Cancer* 10, 147–156.

Flora Filho, R., Zilberstein, B., 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras.* 46, 265–271.

Gautam, S., Roy, S., Ansari, M.N., Saedan, A.S., Saraf, S.A., Kaithwas, G., 2017. DuCLOX-2/5 inhibition: a promising target for cancer chemoprevention. *Breast Cancer* 24, 180–190.

Gounaris, E., Heiferman, M.J., Heiferman, J.R., Shrivastav, M., Vitello, D., et al., 2015. Zileuton, 5-lipoxygenase inhibitor, acts as a chemopreventive agent in intestinal polyposis, by modulating polyp and systemic inflammation. *PLoS One* 10, e0121402.

Graham, S.M., Vass, J.K., Holyoake, T.L., Graham, G. J. 2007. Transcriptional analysis of quiescent and proliferating CD34+ human hemopoietic cells from normal and chronic myeloid leukemia sources. *Stem Cells.* 25, 3111-3120.

Gu, K.-S., Chen, Y., 2012. Mechanism of P-glycoprotein Expression in the SGC7901 Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line Induced by Cyclooxygenase-2. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 13, 2379–2383.

Hanlon, K., Copland, M., 2017. Chronic myeloid leukaemia. *Medicine (Baltimore).* 45, 287–291.

Himes, R.H., Kersey, R.N., Heller-Bettinger, I., Samson, F.E., 1976. Action of the vinca alkaloids vincristine, vinblastine, and desacetyl vinblastine amide on microtubules in vitro. *Cancer Res.* 36, 3798–802.

Huber, P.C., Maruiama, C.H., Almeida, W.P., 2010. Glicoproteína-p, resistência a múltiplas drogas (mdr) e relação estrutura-atividade de moduladores #, *Quim. Nova.*

- Jordan, C.T., Guzman, M.L., Noble, M., 2006. Cancer Stem Cells. *N. Engl. J. Med.* 355, 1253–1261.
- Knab, L.M., Grippo, P.J., Bentrem, D.J., 2014. Involvement of eicosanoids in the pathogenesis of pancreatic cancer: The roles of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. *World J. Gastroenterol.* 20, 10729.
- Larsson, S.C, Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., Wolk A., 2004. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 79, 935–45.
- Li, N., Sood, S., Wang, S., Fang, M., Wang, P., Sun, Z., Yang, C.S., Chen, X., 2005. Overexpression of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase 2 in hamster and human oral cancer and chemopreventive effects of zileuton and celecoxib. *Clin. Cancer Res.* 11, 2089–2096
- Liu, B., Yan, S., Qu, L., Zhu, J., 2017. Celecoxib enhances anticancer effect of cisplatin and induces anoikis in osteosarcoma via PI3K/Akt pathway. *Cancer Cell Int.* 17, 1.
- Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1975;45(3):321-334., 2016. . *Blood* 128, 1995–1995.
- Marx, J., 2004. CANCER RESEARCH: Inflammation and Cancer: The Link Grows Stronger. *Science* (80-). 306, 966–968.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435.
- Medzhitov, R., 2010. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* 140, 771–776.
- Mogensen, T.H., 2009. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–273.
- Munn, L.L., 2017. Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 9, e1370.
- Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature.* 420, 846–52.
- O'Connor, R., Clynes, M., Dowling, P., O'Donovan, N., O'Driscoll, L., 2007. Drug resistance in cancer – searching for mechanisms, markers and therapeutic agents. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 3, 805–817.
- O'Hare, T., Deininger, M.W.N., Eide, C.A., Clackson, T., Druker, B.J., 2011. Targeting the BCR-ABL Signaling Pathway in Therapy-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 17, 212–221.
- Pang, L.Y., Hurst, E.A., Argyle, D.J., 2016. Cyclooxygenase-2: A Role in Cancer Stem Cell Survival and Repopulation of Cancer Cells during Therapy. *Stem Cells Int.* 2016, 1–11.
- Patel, V.A., Dunn, M.J., Sorokin, A., 2002. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *JBC Papers in Press.* Published on.

- Piccinini, A.M., Midwood, K.S., 2010. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010.
- Pidgeon, G.P., Lysaght, J., Krishnamoorthy, S., Reynolds, J. V., O’Byrne, K., Nie, D., Honn, K. V., 2007. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 503–524.
- Rahman, M., Selvarajan, K., Hasan, M.R., Chan, A.P., Jin, C., Kim, J., Chan, S.K., Le, N.D., Kim, Y.-B., Tai, I.T., 2012. Inhibition of COX-2 in colon cancer modulates tumor growth and MDR-1 expression to enhance tumor regression in therapy-refractory cancers in vivo. *Neoplasia* 14, 624–33.
- Reckel, S., Hamelin, R., Georgeon, S., Armand, F., Jolliet, Q., Chiappe, D., Moniatte, M., Hantschel, O., 2017. Differential signaling networks of Bcr–Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia* 31, 1502–1512.
- Ren, R., 2005. Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 5, 172–183.
- Ridnour, L. A., Cheng, R. Y. S., Weiss, J. M., Kaur, S., Soto-Pantoja, D. R., Basudhar, D., et al. 2015. NOS inhibition modulates immune polarization and improves radiation-induced tumor growth delay. *Cancer Res.* 75, 2788–2799.
- Rock, K.L., Latz, E., Ontiveros, F., Kono, H., 2010. The Sterile Inflammatory Response. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 321–342.
- Roos, J., Grösch, S., Werz, O., Schröder, P., Ziegler, S., Fulda, S., Paulus, P., Urbschat, A., Kühn, B., Maucher, I., Fettel, J., Vorup-Jensen, T., Piesche, M., Matrone, C., Steinhilber, D., Parnham, M.J., Maier, T.J., 2016. Regulation of tumorigenic Wnt signaling by cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and their pharmacological inhibitors: A basis for novel drugs targeting cancer cells? *Pharmacol. Ther.* 157, 43–64.
- Rowley, J.D. 1973. Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 243, 290-3.
- 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., 2001. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73, 57–69.
- Rumpold, H., Webersinke, G., 2011. Molecular Pathogenesis of Philadelphia-Positive Leukemia – is it all BCR-ABL ? *Chronic Myeloid. Cancer* 3–19.
- Schneider, C., Pozzi, A., 2011. Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 30, 277–94.
- Schreiber-Servan David. 2011. *Anticancer.* 2° ed. Objetiva. Rio de Janeiro.
- Serhan, C.N., Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6, 1191–97

- Shalapour, S., Karin, M. 2015. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest.* 125, 3347-3355.
- Sorokin, A., 2004. Cyclooxygenase-2: Potential Role in Regulation of Drug Efflux and Multidrug Resistance Phenotype. *Curr. Pharm. Des.* 10, 647–657.
- Thimmaiah, K.N., Horton, J.K., Qian, X.D., Beck, W.T., Houghton, J.A., Houghton, P.J., 1990. Structural determinants of phenoxazine type compounds required to modulate the accumulation of vinblastine and vincristine in multidrug-resistant cell lines. *Cancer Commun.* 2, 249–59.
- Tong, D., Liu, Q., Wang, L., Xie, Q., Pang, J., Huang, Y., Wang, L., Liu, G., Zhang, D., Lan, W., Jiang, J., 2018. The roles of the COX2/PGE2/EP axis in therapeutic resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 37, 355–368.
- Tsuji, M., DuBois, R.N., 1995. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83, 493–501.
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R.N., 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93, 705–16.
- Tsuruo, T., Iida, H., Ohkochi, E., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y., 1983. Establishment and properties of vincristine-resistant human myelogenous leukemia K562. *Gan* 74, 751–8.
- Wallace, J.M., 2002. Nutritional and Botanical Modulation of the Inflammatory Cascade—Eicosanoids, Cyclooxygenases, and Lipoxygenases— As an Adjunct in Cancer Therapy. *Integr. Cancer Ther.* 1, 7–37.
- Wang, D., Dubois, R.N., 2010. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 181–193.
- Yang N, Zhai J, Wang D, Chen Y, Jiang L. 2010. The study of the reversal effect of PDTC on multidrug resistance of K562/AO\_2 cells and its mechanism. *ACS Nano* 4, 887.
- Ye, Y.N., Wu, W.K.K., Shin, V.Y., Bruce, I.C., Wong, B.C.Y., Cho, C.H., 2005. Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses colon cancer formation promoted by cigarette smoke. *Carcinogenesis* 26, 827–834.
- Yektaei-Karin, E., Zovko, A., Nilsson, A., Näsman-Glaser, B., Kanter, L., Rådmark, O., Wallvik, J., Ekblom, M., Dolinska, M., Qian, H., Stenke, L., 2017. Modulation of leukotriene signaling inhibiting cell growth in chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* 58, 1903–1913.
- Zhang, Q., Feng, Y., Kennedy, D., 2017. Multidrug-resistant cancer cells and cancer stem cells hijack cellular systems to circumvent systemic therapies, can natural products reverse this? *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 777–801.
- Zhou, G.-X., Ding, X.-L., Wu, S.-B., Zhang, H.-F., Cao, W., Qu, L.-S., Zhang, H., 2015. Inhibition of 5-lipoxygenase triggers apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncol. Rep.* 33, 661–668.