UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

VYCTÓRIA DOS SANTOS RAMOS

INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELOS DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Mogi das Cruzes, São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

VYCTÓRIA DOS SANTOS RAMOS

INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELOS DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Dissertação apresentadaao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Mogi das Cruzes, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.
Área de concentração: Biotecnologia

Orientador Prof. Dr. Tiago Rodrigues

Mogi das Cruzes, São Paulo

2023

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Ramos, Vyctória dos Santos
R175i Investigação dos mecanismos de resistência ao estresse oxidativoem modelos de leucemia mielóide crônica / Vyctória dos Santos Ramos. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Tiago Rodrigues.

1. Resistência a medicamentos antineoplásicos/efeitos dos farmácos 2. Leucemia Mieloide de fase crônica/metabolismo 3. Via dependentose fosfato 4. Estresse oxidativo/efeito dos fármacos 5. Morte celular I. Rodrigues, Tiago
II. Universidade de Mogi das Cruzes
III. Título

CDD 616.99419

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às nove horas do dia quatro de agosto de dois mil e vinte e três, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada: "INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELOS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA", para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Vyctória dos Santos Ramos**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Tiago Rodrigues, e Daniela Leite Jabes da Universidade de Mogi das Cruzes, e Giselle Zenker Justo, da Universidade Federal de São Paulo. Sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A sessão pública da defesa da dissertação foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

aprovada (aprovado(a) /reprovado(a)) por unanimidade (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 04 de agosto de 2023.

Comissão Examinadora	Julgamento
Giselle Zenker Justo Profª Drª Giselle Zenker Justo	aprovada aprovado(a) / reprovado(a)
Documento assinado digitalmente gov.br DANIELA LEITE JABES Data: 05/08/2023 19:26:27-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br Profª Drª Daniela Leite Jabes	aprovada aprovado(a) / reprovado(a)
Documento assinado digitalmente gov.br TIAGO RODRIGUES Data: 04/08/2023 12:10:52-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br Prof. Dr. Tiago Rodrigues	aprovada aprovado(a) / reprovado(a)

Para Elizabeth dos Santos Ramos, João Eustáquio Ramos, Emanuelle dos Santos Ramos e Maria José dos Santos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me conduzido e dado força para chegar até aqui. Em segundo, à minha família, nas pessoas de meus pais, da minha irmã e da minha vó, por acreditarem e sonharem junto comigo, pelo apoio, compreensão, amor e força dados a mim sem medidas e também minha sobrinha e afilhada Kiara, embora tão pequena, sempre me acalma nos meus dias mais difíceis.

Ao professor Dr. Tiago Rodrigues, que me orientou ao decorrer dessa pesquisa, pelos ensinamentos que levarei eternamente tanto em minha vida acadêmica quanto para meu amadurecimento pessoal, agradeço por ter me aceitado como sua aluna e ter possibilitado a realização desse sonho. Obrigada pela inspiração e pelo exemplo. Ao Moacir Ferreira Filho, por todo carinho, apoio e inspiração. As minhas companheiras de laboratório, Laura, Rayssa, Gabrielle e Beatriz, por todo conhecimento e ajuda partilhados, sem vocês, nada seria possível. À Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão, por todas as discussões que auxiliaram o desenvolvimento deste trabalho. Aos meus amigos que sempre estiveram comigo, me incentivando e dando força, em particular minha irmã de coração Kamila. E todos envolvidos direta ou indiretamente com a realização deste estudo.

Por fim, agradeço à Universidade de Mogi das Cruzes e à Universidade Federal do ABC pela infraestrutura concedida e as agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPESP.

Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade.

Santo Agostinho

RESUMO

O desenvolvimento de resistência a quimioterápicos pelas células tumorais é um dos principais problemas enfrentados durante o tratamento de pacientes com câncer. Tal resistência pode desenvolver-se por inúmeros mecanismos, incluindo diminuição da absorção e aumento do efluxo de fármacos, ativação de sistemas desintoxicantes, evasão da morte celular, entre outros. O fenômeno conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR) envolve a superexpressão de proteínas que atuam como bombas de efluxo de fármacos, como a glicoproteína P (P-gp). Além disso, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode encontrar-se aumentada em células tumorais pelas alterações metabólicas exibidas por estas células ou ainda por exposição à quimioterápicos, cujo mecanismo de ação citotóxica envolve a indução de estresse oxidativo. Por esses motivos, os sistemas de defesa antioxidante podem estar alterados para a manutenção da homeostase redox e garantir a sobrevivência celular e o estudo destes mecanismos contribuem para o entendimento da resistência tumoral. Neste trabalho, os possíveis mecanismos de resistência ao estresse oxidativo foram investigados em modelos de leucemia mieloide crônica (LMC). Para isso, foram selecionadas duas linhagens de LMC humana, a linhagem K562 (ATCC # CCL-243), que apresenta a mutação BCR::ABL (cromossomo Philadelphia), e a Lucena-1, uma linhagem celular derivada da K562 que é resistente à vincristina. Foi descrito que tal resistência é decorrente superexpressão de P-gp, exibindo assim o fenótipo MDR. Entretanto, é plausível a existência de outros mecanismos de resistência adicionais, incluindo a resistência ao estresse oxidativo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar as diferenças de suscetibilidade ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 entre as linhagens de LMC, sensível ou resistente à vincristina, e investigar os mecanismos moleculares responsáveis por tais diferenças. A análise da viabilidade celular mostrou que a Lucena-1 foi mais resistente que a K562 à citotoxicidade do H_2O_2. A inibição da via das pentoses fosfato (PPP) com 6-aminonicotinamida (6-AN) não afetou a K562, mas aumentou a susceptibilidade da Lucena-1 à citotoxicidade do H_2O_2, sugerindo que esta via metabólica responsável pela geração de poder redutor (NADPH) contribui para a resistência ao estresse oxidativo observada. Tal resposta também foi verificada pela variação da concentração de glicose no meio, visto que a glicose é substrato da PPP. Os níveis basais de EROs na Lucena-1 são menores que na K562, mas são maiores quando na presença de H_2O_2. Além disso, os níveis de glutationa reduzida (GSH) são preservados na Lucena-1 tratadas com H_2O_2 em relação à K562, possivelmente às custas de NADPH gerado pela PPP, mais ativa na Lucena-1. Tal hipótese é corroborada pela expressão aumentada da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) nesta linhagem em relação à K562. Além disso, a análise da expressão de proteínas chave do metabolismo da glicose revelou que a Lucena-1 apresenta níveis aumentados da piruvato quinase (PKM2) que em tumores é expressa na sua forma dimerica (inativa) e transporta substratos da glicólise para PPP. Ademais, na presença de H_2O_2, foi observada adicionalmente a diminuição da expressão da fosfofrutoquinase bifosfatase-3 (PFKBF-3), enzima que inibe a glicólise. Porém, a inibição da PFKBF-3 revelou que a K562 é mais sensível à inibição da glicólise do que a Lucena-1. Tais resultados sugerem que a Lucena-1 reprograma o metabolismo celular para apresentar resistência ao estresse oxidativo pela exacerbação da PPP e para atender as demandas de crescimento e proliferação exigidas pelo tumor mesmo em condições adversas de estresse oxidativo.

Palavras-chave: câncer; estresse oxidativo metabolismo; resistência a múltiplas drogas; via das pentoses-fosfato.

ABSTRACT

Drug resistance development is one of the major problems in cancer chemotherapy, and it may involve mechanisms changes, including decreased drug absorption, increased efflux of drugs, activation of detoxifying systems, drug-induced apoptosis, etc. Overexpression of P-glycoprotein (P-gp), which acts as a drug efflux pump, represents an important mechanism exhibited by tumor cells that results in the multidrug resistance (MDR) phenotype. Some chemotherapeutic drugs, doxorubicin, kill tumor cells by inducing an intracellular oxidative stress, although resistance appearance related to the clinical use of this drug has already shown. The reactive oxygen species (ROS) are produced either from normal essential metabolic reactions in humans, including superoxide radical anion ($O_2\bullet^-$), hydroxyl ($\bullet OH$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). However, ROS production is frequently increased in tumor cells as well as changes in their antioxidant defense are observed. In order to investigate the resistance mechanism against oxidative stress induction in leukemia, it was selected the human chronic myeloid leukemia cell line K562 (ATCC # CCL-243) and a derived vincristine-resistant cell line Lucena-1. Such resistance is thought to be due to the occurrence of MDR phenotype by the overexpression of P-gp, but we hypothesized the existence of additional resistance mechanisms. Thus, the aim of this work is to investigate the differences in susceptibility against oxidative stress induced by H_2O_2 in human chronic myelogenous leukemia cells. Metabolic viability assays were performed with different concentrations of H_2O_2, where Lucena-1 was resistant even at lower concentrations. In addition, the strains were submitted to situations with different concentrations of glucose and in medium with and without glutamine, where the Lucena-1 cell had its viability reduced when PPP was inhibited by aminonicotinamide (6-AN) suggesting that this metabolic pathway contributes to the resistance to oxidative stress. Furthermore, reduced glutathione (GSH) levels are preserved in H_2O_2-treated Lucena-1 compared to K562, possibly at the expense of NADPH generated by PPP, more active in Lucena-1. This hypothesis is supported by the increased expression of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in this strain compared to K562. In addition, analysis of the expression of key proteins in glucose metabolism revealed that Lucena-1 has increased levels of pyruvate kinase (PKM2) which in tumors is expressed in its dimeric form (inactive) and transports glycolysis substrates to PPP. Furthermore, in the presence of H_2O_2, a decrease in the expression of phosphofructokinase biphosphatase-3 (PFKBF-3), an enzyme that inhibits glycolysis, was additionally observed. However, inhibition of PFKBF-3 revealed that K562 is more sensitive to inhibition of glycolysis than Lucena-1. Such results suggest that Lucena-1 reprograms cellular metabolism to present resistance to oxidative stress by exacerbating PPP and to meet the growth and proliferation demands required by the tumor even under adverse conditions of oxidative stress.

Keywords: cancer, oxidative stress, metabolism, multidrug resistance, pentose phosphate pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento da hematopoese em células tumorais..... 17

Figura 2. Formação do cromossomo Philadelphia 19

Figura 3. Estrutura química do imatinibe 22

Figura 4. Produção de ERO nas mitocôndrias e defesas mitocondriais..... 25

Figura 5. Metabolismo celular da glicose 27

Figura 6. Efeito do estresse oxidativo induzido por H_2O_2 sobre a viabilidade das células leucêmicas..... 39

Figura 7. Análise da dupla marcação anexina-V FITC e iodeto de propídio das linhagens K562 e Lucena-1 após incubação com H_2O_2 41

Figura 8. Análise da produção cinética de espécies reativas de oxigênio nas linhagens K562 e Lucena-1 43

Figura 9. Análise da produção cinética de espécies reativas de oxigênio nas linhagens K562 e Lucena-1..... 44

Figura 10. Figura 10. Efeito do 6-AN sobre a viabilidade celular e avaliação da disponibilidade de glicose das células K562 e Lucena-1 46

Figura 11. Análise por *Western blotting* da expressão das proteínas da glicólise e PPP..... 48

Figura 12. Efeito da 3-PO na sobre a viabilidade das células K562 e Lucena-1. 49

Figura 13. A via das pentoses fosfato contribui a resistência ao estresse oxidativo da de uma linhagem de LMC resistente a vincristina 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxas de mortalidade por leucemia mieloide, da população brasileira por 100.000 habitantes, entre 2015 e 2020..... 16

Tabela 2. Critérios de fase acelerada e blástica segundo a Organização Mundial da Saúde..... 20

Tabela 3. Valores de EC_{50} para citotoxicidade de H_2O_2 incubado por 24 h em células de LMC.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3PO	3-(3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propeno-1-ona
6-AN	6-aminonicotinamida
6PGD	6-fosfogluconato desidrogenase
ABC	*ATP-binding cassete*
ANOVA	Análise de variância
ART	Artemisinina
ATP	Adenosina trifosfato
CaCl	Cloreto de cálcio
CM-H_2DCFDA	5,6-clorometil -2',7'-dicloro dihidrofluoresceina diacetato
DHA	Di-hidroartenisinina
DHE	Dihidroetídio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EC_{50}	*Half maximal effective concentration*
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F-2,6-BP	Frutose-2,6-Bifosfato
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GSH	Glutationa reduzida
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IFNα	Interferon alfa
IQT	Inibidor de tirosina-quinase
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
LDH	Lactato desidrogenase
LMC	Leucemia mieloide crônica
LMW-PTP	Proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular
MDR	Multidrug resistance
MTT	1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico

NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotidamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
OPT	*O* - ftalaldialdeído
PBS 1X	Tampão fosfato-salino
PFK-1	Fosfofrutoquinase-1
PFK-2	Fosfofrutoquinase-2
PFKFB3	6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatase-3
P-gp	Glicoproteína P
PI	Iodeto de Propídio
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosufonil
PPP	Via das pentoses-fosfato
PPT	Púrpura Trombocitopênica Trombótica
RIPA 1x	*Radioimmunoprecipatation assay buffer*
SNC	Sistema nervoso central
SOD-1	Superóxido dismutase 1
SOD-2	Superóxido dismutase 2
TAP	Tempo de Atividade da Protrombina
t-BOOH	*terc*-butil hidroperóxido
TCHTH	Transplante de células-tronco hematopoéticas
THOP	Thimet oligopeptidase
TPN	Trifospiridina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

1.1 CÂNCER 14

1.2 LEUCEMIA 15

1.2.1 LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA (LMC) 18

1.3 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DA LMC 19

1.4 TRATAMENTO 21

1.4.1 IMATINIBE 21

1.5 RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA 23

1.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO 25

1.7 VIA DAS PENTOSES-FOSFATO 27

1.8 JUSTIFICATIVA 29

2 OBJETIVO 30

2.1 GERAL 30

2.2 ESPECÍFICO 30

3 MATERIAIS E MÉTODOS 31

3.1 MATERIAIS 31

3.2 CULTURA CELULAR 31

3.3 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR 31

3.3.1 TESTE DE REDUÇÃO DO 1-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL) -3,5-DIFENILFORMAZAN (MTT) 31

3.3.2 TESTE DE EXCLUSÃO DE AZUL DE TRIPAN 32

3.3.3 DUPLA MARCAÇÃO COM ANEXINA V-FITC E IODETO DE PROPÍDIO 32

3.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO 33

3.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA 34

3.6 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING 34

3.6.1 PREPARO DO LISADO CELULAR 34

3.6.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS 35

3.6.3 PREPARO DAS AMOSTRAS 35

3.6.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLOACRILAMIDA E TRANSFERÊNCIA DE AMOSTRAS PARA MEMBRANA 36

3.7 GRÁFICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS 37
4 RESULTADOS 38
4.1 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DAS LINHAGENS CELULARES DE LMC K562 E LUCENA-1 AO EFEITO CITOTÓXICO DE H_2O_2 38
4.2 DIFERENÇAS NO ESTADO REDOX ENTRE AS LINHAGENS K562 E LUCENA 1 42
4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR 6-AN E H_2O_2 NAS LINHAGENS K562 E LUCENA-1 45
4.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DA GLICOSE 47
4.5 DETERMINAÇÃO DE CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR 3-PO 49
5 DISCUSSÃO 50
6 CONCLUSÃO 56
REFERÊNCIAS 57

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é uma patologia de ocorrência mundial caracterizada por alterações no ciclo celular, levando a inibição da morte ou o crescimento desordenado das células em função da perda dos mecanismos de regulação de proliferação e homeostase celular (ALBERTS *et al.*, 2002; HANAHAN; WEINBERG 2011). Para o desenvolvimento completo do câncer levam- se anos, consiste em três etapas: iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, as células são expostas aos agentes cancerígenos e sofrem modificações dos genes. No estágio de promoção, os agentes cancerígenos atuam nas células já alteradas. E na progressão, as células alteradas se multiplicam descontroladamente de forma irreversível (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022). Além disso, as células tumorais possuem capacidade de se separar do local primário do tumor e se deslocar primeiramente para tecidos vizinhos, então circulam na corrente sanguínea, suportam a pressão nos novos vasos sanguíneos até disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou para que então se aloquem em um novo ambiente celular, formando o que é denominado como metástase (FARES *et al*., 2020).

Nas células tumorais, ocorrem mudanças significativas nas vias de sinalização, que afetam diferentes atividades celulares, desde crescimento e proliferação até morte celular, invasão e metástase. Além disso, alterações extensas também ocorrem com relação ao metabolismo celular, abrangendo uma ampla gama de funções que incluem aquisição de nutrientes, biossíntese de macromoléculas e geração de energia (VAGHARI-TABARI *et al*, 2021). Segundo Hanahan (2022), o câncer é caracterizado por uma série de alterações biológicas que permitem que as células tumorais se desenvolvam e se espalhem pelo corpo. Desde o seu primeiro artigo publicado em 2000, discute-se sobre as marcas do câncer, que são descritas como processos biológicos que ocorrem nas células tumorais, permitindo-lhes adquirir habilidades essenciais para se proliferarem e sobreviverem, e incluem: sustentação d e sinais proliferativos, resistência a morte celular, evasão da inibição de crescimento, indução de angiogênese, ativação de invasão e metástase, evasão de resposta imune, instabilidade genômica e mutação, inflamação crônica e alterações no microambiente tumoral (HANAHAN 2022). É tido como um enorme desafio de Saúde Pública por ser uma das principais razões para o falecimento da população. No ano passado, houve o registro de quase 10 milhões de óbitos decorrentes desta enfermidade, com a expectativa de que este número aumente nos próximos

anos (WHO, 2022). De acordo com as projeções da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) em colaboração com o projeto Globocan, a mortalidade devido ao câncer em todo o mundo será superior a 6 milhões e a incidência em quase 11 milhões no período entre 2020 e 2040, resultando em um total de 16,3 milhões de mortes e 30,2 milhões de casos em 2040 (IARC, 2022).

A Organização Mundial da Saúde define câncer como um grupo de mais de 100 doenças que afeta qualquer parte do corpo. Além disso, uma das características distintivas do câncer é que as células afetadas crescem além do esperado e invadem outros tecidos ou órgãos (WHO, 2022). Dentro desse conjunto de doenças que têm em comum o crescimento celular desordenado, a leucemia é um tipo de câncer em células sanguíneas. A sua principal característica é a produção e acúmulo de glóbulos brancos jovens anormais na medula óssea durante o desenvolvimento das células sanguíneas. Esses glóbulos brancos deficientes não são capazes de combater infecções e prejudicam a capacidade da medula óssea de produzir glóbulos vermelhos e plaquetas (GREAVES, 2016). Decorrente dessa condição maligna do sangue, é comum os pacientes apresentarem trombocitopenia (redução no número de plaquetas), eritropenia (diminuição no número de glóbulos vermelhos), hepatomegalia (aumento no tamanho do fígado), esplenomegalia (aumento no tamanho do baço), anemia (escassez de hemoglobina), comprometimento do sistema imunológico, suscetibilidade a infecções e outras complicações clínicas que resultam da infiltração de leucócitos e agravamento da doença (INCA, 2022).

1.2 LEUCEMIA

A leucemia foi descrita por John Bennet, Alfred Velpeau, Alfred Donne e Rudolf Virchow, em meados do século XIX (FERRANDO; LÓPEZ-OTÍN, 2017). Devido às restrições tecnológicas existentes para pesquisa no passado, a descoberta da leucemia ocorreu de forma gradual, à medida que novas evidências surgiam (KAMPEN, 2012). Ao final da década de 1840, Bennet propôs o termo leucocitemia, que se refere ao aumento anormal de glóbulos brancos (leucócitos) no sangue e somente em 1870 a medula óssea começou a ser aceita como produtora de células sanguíneas (GEARY, 2000). Os primeiros relatos médicos frequentemente descreviam anormalidades no sangue, como a presença de glóbulos brancos leitosos, glóbulos purulentos ou corpúsculos de pus, juntamente com outras características da leucemia, como a leucocitose e o aumento do baço e fígado. Essas observações levaram às

primeiras conclusões de que a leucemia era uma doença sistêmica que afetava células sanguíneas (KAMPEN, 2012). Segundo o INCA, a leucemia é uma doença que atinge os precursores das células sanguíneas. Deste modo, sua propriedade principal é o acúmulo de células tumorais na medula óssea, ocasionando a supressão da presença e atividade das células normais (INCA, 2020). No Brasil, em 2020, as leucemias ocuparam o nono lugar como câncer mais incidente em homens, totalizando 5.920 novos casos e 4.890 casos para mulheres (INCA, 2020). Segundo o IARC, a estimativa global realizada em 2020 revela que as leucemias representam a décima posição entre os 33 tipos de câncer com maior taxa de mortalidade no mundo. Ainda sobre essa pesquisa, foram listadas 312 mil mortes decorrentes da leucemia e cerca de 475 mil novos casos em 2020, sendo que as expectativas para os anos seguintes são de crescente aumento (IARC, 2020). Segundo a Tabela 1, a taxa de mortalidade de leucemia mieloide para 100 mil habitantes entre os anos de 2015 a 2020 mostrou que os homens apresentam um maior número de mortes se comparado às mulheres no mesmo período de tempo (INCA, 2022).

Tabela 1. Taxas de mortalidade por leucemia mieloide da população brasileira entre 2015 e 2020.

Ano	**Leucemia mieloide - Taxa de mortalidade por 100.000 habitantes**	
	Homens	**Mulheres**
2015	1,64	1,5
2016	1,7	1,53
2017	1,61	1,47
2018	1,75	1,52
2019	1,86	1,5
2020	1,67	1,38

Fonte: INCA (Atlas online de mortalidade), 2022

A classificação dos tipos de leucemia está relacionada, de modo geral, a dois fatores. O primeiro consiste na taxa de progressão, que classifica essa doença em aguda ou crônica. Nas formas agudas, há um elevado número de células imaturas (blásticas) no sangue periférico. Já nas leucemias crônicas, a progressão é mais lenta e menos agressiva, gerando um acúmulo de células anormais e mais maduras no sangue periférico (FERRANDO; LOPES – OTIM, 2017). O segundo fator de classificação está relacionado ao tipo de célula na qual a leucemia tem sua origem, divididas em mieloide ou linfoide. Nas leucemias mieloides (ou mieloblásticas), as células afetadas são as que originam os eritrócitos (hemácias), neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos e as plaquetas e nas leucemias linfoides (ou linfoblásticas) as células afetadas são as que originam os linfócitos e células natural killer (Figura 1) (PASSEGUÉ *et al.*, 2003). Portanto, considerando esses dois fatores, essa doença possui quatro classificações: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoide aguda (LLA), leucemia mieloide crônica (LMC) e leucemia linfoide crônica (LLC) (GRAVES, 2016).

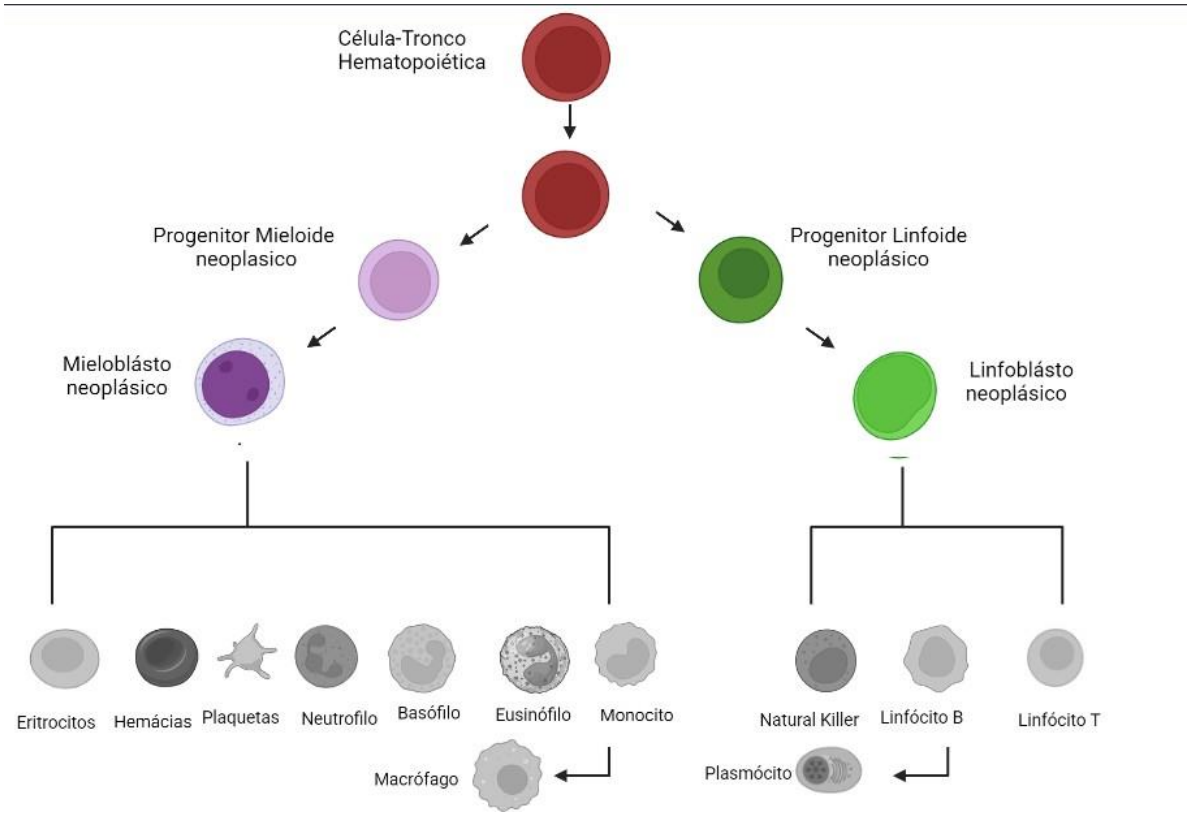


Figura 1. Desenvolvimento da hematopoese em células tumorais. Evolução da célula tronco hematopoiética e seus progenitores linfoide e mieloide que interfere diretamente no processo de diferenciação e maturação das células sanguíneas (Adaptado de PESSEGUÉ *et al*., 2003).

Os sintomas da leucemia derivam da hiperproliferação de células imaturas (blásticas) na medula óssea e da infiltração dessas células em tecidos corporais diversos, como baço, linfonodos, amígdalas, rins, sistema nervoso central (SNC) e outros, culminando em falência medular e manifestações clínicas. Como consequência dessa doença, os pacientes geralmente apresentam palidez, febre, esplenomegalia e sinais decorrentes de trombocitopenia, como sangramento nasal, sangramentos conjuntivais, sangramentos gengivais, manchas violáceas na pele e manchas roxas na pele, que culminam para um diagnóstico mais preciso (INCA, 2022).

Todavia, para confirmar a suspeita clínica, é necessário realizar uma série de exames laboratoriais, incluindo hemograma completo, estudos de coagulação como tempo de atividade da protrombina (TAP), tempo de tromboplastina parcial ativada (PTT), fibrinogênio, análises bioquímicas (função renal, hepática e eletrólitos), culturas de sangue na presença de febre, cultura de urina, exames de imagem de tórax e abdômen em casos de sintomas respiratórios e gastrointestinais (INCA, 2022).

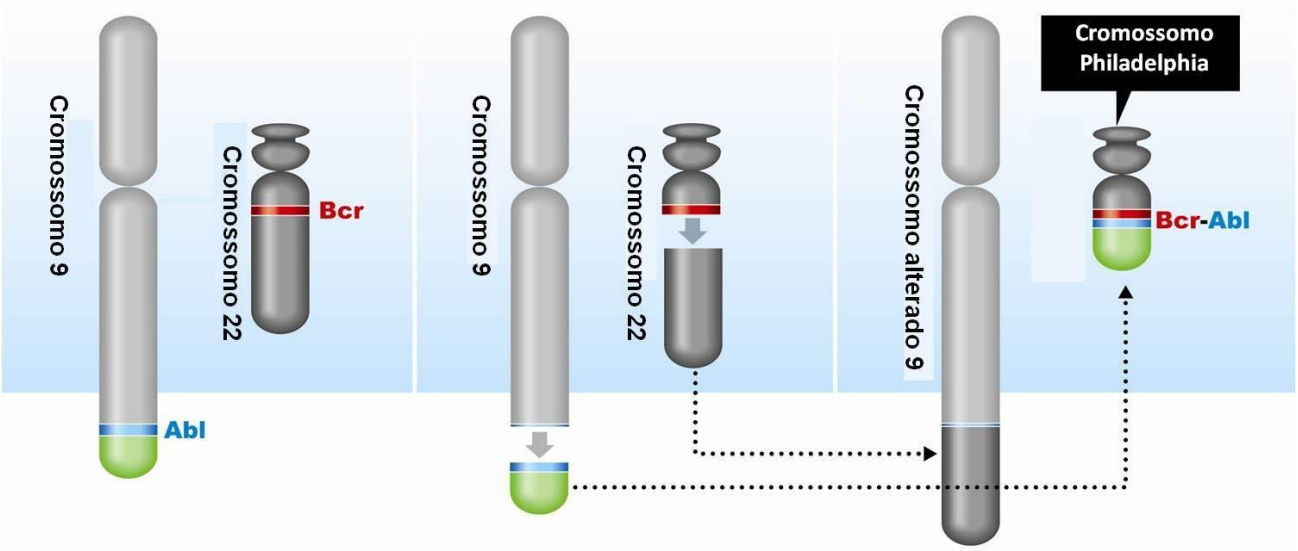
1.2.1 LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA (LMC)

A LMC é um distúrbio mielo proliferativo (BOLLMANN *et al.*, 2011), responsável por aproximadamente 20% das leucemias em adultos e tem incidência de um a dois casos a cada 100 mil habitantes entre 45 a 55 anos de idade, porém pode ocorrer em crianças (BOLLMANN; GIGLIO, 2011). A maioria dos pacientes com LMC são frequentemente diagnosticados na fase crônica que, se não tratada, pode evoluir em 3 a 5 anos para a fase aguda (BUBNOFF; DUYSTER, 2010).

Mais de 95% dos casos de LMC estão associados ao cromossomo Philadelphia (Ph), resultado da translocação dos braços longos dos cromossomos 9 e 22 [t (9;22) (q34; q11)], o que leva à justaposição do gene *ABL1* (*Abelson leukemia gene*) do cromossomo 9 e do *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) do cromossomo 22. Essa anomalia genética culmina no aparecimento do oncogene *BCR/ABL* (Figura 2). Esse novo gene formado desempenha o papel central na malignidade da LMC, isso porque ele codifica a proteína BCR/ABL, uma proteína quimérica com 240 kDa, que apresenta elevada e constitutiva atividade de tirosina-quinase (NOWELL; HUNGERFORD, 1960; RUMJANEK *et al.*, 2013) que é capaz de ativar RAS, RAF, JUN quinase, MYC e STAT (MANDANAS *et al.*, 1993; ILARIA; VAN ETTEN, 1996).

Normalmente, tirosinas-quinases exercem o controle crítico sobre o crescimento celular e diferenciação, de tal forma que desregulação na atividade dessas proteínas culmina no

aumento do potencial mitogênico da célula e à malignidade (WEISBERG *et al.*, 2007). A proteína quimérica codificada pelo gene *BCR/ABL*, chamada de ABL1 é altamente potencializada se comparada a uma proteína normal, e isso é um fator importante no fenótipo maligno da transformação leucêmica (TONKS *et al.*, 2011). O aumento da sinalização estimula vias que tornam as células independentes aos estímulos do ambiente, permitindo a proliferação mesmo na ausência de fatores de crescimento, enquanto inibem as vias de morte celular apoptótica na ausência de fatores de sobrevivência externos, além de interferir na adesão das células leucêmicas ao estroma da medula óssea e promover a invasão e metástase (SAWYERS, 1997; FADERL *et al.*, 1999; SHET *et al.*, 2002). A soma desses fatores resulta na alta resistência de células leucêmicas frente aos quimioterápicos, independente do agente indutor, e dificulta o combate à doença (JAMIESON, 2008).



Fonte: adaptado de National Cancer Institute, 2016

Figura 2. Formação do cromossomo Philadelphia. Fusão dos genes *BCR e ABL1* resultando no cromossomo *Philadelphia*, considerado um marcador citogenético da LMC por carregar o oncogene *BCR/ABL*.

1.3 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DA LMC

A LMC, diferente da LMA tem seu desenvolvimento lento, na qual cerca de 90% dos pacientes são identificados através de hemograma de rotina alterado, leucocitose e neutrofilia progressiva e de origem inespecífica, geralmente associado a esplenomegalia (O'BRIEN; JABBOUR, 2016). É necessária a avaliação do aspirado da medula óssea, a qual apresenta um

medulograma hipercelular, geralmente causado pela hiperplasia de células mieloides em todos os estágios de maturação, incluindo precursores como metamielócitos, mielócitos, promielócitos e até mesmo os blastos, refletindo os resultados do hemograma. Para confirmar o diagnóstico de LMC, é necessária a identificação do cromossomo Ph por meio de exame citogenético de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) ou da presença do gene que codifica a oncoproteína BCR-ABL por técnica molecular de reação em cadeia polimerase com transcrição reversa em tempo real quantitativa (RT-qPCR) (FLIS; CHOJNACKI, 2019).

De acordo com a literatura, a instabilidade genética e o acúmulo de mutações adicionais em células leucêmicas que já possuem uma anomalia cromossômica estão associados à progressão da doença e contribuem para um prognóstico ruim e com baixa resposta terapêutica. Com a progressão da LMC, há uma piora no estado clínico do paciente, juntamente com um aumento na contagem de leucócitos (Tabela 2). Pode iniciar-se com uma expansão clonal desordenada de células tronco hematopoiéticas e, com a progressão da doença, progenitores mieloides aparecem na circulação periférica, denominada fase acelerada. A fase acelerada da doença é caracterizada pela presença de 10 a 19 % de blastos no sangue periférico ou na medula óssea, enquanto que a fase blástica é caracterizada por mais de 20 % de células imaturas ou pela presença de um infiltrado blástico extramedular (ARBER *et al.*, 2016). Durante a fase blástica, a diferenciação celular é inibida e blastos imaturos se acumulam na medula óssea e são liberados para a circulação (MELO E BARNES, 2007).

Tabela 2 – Critérios de fase acelerada e blástica segundo a Organização Mundial da Saúde

Fase acelerada	**Fase blástica**
Persistência ou aumento de leucócitos	20% ou mais de blastos em medula óssea
Persistência ou aumento de esplenomegalia	Proliferação de blastos extramedular
Persistência de trombocitose	
Persistência de trombocitopenia	
20% ou mais de basófilos em sangue periférico	
10-19% de blastos em sangue periférico ou medula óssea	

Anormalidade cromossômica adicional em células Ph-positivas ao diagnóstico: cromossomo Ph, trissomia do cromossomo 8, isocromossomo 17q, trissomia do cromossomo 19, cariótipo complexo e anormalidades no 3q2	
Qualquer anormalidade cromossômica adicional em células Ph-positivas durante o tratamento	

Fonte: adaptado de *WHO Classification of Tumours, Revised 4th Edition, Volume 2, 2017.*

1.4 TRATAMENTO

Inicialmente, o tratamento para LMC era restrito a utilização de medicamentos citotóxicos não específicos como hidroxiureia, bussulfano ou interferon alfa (IFNα), que eram administrados como tratamento paliativo para os sintomas, dessa forma, melhorando a qualidade de vida do paciente sem curar o câncer (TAMASCAR; RAMANARAYANAN, 2009). O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCHTH) era a única opção curativa, mas é reservado para casos selecionado devido aos consideráveis riscos de complicações e morte (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020).

1.4.1 IMATINIBE

Em 1990, o uso do primeiro inibidor de tirosina-quinase (IQT) com especificidades para BCR-ABL, mesilato de imatinibe (Figura 3) (MI, STI-571 ou Gleevec®) foi considerado o tratamento padrão da LMC melhorando a taxa de sobrevida dos pacientes (GAMBACORTI-PASSERINI *et al*., 2014; CORTES *et al.,* 2018). Esse fármaco é um inibidor da proteína BCR/ABL de primeira geração e foi aprovado para primeira linha de terapia em pacientes com LMC pela *Food and Drug Administration* em 2002 (BHAMIDIPATI *et al.,* 2013). O mecanismo de ação consiste em antagonizar o sítio de ligação de adenosina trifosfato (ATP) na proteína BCR/ABL inibindo sua atividade tirosina-quinase e levando à remissão da doença (SACHA, 2014.; TRELA *et al.*, 2014).

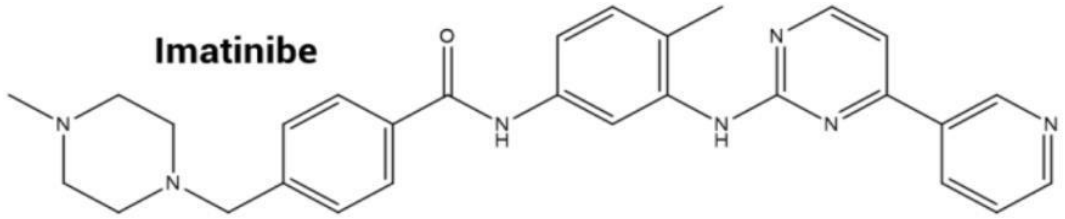


Figura 3. Estrutura química do imatinibe.

O objetivo principal do tratamento com mesilato de imatinibe é adquirir uma resposta hematológica completa nos primeiros 3 meses de terapia, seguida de resposta citogenética maior aos 6 meses e por fim, resposta molecular completa, sem transcritos BCR/ABL detectáveis com 12 a 18 meses de tratamento (ROSSARI *et al.*, 2018).

Apesar da eficiência do imatinibe na LMC, já foi descrito o desenvolvimento de resistência a esse fármaco, não havendo resposta ao tratamento em cerca de 40% dos casos, sendo que, seu potencial terapêutico ainda é limitado devido à amplificação do gene *BCR-ABL* ou a mutações que ocorrem na proteína (LONGLEY; JOHNSTON, 2005; BIXBY; TALPAZ, 2010). Uma estratégia para superar a resistência ao imatinibe foi o surgimento de inibidores de segunda geração de tirosina quinase, como o nilotinibe (Tasigna®), dasatinibe (Sprycel®) e de terceira geração como bosutinibe (Busulif®) e ponatinibe (Iclusig®). No entanto, já foi descrito também a resistência a esses fármacos de segunda geração em consequência dos mesmos fatores abordados acima (BARAŃSKA *et al*, 2008; REDAELLI, *et al.*, 2008; CAMGOZ, *et al*., 2009; HEGEDŰS, 2009; JEAN KHOURY *et al*., 2012; GAMBACORTI-PASSERINI *et al*., 2014; TRELA *et al*. 2014). Posto que, as mutações de BCR-ABL estejam envolvidas nos mecanismos de resistência aos IQT, outros fatores que inibem o sucesso do tratamento com IQT foram identificados. A resistência ao IQT é um processo que envolve mecanismos de resistência dependentes e independentes de BCR-ABL. Os mecanismos independentesincluem a não adesão ou intolerância aos IQTs, diminuição do influxo intracelular dos fármacos e o desenvolvimento do fenômeno *multidrug resistence* (MDR). Esse fenômeno é a causa frequente de falha a quimioterapia em pacientes com câncer e é caracterizado pela resistência cruzada a uma ampla gama de drogas "anticancerígenas" que podem ter diferentes estruturas e mecanismos de ação (RUMJANEK *et al.*, 2013).

1.5 RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA

Como exposto acima, a resistência de células tumorais aos quimioterápicos é constante e pode ocorrer por vários mecanismos. É classificada em resistência primária, quando o paciente não apresenta resposta ao tratamento desde o início, e os mecanismos são ditos como independentes de BCR-ABL, em que a proteína oncogênica está ativada ou apresenta mutações secundárias que levam a proliferação celular. Em contrapartida, na resistência secundária ou resistência adquirida, também chamada de BCR dependente, o paciente apresenta resposta ao início do tratamento, entretanto, em seguida torna-se resistente à terapia, as causas da resistência ainda não são completamente elucidadas, mas alguns estudos indicam a relação com a superexpressão do gene *BCR-ABL*, superexpressão de transportadores de membrana *ATP-binding casset* (ABC), como a glicoproteína-P (P-gp), também chamada de MDR1 (GOTTEESMAN *et al*., 2002; ILLMER *et al*., 2004; BEGICEVIC *et al.,* 2017).

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é a principal causa de resistência aos medicamentos quimioterápicos e está relacionado com os transportadores de membrana da família ABC (DEAN *et al*., 2001; RUMJANEK 2001; RUTH *et al*., 2001). Existem pelo menos 49 membros desta família, classificados em sete subfamílias (ABCA- ABCG), das quais são responsáveis pelo transporte de solutos para o meio intra e extracelular através da energia derivada da hidrólise de ATP. Além disso, entre eles, ABCB1, ABCC1 e ABCG2 são muito envolvidos na aquisição de MDR para quimioterápicos contra o câncer (VASILIOU, *et al.*, 2009; HOLOHAN 2013; FORD *et al.*, 2019). O primeiro transportador identificado é chamado de P-gp membro – 1 da subfamília B do ABC codificada pelo corpo humano pelo gene *ABCB1*, e é considerada a proteína de efluxo com o mecanismo de resistência melhor caracterizado (CHEN; SIKIC, 2012; BAR-ZEEV M. *et al*., 2017). Trata-se de uma proteína de membrana plasmática de 170 kDa, codificada pelo gene *MDR1* situado no lócus 7q211 do cromossomo 7 humano, normalmente funciona para proteger o organismo contra xenobióticos e toxinas celulares. Nesse sentido, transportador é composto por duas metades homólogas com 1.280 aminoácidos. As metades possuem seis domínios de ligação ao nucleotídeo (NBD) que hidrolisa ATP. Essas ligações causam alterações conformacionais no transportador, essenciais para o seu funcionamento (MAYUR *et al.,* 2006; SHAROM FJ 2008; LAGAS *et al*., 2010; VAIDYANATHAN *et al*., 2016). Como a P-gp se liga a muitos compostos hidrofóbicos diferentes, alguns inibidores de sua atividade têm sido encontrados e amplamente utilizados,

como o bloqueador dos canais de cálcio verapamil e o imunossupressor ciclosporina A (GOTTEESMAN *et al*., 2002).

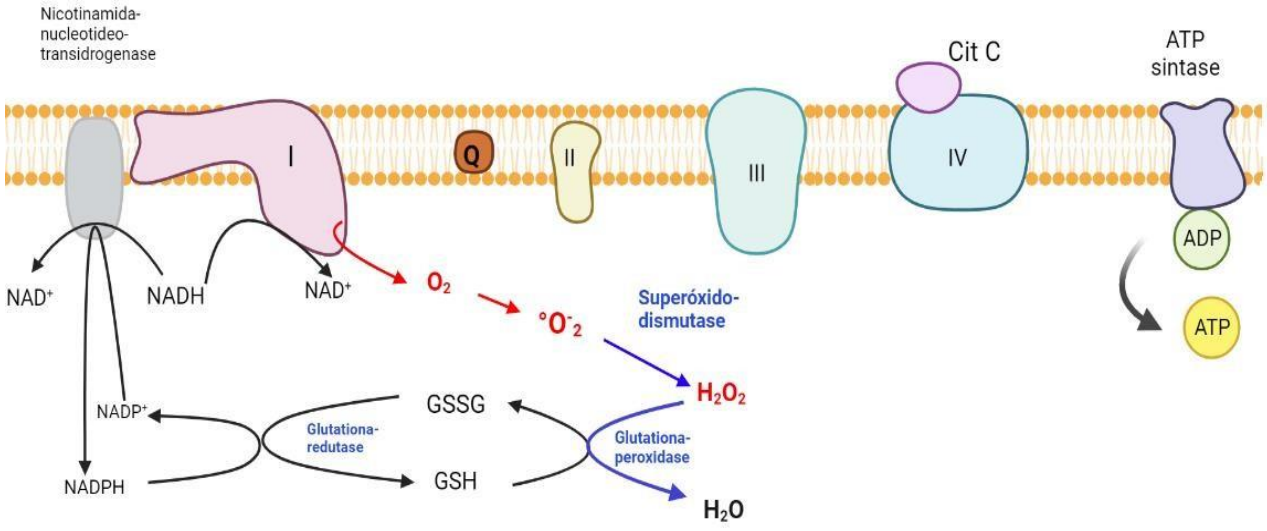
Em células neoplásicas, numerosas e heterogêneas mutações ocorrem e resultam em alterações de vias de sinalização que, por sua vez, modificam os padrões metabólicos para suprir as necessidades como, por exemplo, gerar energia necessária para a rápida divisão ou promover os desvios dos pontos de verificação do ciclo celular que bloqueiam processos sob condições anormais, características no microambiente tumoral (STRATTON *et al.,* 2009; CAIRNS *et al*., 2011; YALÇINTEPE *et al*., 2016). Dessa forma, essas células anormais são capazes de diminuir a quantidade ou inativar enzimas responsáveis pela morte celular induzida por quimioterápicos ou podem também ativar vias que aumentam a sobrevivência da célula ao estresse causado pelos fármacos (HOLOHAN *et al*., 2013). Além disso, podem aumentar a expressão do alvo do quimioterápico com o intuito de diminuir a efetividade do agente inibidor. Este é o evento frequentemente observado em casos de resistência ao mesilato de imatinibe. Todas essas alternativas, conferem grande vantagem na progressão do câncer, possibilitando a resistência a tratamentos diversos (HOLOHAN *et al*., 2013).

Em diversos tumores sólidos, ao iniciar o processo de angiogênese, é comum ocorrer falta de nutrientes e oxigênio, levando ao aumento de mudanças na expressão gênica induzidas pela hipóxia (KELLAND, 2005). Investigações sugerem que as espécies reativas de oxigênio (EROs) também podem estar envolvidas na regulação de proteínas relacionadas à resistência aos medicamentos, a inibição da morte celular é um exemplo de modulação por EROs (WARTENBERG *et al*., 2010; CHEN, 2014). Foi demonstrado que tanto o estresse oxidativo transitório quanto o crônico foram capazes de regular a expressão de P-gp em células endoteliais de micro vasos de cérebro de rato (HONG *et al*., 2006). O mecanismo pelo qual EROs regulam a expressão da P-gp não é completamente claro, porém, quando células de câncer de cólon humano Caco-2 foram expostas a baixa concentração de peróxido de hidrogênio H_2O_2 (1 µM) a expressão de P-gp foi aumentada e em elevada concentração de H_2O_2 (10 mM) a expressão de P-gp diminuiu em 6 horas de tratamento (TERADA *et al*., 2014). O aumento de EROs é observado em muitos casos de câncer, mas, na maioria deles, é difícil distinguir se são a causa ou a consequência do câncer (SMITH *et al*., 2017). A solução deste problema pode ser crucial para a prevenção, diagnóstico e terapia tumoral.

1.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Existem diversas explicações para a ocorrência do estresse oxidativo em células leucêmicas, como ativação da produção de EROs por sinalização oncogênica (ROMO-GONZALEZ *et al*., 2022). Contudo, a melhor maneira de explicar o estresse oxidativos em linhagens celulares de leucemia é através do aumento da produção de EROS por qualquer uma das principais fontes celulares de EROs: a mitocôndria ou as NADPH oxidases. As NADPH oxidases participam de uma família de enzimas que se localizam na membrana podendo ser expressas em diferentes isoformas (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2) dependendo do tecido, cuja função é a produção de EROs (PICCOLI *et al*., 2007; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; CHIRIACO *et al.*, 2016)

Entretanto, a fonte primaria de EROs é sem dúvidas a mitocôndria. As mitocôndrias geram continuamente EROs que normalmente são eliminadas pelos sistemas de defesa antioxidante celular (Figura 4), mas em condições em que a produção desses radicais está aumentada ou capacidade do sistema de defesa antioxidante está diminuída ocorre o estresse oxidativo.



Fonte: adaptado Nelson;Cox, 2014

Figura 4. Produção de ERO nas mitocôndrias e defesas mitocondriais. Quando a taxa de entrada de elétrons na cadeia respiratória e a taxa de transferência de elétrons ao longo da cadeia não são coordenadas, a produção do radical superóxido ($^{\bullet}O^{-}_{2}$) aumenta nos complexos I e III à medida que o radical ubiquinona parcialmente reduzido ($^{\bullet}Q_2$) doa um elétron para o O_2. As reações mostradas em azul defendem a célula contra os efeitos danosos do superóxido. A glutationa reduzida (GSH) doa elétrons para a redução de H_2O_2 em H_2O e dos resíduos oxidados de Cys (–S–S–) de enzimas e outras proteínas, e GSH é regenerada a partir da forma oxidada (GSSG) por redução utilizando NADPH (NELSON; COX, 2014).

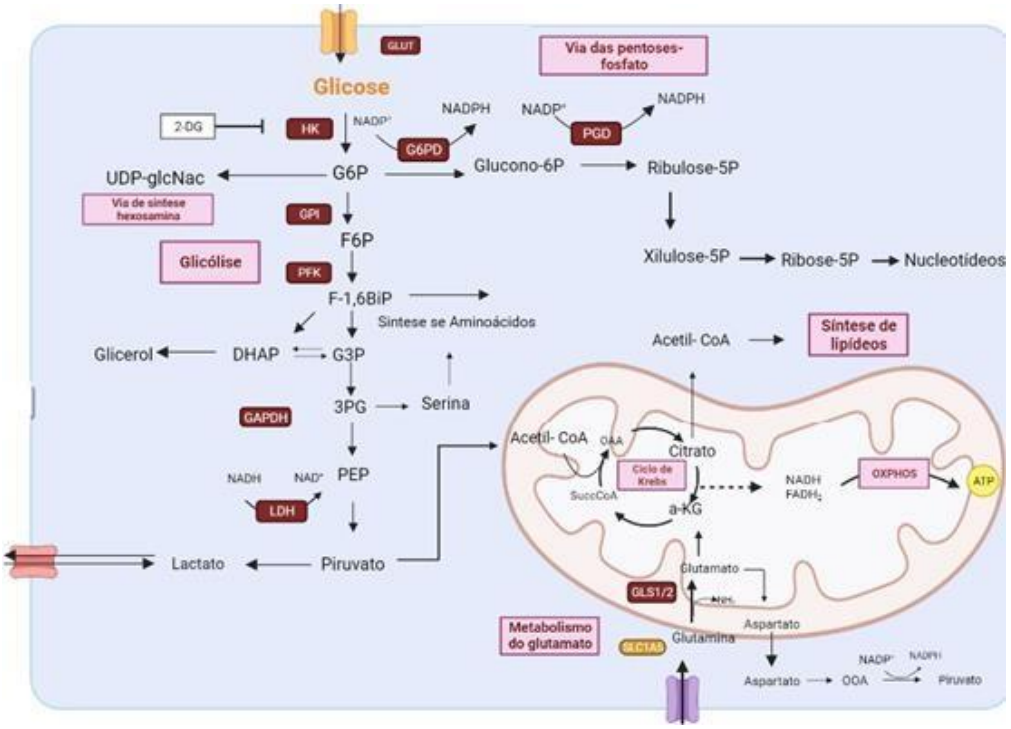
Esse desequilíbrio pode ocorrer por diversos mecanismos como, por exemplo, a sinalização oncogênica (TRACHOOTHAM *et al*., 2009). No entanto, algumas células, principalmente em estágios avançados da doença, tornam-se altamente adaptadas ao estresse oxidativo, devido à capacidade antioxidante alterada. Esta adaptação redox não só permite a sobrevivência celular ao estresse causado por EROs, mas também promove mecanismo de resistência a outros agentes antitumorais que atuam por diferentes vias, como a cascata de sinalização MAPK (MAITI 2012; KUMAR *et, al*., 2014; ROMO-GONZALEZ *et al.*, 2022).

EROs são formadas como consequência da utilização do oxigênio para a obtenção de energia pela mitocôndria. Uma pequena fração do oxigênio é reduzida de modo parcial ou incompleto, gerando moléculas altamente reativas (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). São conhecidas por executar duplo papel no metabolismo celular, uma vez que podem ser deletérias ou benéficas para os sistemas vivos, dependendo de sua concentração (OZBEN 2007). O estresse oxidativo é o rompimento do equilíbrio em favor da oxidação e promove danos às moléculas, como por exemplo, peroxidação dos lipídios de membrana ou a hiperativação de vias de sinalização (TONKS *et al.*, 2011). Em concentrações normais, EROs atuam em determinados eventos, tais como, a transdução do sinal, a ativação de enzimas, expressão gênica e o controle da atividade das caspases no processo apoptótico (SOSA *et al*. 2013). Células tumorais apresentam aumento dos níveis de EROs, como resultado da glicólise acelerada (Efeito Warburg), e isso leva ao estimulo da proliferação celular, a promoção de mutações, a instabilidade genética, além de alterar a sensibilidade celular a agentes quimioterápicos e metástase (ZHIVOTOVSKY *et al*., 2008). Do mesmo modo, a produção de equivalentes redutores é maior, em relação a células não neoplásicas, e esse aumento a protege dos efeitos deletérios que levariam a célula à morte (WEN-SHENG, 2006; ZHELEV *et. al*., 2013).

Para se proteger dos danos causados pelas EROs a célula utiliza mecanismos antioxidantes, tais como o ascorbato, a tioredoxina e a GSH, atuando como *scavengers*, e enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, glutationa-peroxidase e tioredoxina redutase (RENSCHLER 2004). A via das pentoses fosfato (PPP) é a principal fonte intracelular de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH), que é essencial para a manutenção da homeostase redox, uma vez que NADPH é responsável pela regeneração de GSH (Figura 4) (STINCONE *et al*., 2014).

1.7 VIA DAS PENTOSES-FOSFATO

Células tumorais utilizam glicose, glutamina, lactato, piruvato, aceto acetato, acetato, e ácidos graxos livres com substratos para vias bioenergéticas que sustentam a proliferação celular (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al*., 2017). Entretanto, a glicose parece ser o composto mais amplamente utilizado devido a sua maior disponibilidade na geração de ATP. A glicose pode formar lactato, se metabolizada no citoplasma através da glicólise anaeróbica, ou gerar piruvato pela glicólise aeróbica, que por sua vez, é metabolizado pelo ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa na mitocôndria (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al*., 2017). Todavia, o metabolismo da glicose também envolve outras vias que são dependentes dessa molécula, incluindo a via das pentoses fosfato, que gera pentoses fosfato para a síntese de ribonucleotídeos e NADPH; a via hexosamina necessária para glicosilação de proteínas; glicogênese, que gera glicogênio para o armazenamento de glicose; via de biossíntese de aminoácidos (Figura 5) (HAY, 2016).



Fonte: Adaptado de MARTINEZ-OURSHOORN *et al*., 2017

Figura 5. Metabolismo celular da glicose. As células tumorais exibem altas taxas de anabolismo, e por consequência, captam grandes quantidades de glicose e glutamina e utilizam esses substratos para alimentar o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, bem como a via das pentoses fosfato, síntese de hexosamina (envolvida na síntese de moléculas glicosiladas), síntese de aminoácidos e lipídeos. Todas essas vias em conjunto geram substratos para suportar a proliferação celular. O aumento de EROs em células metabolicamente ativas requer a produção de níveis apropriados de antioxidantes, incluindo a GSH , que é regenerada por NADPH, produto da PPP (MARTINEZ-OURSHOORN *et al.*, 2017)

As células dos tecidos de mamíferos oxidam a glicose-6-fosfato (G6P) até piruvato na via metabólica denominada glicólise, porém, existem outros destinos catabólicos para G6P, dentre eles a via das pentoses fosfato. A PPP metaboliza glicose para a produção de ribose-5-fosfato e NADPH (TORRESANO *et al.,* 2020). O NADPH é uma coenzima que desempenha papel crucial no avanço do tumor, uma vez que oferece capacidade redutora para facilitar a regeneração de composto antioxidantes intracelulares, reduzindo os danos causados por EROs geradas pelo próprio tumor (PARK *et al.,* 2020). Além disso, o aumento do fluxo da PPP fornece os precursores da biossíntese de novos nucleotídeos, necessário para reparação de danos no DNA induzidos por EROs (MARNETT 2000).

A PPP é composta por duas fases: uma oxidativa e outra não oxidativa de interconversão de açúcares. A fase oxidativa é irreversível e envolve três reações enzimáticas que geram duas moléculas de NADPH e ribulose-5-fosfato. A fase não oxidativa é reversível, começa com ribulose-5-fosfato que é posteriormente transformado em ribose-5-fosfato e parte se epimeriza a xilulose-5-fosfato. Estas duas pentoses fosfato reciclam cinco moléculas de G6P permitindo a formação continua de NADPH (GHANEM *et al*., 2021). As células tumorais circulantes, bem como a metástase, são expostas a altas concentrações de oxigênio, que acarreta um aumento da produção de EROS nas mitocôndrias. Isso pode contribuir para a progressão do câncer e a resistência a quimioterápicos. Sendo assim, um maior poder redutor é demandado para neutralizar esses compostos. Desse modo, a PPP e o metabolismo de glutamina vão contribuir para formação de NADPH mais acelerada (PARK *et al*., 2020). A combinação do paclitaxel, um agente quimioterápico, com o inibidor competitivo do metabolismo glicolítico (2-deoxi-D-glicose) impediu o redirecionamento da glicose para a PPP e aumentou a eficácia, em relação ao grupo controle apenas com o quimioterápico, no tratamento de câncer de mama, remetendo a importância dessa via no tratamento de tumores (HADZIC *et al*., 2010).

As drogas concebidas para o tratamento do câncer que utilizam EROs podem ser separadas em duas categorias principais: as pró-oxidantes, por exemplo, a doxorrubicina, e os inibidores da capacidade antioxidante, como o isotiocianato de feniletila (TRACHOOTHAM *et al.,* 2009). Apesar de eficientes, para esse tipo de tratamento é preciso ser levado em conta o conjunto de mecanismos adaptativos, que não só ativam sistemas antioxidantes, como inibem a apoptose. Esta adaptação contribui para resistência a drogas anticâncer (DIEHN *et al.* 2009). Posto isso, existe uma necessidade de se melhorar a compreensão e as consequências fisiológicas e moleculares da exposição crônica de células tumorais ao estresse oxidativo, com o intuito de melhorar as estratégias quimioterápicas.

1.8 JUSTIFICATIVA

O tratamento da LMC com o mesilato de imatinibe ou a nova geração de inibidores de BCR-ABL, tais como nilotinibe e dasatinibe, diminui a proliferação de células tumorais (HAMAD, *et al*., 2013), porém ainda é insuficiente para erradicar as células que apresentam o fenótipo MDR. O claro entendimento do mecanismo celular responsável pela resistência aos quimioterápicos é de extrema importância, tanto para identificar as falhas no tratamento, como para possibilitar uma terapia eficaz e prevenir o reaparecimento da doença. Dessa forma, um tratamento direcionado diminuiria o risco de metástase e dos efeitos colaterais em células saudáveis, aumentando a sobrevida dos pacientes.

Células tumorais possuem alterações na produção de EROs e na capacidade do sistema de defesa antioxidante em relação a células normais, mantendo-se em um estreito equilíbrio que favorece a sinalização intracelular, aumentando, assim, a proliferação e resistência (CHEN *et al.*, 2014; GORRINI *et al.*, 2013; IZERADJENE, 2005). Por outro lado, isso pode tornar as células tumorais susceptíveis a danos causados pelo desequilíbrio redox induzidos por agentes exógenos que induzem a geração de EROs (NOGUEIRA; HAY, 2013).

Este trabalho visa fornecer subsídios para uma melhor compreensão das diferenças no status oxidativo e do sistema antioxidante em células de LMC, sensíveis e resistentes à vincristina (K562 e Lucena-1). Essas linhagens possuem o cromossomo Philadelphia, alta capacidade de proliferação e inibição de vias que disparam a apoptose. Entretanto, a Lucena-1 possui, adicionalmente, a expressão do gene *MDR1* cinco vezes maior do que a linhagem K562 resultando no fenótipo MDR (RUMJANECK *et al.*, 2001). Assim, as duas linhagens celulares serão submetidas a condições de estresse promovido por H_2O_2 e as respostas a esse cenário serão avaliadas comparativamente para contribuir com a compreensão da biologia tumoral.

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

Estudar as diferenças de susceptibilidade das linhagens celulares leucêmicas K562 e Lucena-1 ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 para compreender as respostas ao estresse oxidativo cada uma e suas peculiaridades, avaliando a influência da glicólise e da via das pentoses fosfato como potenciais vias de proteção antioxidante.

2.2 ESPECÍFICO

1- Caracterizar os efeitos de H_2O_2 sobre a viabilidade das duas linhagens de células tumorais de LMC;

2- Avaliar o papel da glicólise sobre a viabilidade metabólica frente ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 nas duas linhagens celulares;

3- Avaliar o papel da via das pentoses fosfato por meio do inibidor 6-AN na susceptibilidade ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 das linhagens estudadas;

4- Determinar o nível de sensibilidade das linhagens ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 em situação de privação de glicose e glutamina;

5- Avaliar as diferenças de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) entre as linhagens celulares em condição basal e com H_2O_2;

6- Investigar as diferenças dos sistemas de defesa antioxidante de cada linhagem tratadas com H_2O_2, bem como a expressão e atividade de enzimas antioxidantes;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados possuem o maior grau de pureza disponível comercialmente e a água utilizada para o preparo das soluções foi bidestilada e purificada pelo sistema Milli-Q. Os Anticorpos primários e secundários utilizados no ensaio de western blotting foram adquiridos da Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, USA. O CM-H_2DCFDA adquirido Life Technologies, Invitrogen™, Grand Island, NY, USA e todos os outros reagentes utilizados no preparo de meios e tampões da Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, USA.

3.2 CULTURA CELULAR

As células K562 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco ™, Grand Island, NY, USA) (v/v) inativado por calor, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL, pH 7.4. As células foram mantidas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C. Sendo que a linhagem Lucena-1 é derivada da linhagem K562, porém, portadora do fenótipo MDR. Foram adicionadas doses crescentes do alcaloide vincristina até torna-la resistente a esse fármaco. Portanto, em cada repique foi adicionado vincristina 60 nM. Os repiques foram realizados a cada 48 horas e as células foram utilizadas nos experimentos por até 8 passagens. Para os experimentos, as células foram centrifugadas (270 x *g* por 5 minutos), ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado e coradas com azul de *Tripan* 0,016% (v/v) para a contagem na câmara de Neubauer.

3.3 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

3.3.1 TESTE DE REDUÇÃO DO 1-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL) -3,5-DIFENILFORMAZAN (MTT)

As células (1×10^5 células/ mL) foram incubadas com RPMI 1640 + 10% SFB com diferentes concentrações de H_2O_2 em concentrações de 0 a 500 µM colocados em uma placa de 96 poços em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC por 24 horas. Após o período de incubação, foi adicionado 10 µL da solução de MTT (4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL) -3,5-

DIFENILFORMAZAN) (5 mg/ml) e as amostras foram incubadas por 4 horas. Os cristais de formazan foram solubilizados pela adição 80 µL da solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) 10% (m/v) em HCl (0,01 M) e incubados por 12 horas em temperatura ambiente. Após a leitura absorbância em 570 nm e 620 nm no leitor de placas (*SYNERGY HTX*, BioTek. USA), a porcentagem de células viáveis foi avaliada em relação ao controle sem adição da droga (100%). %. Os valores de EC_{50} (*half maximal effective concentration*) foram calculados como descrito em DE FARIA *et al*., (2015), usando Software Prism versão 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para a realização das curvas com moduladores as células foram incubadas por 24 horas com análogo da nicotinamida (6-AN) (250 µM) e 3-(3-piridinil) -1-(4- piridina) -2-propeno-1-ona (3PO) (0 a 30 µM).

3.3.2 TESTE DE EXCLUSÃO DE AZUL DE TRIPAN

As células (1×10^5 células/mL) foram incubadas em placas 24 poços com 1 mL de meio RPMI 1640 + 10% SFB e diferentes concentrações de H_2O_2 (0 a 500 µM) por 24 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC. Após este período, as células foram transferidas para micro tubos, centrifugadas por 1200 *g* por 10 minutos e ressuspensas em 200µL de RPMI 1640 + 10% SFB. Para a determinação da viabilidade, 20 µL da suspensão de células foi adicionada à solução de Azul de *Tripan* 0.016% (20 µL).

3.3.3 DUPLA MARCAÇÃO COM ANEXINA V-FITC E IODETO DE PROPÍDIO

As células K562 e Lucena-1 (1×10^5 células/ mL) foram incubadas com H_2O_2 nas concentrações de 0,01, 0,05, 0,1 e 0,5 mM em placas de 48 poços por 24 horas em estufa com 5,0 % de CO_2 a 37 ºC. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com 100 µL de PBS 1x e transferidos para micro tubos de 2,0 mL. As amostras foram centrifugadas a 700 g por 6 minutos e o precipitado foi ressuspendido em 50 µL de tampão anexina (HEPES 0,1 mol/L, NaCl 1,4 mol/L, $CaCl_2$ 2,5 mol/L, pH 7.4) e foi adicionado 3,0 µL de solução de anexina V-FITC e 3,0 µL de solução de iodeto de propídio (PI), conforme especificação do fabricante. A reação foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, foi adicionado 200 µL de tampão anexina. A intensidade de fluorescência foi avaliada utilizando o equipamento FACS Canto II (*BD, Bioscience, Bencton Dickinson, USA*) utilizando o laser *solid state Coherent® Sapphire™* 488-20 (azul) com

excitação em 488 nm, espelho dicróico 556LP e filtro *bandpass* 585/42 (para o canal de fluorescência PE) e espelho dicróico 502LP e filtro *bandpass* 530/30 (para o canal de fluorescência FITC). Os dados coletados foram avaliados através do *software* FACSDiva e Flow Jo (Tree Star, Inc., USA).

Normalmente a anexina V é utilizada para avaliar apoptose em linhagens celulares. A anexina V é uma proteína que tem alta afinidade por fosfatidilserina, um marcador de membrana externa expresso em células apoptóticas. Ao conjugar o isotiocianato de fluoresceína (FITC) à anexina V, é possível identificar e quantificar as células apoptóticas. Além disso, o iodeto de propídio (PI) é uma sonda fluorescente de interage com DNA de células mortas ou danificas, permitindo sua detecção e quantificação. A discriminação de células viáveis (Anexina -/PI-), células apoptóticas (anexina+/PI-), indicador de necrose secundária ou apoptose tardia (anexina +/ PI+) ou necrose (anexina -/PI+) (TAVAKOLI *et al.*, 2015).

3.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio nas células utilizando o marcador fluorescente 5,6-clorometil -2',7'-dicloro dihidrofluoresceina diacetato (CM-H_2DCFDA). As células (1 x 10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços para fluorescência e incubadas por 30 minutos com Ciclosporina 3,2 µM com o objetivo de inibir a atividade da P-gp, visto que o mecanismo de resistência da Lucena-1 já descrito em literatura, é pela superexpressão glicoproteína em sua membrana (MELLO C *et al*., 2006). Em seguida foi adicionado ao CM-H_2DCFDA 5 µM e incubado por 30 minutos. Após o período de incubação com o fluoróforo, as células foram centrifugadas a 1.200 *g* por 10 minutos. Em paralelo foi feita uma segunda placa com 200µL de meio base mais as respectivas concentrações de H_2O_2 0,1 mM ou *t*-BOOH (terc-butil hidroperóxido) 2 mM. Imediatamente após a centrifugação tirou-se o meio e adicionou as respectivas soluções de meio base, sendo assim, RPMI 1640 Base + H_2O_2 ou RPMI 1640 base + *t*-BOOH e iniciou-se a leitura espectrofluorimétrica do DCFH-DA durante o período de 120 minutos utilizando o leitor de microplacas *Synergy HT* (Biotek *Intruments Inc., Vermont, EUA*) em 485 e 528 nm, excitação e emissão, respectivamente.

3.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA

O conteúdo de GSH celular foi avaliado espectrofluorimetricamente utilizando o *O*-ftaldialdeído (OPT) como indicador. A GSH reage especificamente com o OPT produzindo um composto capaz de ser excitado em um comprimento de onda de 350 nm e emitir fluorescência em 420 nm em pH 8,0 (ALÍA *et al.,* 2005). As células (1 x 10^5 células/mL) foram incubadas em placas de 24 poços com RPMI 1640 + 10% SFB e com 0,1 mM de H_2O_2 em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC. Como controle positivo foi utilizado *t*-BOOH 2 mM. Assim como outros peróxidos orgânicos, o *t*-BOOH pode se decompor a outros radicais em uma reação auxiliada por íons metálicos que podem gerar EROs, incluindo H_2O_2. A decomposição do *t*-BOOH acelera as reações em cadeia da peroxidação lipídica e induz a toxicidade celular por dano ao DNA e depleção de GSH, resultando em alterações intracelulares (ALÍA *et al*., 2005). Após 24 horas as amostras foram centrifugadas em 1500 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de ácido tricloroacético 5% (m/v) e submetido sonicação e dosagem de proteína. Após correção da concentração das amostras, estas foram centrifugadas por 3000 *g* por 30 minutos. 50 µL do sobrenadante foi adicionado a 140 µL de meio glutationa (Na_2PO_4 10 mM + EDTA 5mM, pH 8.0) e 10 µL de OPT e incubado por 15 minutos no escuro. A fluorescência foi determinada utilizando os comprimentos de onda de 350 e 420 nm, para excitação e emissão, respectivamente, utilizando o leitor de microplacas *Synergy HT* (Biotek *Instruments Inc., Vermont*, EUA).

3.6 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

3.6.1 PREPARO DO LISADO CELULAR

As células K562 e Lucena-1 (1 × 10^5 células/ mL) foram incubadas com diferentes concentrações de H_2O_2 em 24 horas e em garrafas de 75 cm^2 contendo meio RPMI-1640 suplementado, em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 423 × g por 5 minutos a 4ºC e o precipitado foi lavado por três vezes com PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM) gelado. Após a última centrifugação, as amostras foram ressuspendidas em tampão de lise (RIPA 1X (*radioimmunoprecipitation assay buffer*) (cloreto de sódio 150 mM, Triton 1%, sódio desoxicolato 0,5%, SDS 0,1%, TRIS 50 mM pH 8.0 TRIS-HCl 20 mM pH 7.5, *protease/phosphatase inhibitor coktail* 1X, PMSF

(*phenylmethanesulfonyl fluoride*) 1 mM). Posteriormente, as amostras foram incubadas no gelo, sendo homogeneizadas no agitador de tubos a cada 15 minutos, por 10 segundos, durante 2 horas. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 16099 × g por 15 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi armazenado a − 20ºC.

3.6.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Foram preparados tubos de ensaio em triplicata para cada condição experimental, sendo o tubo branco composto apenas por água Milli-Q. Após a adição da água (200 µL para o branco, 150 µL para padrão e 198 µL para as amostras), foi adicionado nos respectivos tubos q.s.p 200 µL, respectivamente padrão 50 µL de BSA (0,1%) e amostra 2 µL do lisado. Posteriormente foram adicionados 2 mL do reagente de Lowry (reagente A (carbonato de sódio 2% e hidróxido de sódio 0,1 M) + reagente B (CuSO4.5H2O 0,5% e citrato de sódio 1%) na proporção 1:50 B:A) e as amostras foram incubadas por 10 minutos, em temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida, 200 µL do reagente de Folin (Sigma-Aldrich, EUA) (previamente diluído em água na proporção 1:1) foram adicionados, seguido por 30 minutos de incubação no escuro. Após este período, a absorbância foi determinada em 660 nm em um leitor de placas (S*ynergy HTX, BioTek).* A concentração final de proteína em µg/µL foi determinada com base na curva padrão de BSA.

3.6.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Após determinação da concentração de proteína obtida em cada lisad o celular, foi adicionado *sample buffer* 2x (TRIS-HCl 200 mM pH 6,8, SDS 8%, azul de bromofenol 0,04%, glicerol 40% e DTT (ditiotreitol) 200 mM) na proporção 1:1, de lisado e *sample buffer*. Em seguida as amostras foram colocadas no termobloco aquecedor IT-2002 (Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda, Barueri, SP, Brasil) a 95°C durante 5 minutos e depois armazenadas a −20°C até o momento do uso.

3.6.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLOACRILAMIDA E TRANSFERÊNCIA DE AMOSTRAS PARA MEMBRANA

Para a realização do *Western blotting*, 50µg dos extratos de proteínas totais foram desnaturados a 95ºC por 5 minutos e separados em condições redutoras por corrida eletroforética em gel SDS-PAGE (acrilamida/bisacrilamida 29:1), o gel de resolução foi preparado em tampão contendo 1,5 M tris-HCl pH 8,8 e 0,4% de SDS e o gel de empacotamento (*stacking gel)* a 5% de acrilamida em tampão contendo tris-HCl 125 mM pH 6,8 e 0,1% de SDS (m/v); persulfato de amônio 0,1% (m/V) e TEMED 0,2% (m/v). A porcentagem do gel de resolução variou entre 8 e 10% de acordo com a proteína de interesse. Após polimerização dos géis, as amostras foram aplicadas, sendo adicionado 50 µg para análise das proteínas totais e 6 µL do padrão de peso molecular *TrueColor High Range Protein Marker* (Sinapse). A eletroforese foi realizada com tensão constante de 100 V durante 90 minutos, no tampão de corrida contendo dodecilsulfato de sódio 7 mM, Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3. Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Milipore) utilizando o sistema *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad *Laboratories*, Inc., Hercules, CA, EUA) por 7 minutos com corrente elétrica constante em temperatura ambiente e em tampão de transferência contendo 20% (v/v) de etanol, SDS 7mM, glicina 190 mM e dTris 0,025 mM. A membrana foi bloqueada por 60 minutos em tampão TRIS salino (TBS-tween), contendo NaCl 150 mM, KCl 2,5 mM, Tween 0,05% (v/v) em Tris-HCl 0,025 mM, pH 7,4 e incubada overnight a 4ºC com o anticorpo primário de interesse em solução bloqueadora. Para normalização da expressão o procedimento foi realizado nas mesmas condições para uma proteína constitutiva (GAPDH). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: G6PD (#12263), PFKFB3 (#13123), PKM2 (#4053), LDH (#3582). Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram submetidas a três lavagens de cinco minutos com TBS-tween e incubadas por 60 minutos, protegidas da luz, à temperatura ambiente com os anticorpos secundários correspondentes. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS- T (2x de 10 minutos) e incubadas com anticorpo secundário específico *(anti-rabbit ou anti- mouse*) conjugado com peroxidase-HRP (*horseradish peroxidase*) (1:10.000) durante 1 hora. Após lavagem das membranas com TBS (*TRIS-buffered saline*: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM TRIS-base 25 mM) (2x de 10 minutos), as bandas foram detectadas utilizando o método quimioluminescente sobre adição do revelador (reagente A composto por luminol 2,5 mM, ácido p-cumárico 400 µM e TRIS-HCl 100 mM pH 8.5 + reagente B composto por H_2O_2 5,4

mM e TRIS-HCl 100 mM pH 8.5, na proporção de 1:1 A/B). As bandas foram detectadas por quimioluminescência no equipamento ChemiDoc MP Imaging System *(Bio-Rad Laboratories*, Inc., Hercules, CA, EUA).

3.7 GRÁFICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. As análises gráficas e os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc.). A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada através da análise da variância two way ANOVA e em caso de significância estatística, aplicou-se o pós-teste de Bonferroni considerando significância $p < 0.05$ e $n \geq 3$.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DAS LINHAGENS CELULARES DE LMC K562 E LUCENA-1 AO EFEITO CITOTÓXICO DE H_2O_2

O efeito citotóxico de H_2O_2 foi avaliado nas linhagens K562 e Lucena-1 pelo ensaio de MTT (Figura 6A) e pelo teste de exclusão do azul de tripan (Figura 6B). As células foram submetidas a diversos tratamentos para verificar a sensibilidade de cada linhagem.

O ensaio de MTT tem como princípio a redução deste composto , de coloração amarela, por desidrogenases de células viáveis à cristais de formazan, de coloração roxa, os quais são solubilizados e a absorbância da solução é determinada por espectrofotometria (STOCKERT *et al*., 2012; SCUDIERO *et al*., 1988). Entretanto, o azul de tripan é um corante capaz de penetrar na membrana de células mortas, diferente de células vivas que possuem a membrana intacta. Dessa forma, é possível quantificar células viáveis (STROBER, 2001).

Primeiramente foi avaliada a diferença entre as linhagens em relação a susceptibilidade ao estresse oxidativo. Deste modo, as células foram incubadas por 24 horas com as concentrações crescentes de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µM de H_2O_2 em estufa de CO_2 a 37°C, e os resultados estão apresentados na Figura 6. As linhagens K562 e Lucena-1 apresentaram uma diminuição na viabilidade de forma concentração-dependente quando expostas ao H_2O_2, porém a susceptibilidade da K562 foi significativamente maior do que a Lucena-1. A diferença entre as duas linhagens já pode ser observada logo nas primeiras concentrações do indutor de estresse oxidativo. Esse resultado foi obtido pelo método de MTT (Figura 6A) e confirmado pelo teste de azul de tripan (Figura 6B), sugerindo diferenças na quantidade ou tipo de defesa antioxidante entre as duas linhagens.

Ainda sobre esse resultado, de acordo com a Tabela 3, é possível ressaltar essa diferença pela comparação dos valores de EC_{50} compilados a partir da Figura 6. O valor de EC_{50} fornece informações sobre a potência do agente usado em promover o efeito avaliado, ou seja, neste caso quanto menor o valor de EC_{50}, mais citotóxico foi o H_2O_2 para célula. Os resultados obtidos mostraram que é necessário mais que o dobro da concentração de H_2O_2 para reduzir em 50 % a viabilidade da linhagem portadora do fenótipo MDR, Lucena-1 (109 µM), enquanto a K562 tem sua viabilidade reduzida já com a concentração de 45 µM. Dessa forma, esses dados mostram que a linhagem Lucena-1 é mais resistente ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 em comparação à K562.

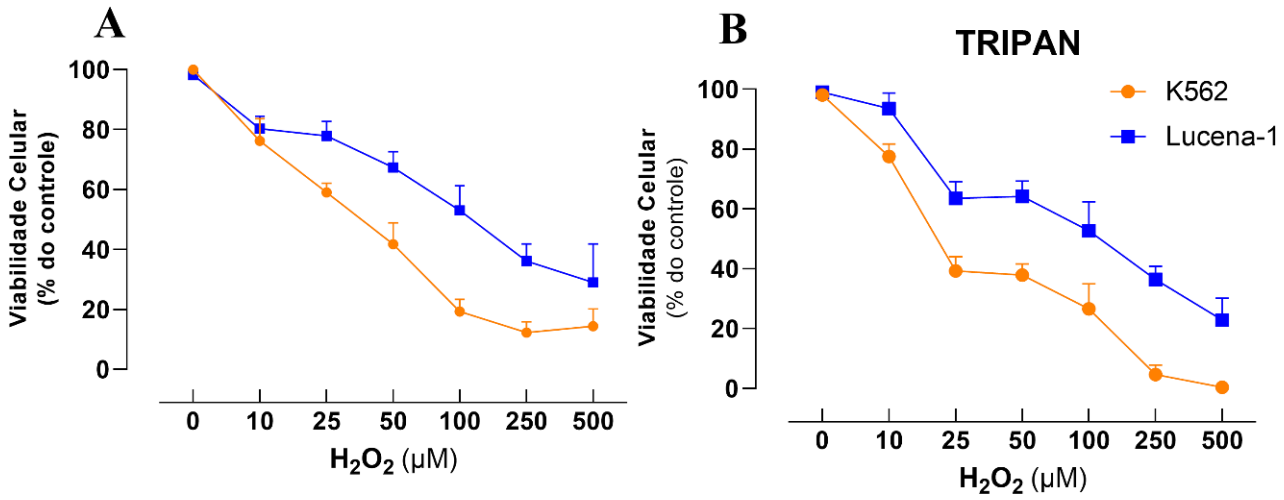


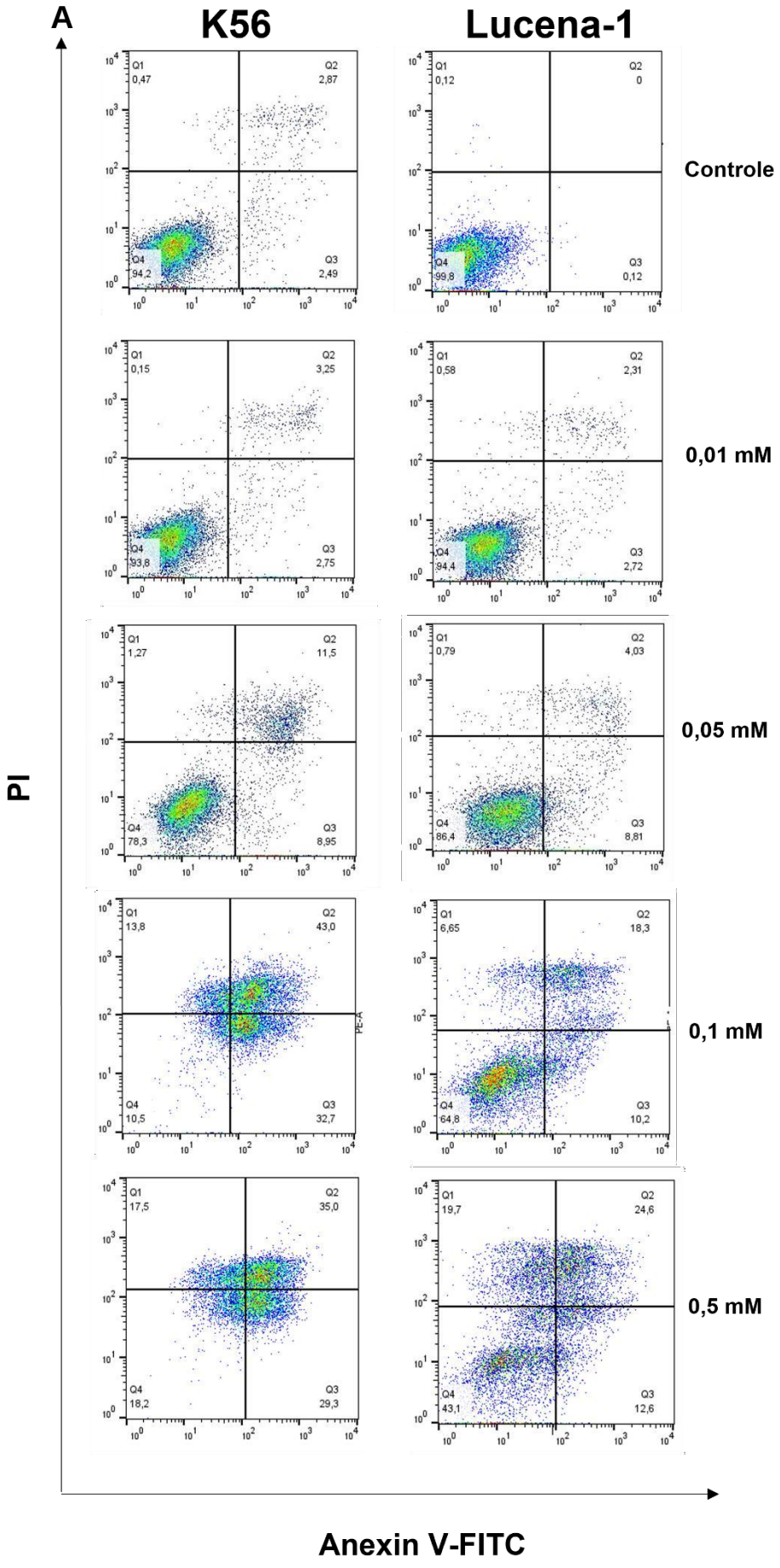
Figura 6. Efeito do estresse oxidativo induzido por H_2O_2 sobre a viabilidade de linhagens celulares de LMC. As linhagens K562 e Lucena-1 foram incubadas durante 24 horas com H_2O_2 em diferentes concentrações (10 a 500 µM). **(A)** Avaliação da citotoxicidade usando ensaio de redução por MTT. **(B)** E confirmado pelo teste de exclusão do Azul de Tripan. Os resultados são apresentados em média ± SD de três a cinco experimentos independentes realizados em triplicata .

Tabela 3. Valores de EC_{50} para citotoxicidade de H_2O_2 incubado por 24h em células de LMC

Linhagem Celular	**EC_{50} (µM)**
K562	45
Lucena-1	109

A anexina V-FITC se conjuga com a fosfatidilserina que é externalizada da membrana plasmática em morte celular apoptótica, já o iodeto de propídio é um agente intercalante de DNA que marca as células assumidas como não viáveis (CROWLEY *et al.*, 2016). A apoptose é um mecanismo de morte celular regulada que ocorre naturalmente no organismo como parte do desenvolvimento e da homeostase tecidual. Além disso, é caracterizada pela liberação de citocromo C das mitocôndrias, regulada por um equilíbrio entre proteínas pró apoptóticas e antiapoptóticas da família Bcl-2, caspases iniciadoras (caspase-8, 9 e 10) e caspases efetoras (caspase-3, 6 e 7), que culmina na desintegração coordenada da célula e remoção silenciosa e não inflamatória da célula morta por células próximas ou fagócitos (BEDOUI *et al.*, 2020;

BERTHELOOT *et al*., 2021). Entretanto, a necrose é um tipo de morte celular não programada que ocorre devido a lesões ou danos celulares irreversíveis, como falta de oxigênio, toxinas ou infecções. É caracterizada pela perda da integridade da membrana celular, causando ruptura da célula e pela liberação de conteúdo celular no ambiente extracelular, o que pode desencadear uma resposta inflamatória (BEDOU, *et al.,* 2020). Ainda temos um evento denominado necrose secundária ou apoptose tardia, que ocorre em células que estão passando por apoptose, porém, não foram engolfadas e digeridas por fagócitos em um estágio inicial. Isso pode ocorrer devido à sobrecarga da capacidade fagocítica em resposta a um apoptose de grande número de células malignas em um curto período de tempo. A morfologia de uma célula que passa por necrose secundária é semelhante a morte necrótica não programada (BEDOUI *et al.,* 2020). Diante disso, o experimento a seguir teve como objetivo analisar o tipo de morte celular das duas linhagens tumorais de LMC, bem como confirmar o efeito dos experimentos anteriores de viabilidade celular. No experimento realizado por citometria de fluxo tanto a linhagem Lucena-1 quanto K562 (Figuras 7A e 7B) não apresentaram diferença significativa de viabilidade na concentração de 0,01 mM de H_2O_2. Contudo, na concentração de 0,05 mM, podemos observar que a Lucena-1 apresenta maior viabilidade celular, quando comparada a K562, que apresenta marcações para apoptose (anexina+/PI–) e necrose secundária (anexina +/PI+). Quando aumentamos a concentração do peróxido de hidrogênio para 0,1 mM e 0,5 mM, os índices de marcação aumentaram para todos os tipos de morte celular e houve a diminuição evidente da viabilidade. Sendo que para K562, a concentração de 0,1 mM causou uma diminuição de cerca de 90% da viabilidade e indícios de necrose. Mesmo com as porcentagens apresentando variações de viabilidade celular, o resultado manteve-se o mesmo, indicando maior resistência da Lucena-1. Essa variação dos resultados deve-se ao fato dos métodos utilizados apresentarem princípios diferentes.


A
K56
Lucena-1
Controle
0,01 mM
0,05 mM
0,1 mM
0,5 mM
PI
Anexin V-FITC

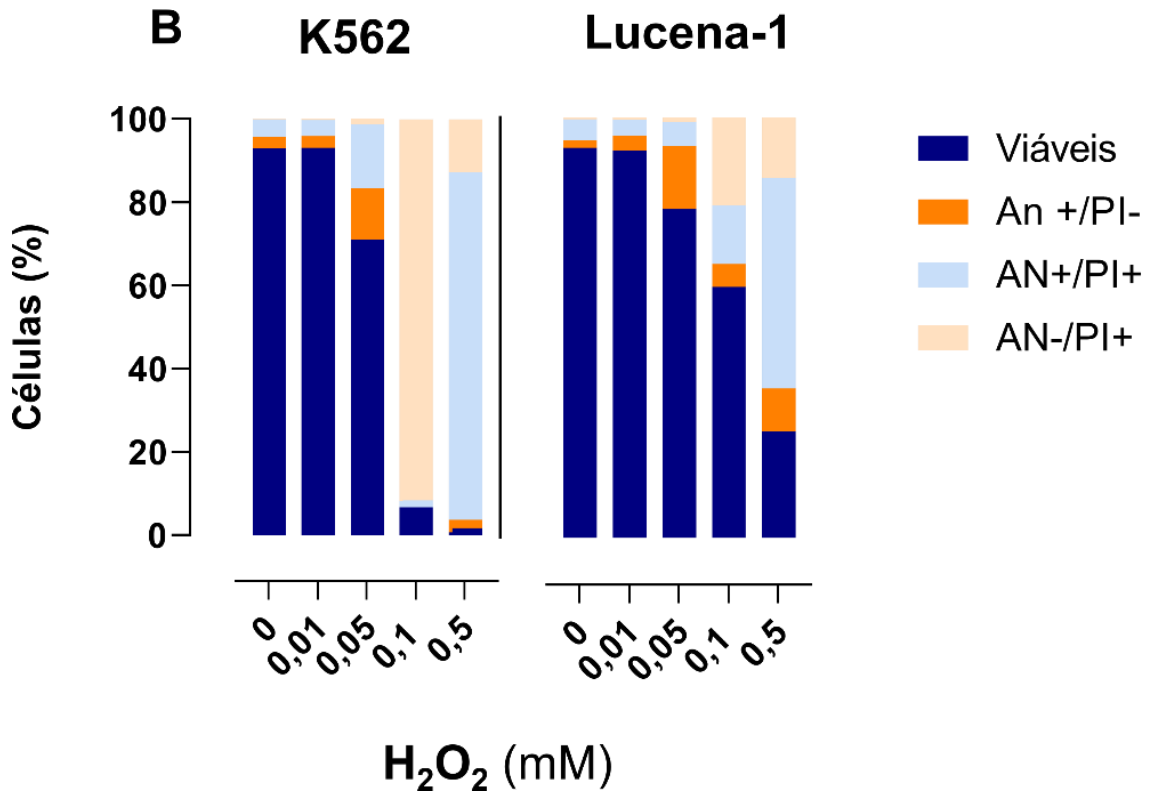


Figura 7. Análise da dupla marcação anexina-V FITC e iodeto de propídio das linhagens K562 e Lucena-1 após incubação com H_2O_2. As células foram incubadas por 24h a 37 ^oC em atmosfera com 5% de CO_2 com H_2O_2 nas concentrações de 0,01, 0,05, 0,1 e 0,5 mM. Após o período de incubação, as células foram marcadas com anexina-V FITC e PI. A intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. **(A)** gráfico de pontos representativo da intensidade de fluorescência da anexina -V FITC x PI na linhagem K562 e Lucena-1 **(B)** Resultados apresentados em média e desvio padrão de dois experimentos independentes das linhagens K562 e Lucena-1.

4.2 DIFERENÇAS NO ESTADO REDOX ENTRE AS LINHAGENS K562 E LUCENA 1

Existem muitos métodos para estimar a produção de radicais livres em células. O diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFH-DA) é uma das técnicas mais utilizadas para medir diretamente o estado redox de uma célula. Apresenta facilidade em sua metodologia de uso, é extremamente sensível e barato e pode ser usado para acompanhar mudanças no EROs ao longo do tempo (LEBEL; BONDY, 1990). A produção de EROs celular foi avaliada analisando as mudanças na intensidade de fluorescência resultantes da oxidação do fluoróforo. H_2DCF-DA entra nas células e é desacetilada pela esterase citoplasmática em diclorodihidrofluoresceína não fluorescente (DCFH). DCFH reage com EROs para formação

diclorofluoresceína (DCF), um produto fluorescente (YAGI *et al*., 2020). Para esse experimento as células foram incubadas com o fluoróforo e foi feita a leitura em 120 minutos, usando H_2O_2 na concentração de 0,1 mM e *t*-BOOH na concentração 2 mM. O *t*-BOOH, assim como o H_2O_2 é um peroxido, porém, considerado um hidroperóxido orgânico, que causa danos oxidativos ao DNA e peroxidação lipídica na célula, induzindo a formação de radicais livres (PLAZAR *et al*., 2007). Em relação à produção de EROs, a linhagem K562 mostrou ter uma produção basal maior que a Lucena-1 (Figura 8A). Quando o estresse foi induzido pelo H_2O_2 (0,1 mM) (Figura 8B) a diferença entre as duas linhagens não foi significativa, ambas se mantêm com a produção semelhante. Após a adição de *t*-BOOH (2 mM), a figura mostra uma mudança em que a produção de EROs pela K562 aumentou significativamente em relação a Lucena-1, que ao contrário, nessa condição diminui sua produção de EROs.

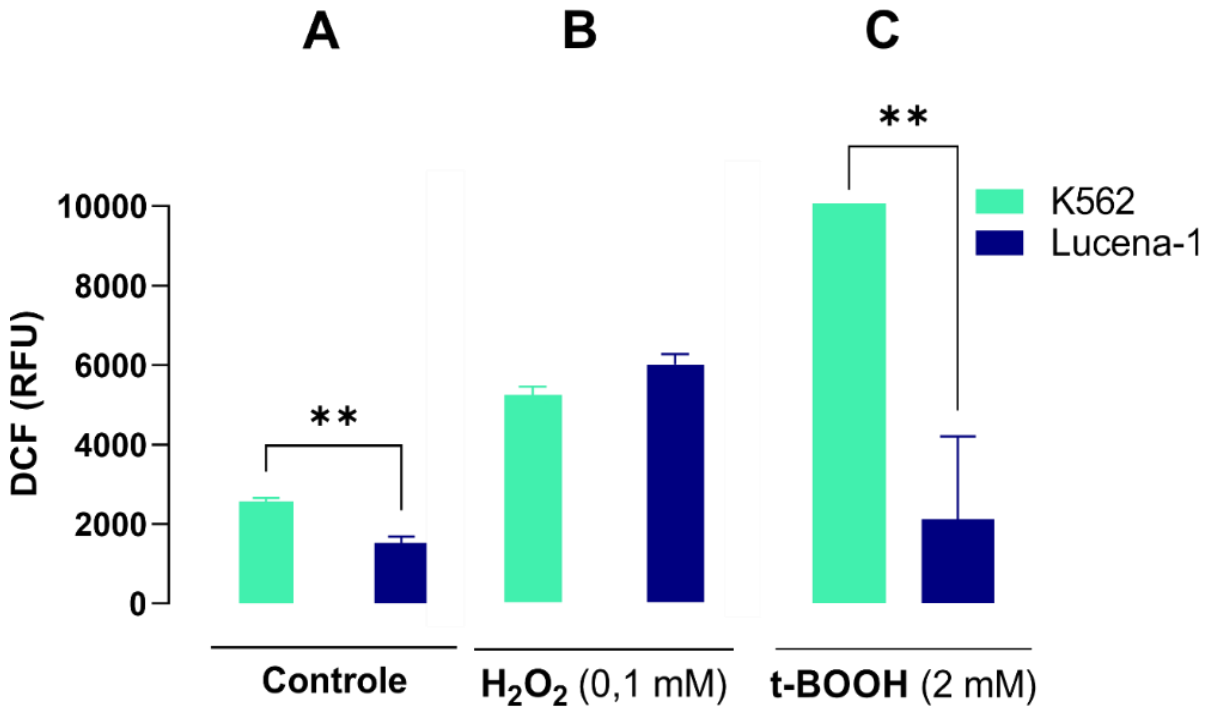


Figura 8. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio nas linhagens K562 e Lucena -1. Gráfico representativo da leitura da intensidade de fluorescência do H_2-DCFDA durante duas horas incubados com H_2O_2 ou *t*-BOOH**,** sendo (**A)** controle sem tratamento (**B**) H_2O_2 0,1 mM (**C**) *t*-BOOH 2 mM. Os resultados representam a média dos valores ± SD de 3 a 5 experimentos com a análise de variância (two way ANOVA) (**p < 0,01).

A glutationa (γ-glutamil-cisteína-glicina) é um tri peptídeo composto pelos aminoácidos cisteína, glicina e ácido glutâmico (FLOHÉ, L., 2012) é um dos mais abundantes e regeneráveis antioxidantes na célula, podendo estar em dois estados redox intercambiáveis: GSH e a

glutationa dissulfeto oxidada (GSSG) (COOPER *et al.*, 2011). A proteção contra o EROs pela glutationa ocorre pela formação de uma interação dissulfeto através de uma reação de troca (RS - SR + R'SH ↔ R'S – SR + RSH) na qual um elétron livre é doado para a EROs (LUSHCHAK 2011). Contudo, ela tem a propriedade de neutralizar os radicais livres e outros oxidantes, convertendo-os em formas menos prejudiciais (FLOHÉ. L., 2012). Esse experimento teve como objetivo medir a quantidade de GSH celular, uma vez que, a medição de GSH pode fornecer informações sobre o estado redox da célula (FLOHÉ. L., 2012)

De acordo com a Figura 9, a Lucena-1 apresenta quantidade maior de GSH na condição onde usamos 0,1 mM de H_2O_2 quando comparada a K562, mostrando que a Lucena-1 tem seus níveis de GSH preservados mesmo induzindo o estresse oxidativo. Diferindo-se do controle basal, em que as duas linhagens tinham produção semelhante de GSH, e com adição de *t*-BOOH as duas linhagens tem a produção diminuída.

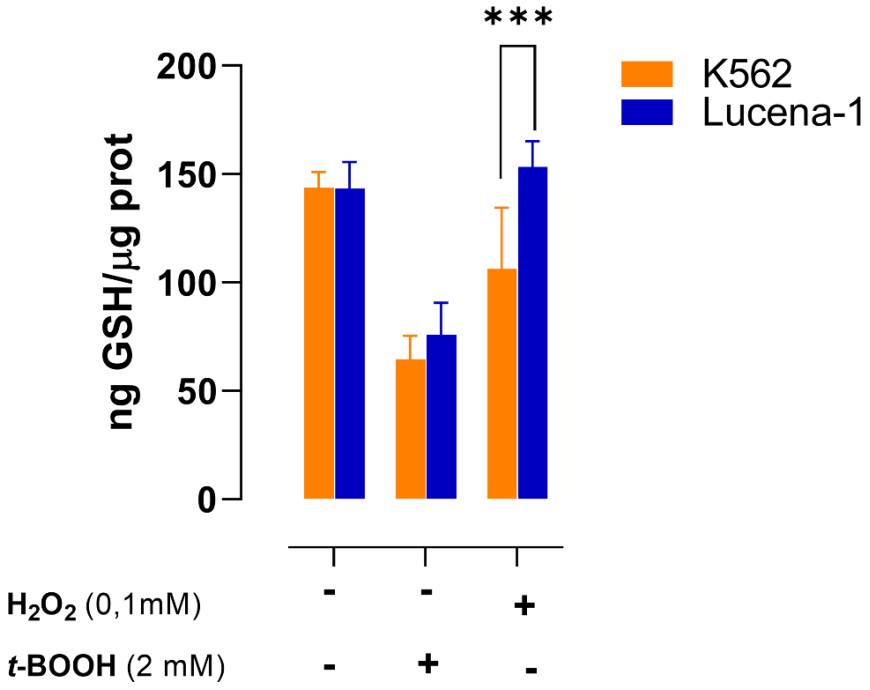


Figura 9. Análise da oxidação de GSH induzida por H_2O_2 ou *t*-BOOH nas linhagens K562 e Lucena-1. As células foram incubadas durante 3 horas com H_2O_2 0,1 mM. Como controle positivo usou-se o *t*-BOOH 2 mM. Os níveis de GSH foram estimados fluorimetricamente usando OPT como indicador. Os resultados representam a média dos valores ± SD de 3 a 5 experimentos com a análise de variância two way ANOVA e pós-teste Bonferroni. * indicam a diferença estatística entre as linhagens celulares (***p < 0,001).

4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR 6-AN E H_2O_2 NAS LINHAGENS K562 E LUCENA-1

Em seguida, as duas linhagens foram incubadas com H_2O_2 e com 6-AN que inibe a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma enzima chave na via das pentoses fosfato. Essa via metabólica alternativa está envolvida na produção de energia e biossíntese de nucleotídeos e pode fornecer substrato para a manutenção da homeostase redox da célula (KEISUKE; TOSHIO, 2014). O experimento a seguir teve o objetivo de esclarecer se a PPP está relacionada à resistência da Lucena-1 ao estresse oxidativo. Ademais, houve variação da porcentagem de glicose em relação ao meio de cultivo celular comum, usou-se um meio de cultura com a quantidade normal de glicose (2g/L) considerada como 100% e outro meio de cultura criado onde usou-se quatro partes do meio sem glicose e uma parte de meio comum contendo glicose, obtendo assim um meio de cultura com o equivalente a 25% de glicose. A glutamina, juntamente com a glicose, é um dos nutrientes mais abundantes no plasma. Os dois compostos são as maiores fontes de carbono e nitrogênio no metabolismo de células de mamíferos (DEBERARDINIS *et al*., 2007).

De acordo com os resultados ilustrados na Figura 10, é possível observar que, o H_2O_2 diminui de forma efetiva sobrevivência das duas linhagens. A K562 (Figura 10A), especificamente, tem uma maior susceptibilidade ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 se comparada à Lucena-1, quando usamos meio de cultura comum, considerado como 100% de glicose. Porém, no caso da Lucena-1, quando o tratamento com H_2O_2 (0,1 mM) é associado com o 6-AN (250 µM), o inibidor da PPP potencializa o efeito do estresse oxidativo e diminui a viabilidade da célula em relação ao tratamento apenas com o H_2O_2 tornando essa diferença significativa. O mesmo não acontece com a K562, pois quando é adicionado o 6-AN no tratamento, a viabilidade celular não diminuiu estatisticamente. Desse modo, esse resultado corrobora com a hipótese de que a resistência ao estresse oxidativo da Lucena-1 está relacionada com a PPP.

Na figura 10B, variamos a concentração de glicose a fim de avaliar a necessidade de glicose das células. Em meio com menor concentração de glicose, a K562 mostrou diminuição da viabilidade em 80%, depois de tratada com 0,1 mM de H_2O_2 e quando comparamos essa condição de tratamento em meio com 100% de glicose, verificamos que a K562 necessita de mais glicose disponível para o aumento da viabilidade celular. Na Lucena-1, a diferença de

concentração de glicose no meio de cultura não alterou significativamente a viabilidade, mostrando que a falta de glicose não afeta diretamente a viabilidade celular nessa linhagem.

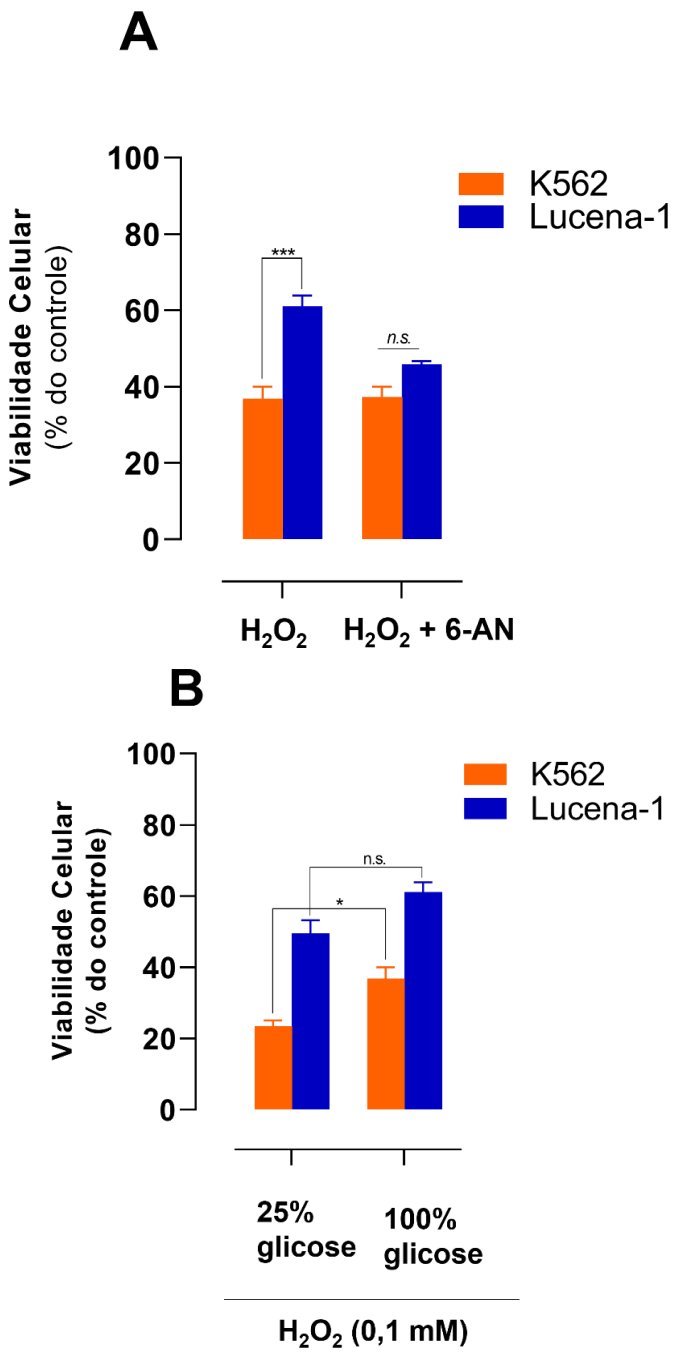


Figura 10. Efeito do 6-AN sobre a viabilidade celular e avaliação da disponibilidade de glicose das células K562 e Lucena-1 A viabilidade celular foi determinada por MTT após incubação com H_2O_2 0,1 mM por 24 horas. **(A)** K562 e Lucena-1 em meio de cultura RPMI 1640 ordinário (considerado como 100% de glicose), incubadas com H_2O_2 ou em associação à 6-AN 250 µM. **(B)** Lucena-1 e K562 incubadas com H_2O_2 em meio de cultura RPMI 1640 (considerado como 100% de glicose) e diluído 1:4 com RPMI 1640 sem glicose (considerado como 25% de glicose). Os resultados representam a média dos valores ± SD de 3 a 5 experimentos independentes. Para comparação estatística foi utilizada análise de variância (two way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os asteriscos indicam a significância estatística entre as linhagens celulares. (* $p<0,05$; ***$p<0,001$, n.s. $p> 0,05$).

4.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DA GLICOSE

Avaliamos a expressão de proteínas-chave envolvidas no metabolismo da glicose, G6PD para a PPP, 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatase-3 (PFKFB3) e piruvato quinase 2 (PKM2) para a glicólise e lactato desidrogenase (LDH) para a fermentação lática nas linhagens K562 e Lucena-1, afim de encontrar diferenças de expressão proteica entre as duas linhagens e investigar a participação das vias metabólicas (Figura 11). As células foram tratadas com duas concentrações de H_2O_2, a saber 0,01 e 0,1 mM. Na figura 11B, pode-se observar que Lucena-1 tem uma expressão significativamente aumentada de G6PD comparada a K562, sugerindo uma maior atividade da PPP, que potencialmente pode conferir maior proteção contra o estresse oxidativo. Essa enzima catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato a 6- fosfogluconolactona, ao mesmo tempo que reduz $NADP^+$ a NADPH. A G6PD é a primeira enzima da via das pentoses fosfato. Esta via fornece ribose e NADPH, moléculas que apoiam a biossíntese e a defesa antioxidante, respectivamente (LIN *et al*.,2015). A taxa de fluxo glicolítico é controlada em diferentes níveis e por vários mecanismos, um dos moduladores críticos é a conversão de frutose-6-fosfato em frutose-2,6-bifosfato (F-2,6-BP), pela enzima PFKFB3, impactando diretamente na velocidade da glicólise. Portanto, PFKFB3 é expressa de forma ubíqua, com níveis especialmente elevados em tecidos em proliferação, células transformadas, tumores sólidos e células leucêmicas (SHI *et al*., 2017). Em nosso resultado, observamos que em condições basais (Figura 11B) as duas linhagens têm expressão parecida dessa proteína. Já, ao analisar expressão da enzima PKM2, que está envolvida na regulação da glicólise, catalisa a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato em sua forma ativa, quando inativa, a forma mais expressa em tumores, desvia substratos para vias alternativas como a PPP. Notamos que houve um aumento de quase o dobro de expressão dessa proteína na Lucena-1 em comparação com a K562. No que se refere a LDH, podemos notar que também apresenta um aumento significativo na linhagem celular Lucena-1 quando comparada a K562, tanto em situação de estresse oxidativo (Figuras 11C e 11D) quanto em níveis basais (Figura 11B). Essa enzima participa da fermentação lática, onde a LDH catalisa a conversão de piruvato em lactato em condições anaeróbicas para fornecer a regeneração da coenzima NAD^+ necessária para dar continuidade a glicólise. Desse modo, quando observamos as células tratadas (Figuras 11C e 11D), existe um aumento na expressão por parte da Lucena-1 nas proteínas G6PD, PKM2 e

LDH em todas as condições. Já foi descrito em literatura que as EROs impactam em proteínas associadas a via glicolítica, como a PFKFB3 em linhagens celulares de LMA. Além disso, as células de leucemia mieloide exibem dependência da PFKFB3 tanto para o seu crescimento quanto para sua sobrevivência (ROBINSON *et al.*, 2020). A diminuição da PFKFB3 observada na Lucena-1 em condições de estresse oxidativo (figura 11D), pode indicar que a célula está adaptando seu metabolismo para esse evento, deslocando a glicose que seria utilizada na glicólise para PPP.

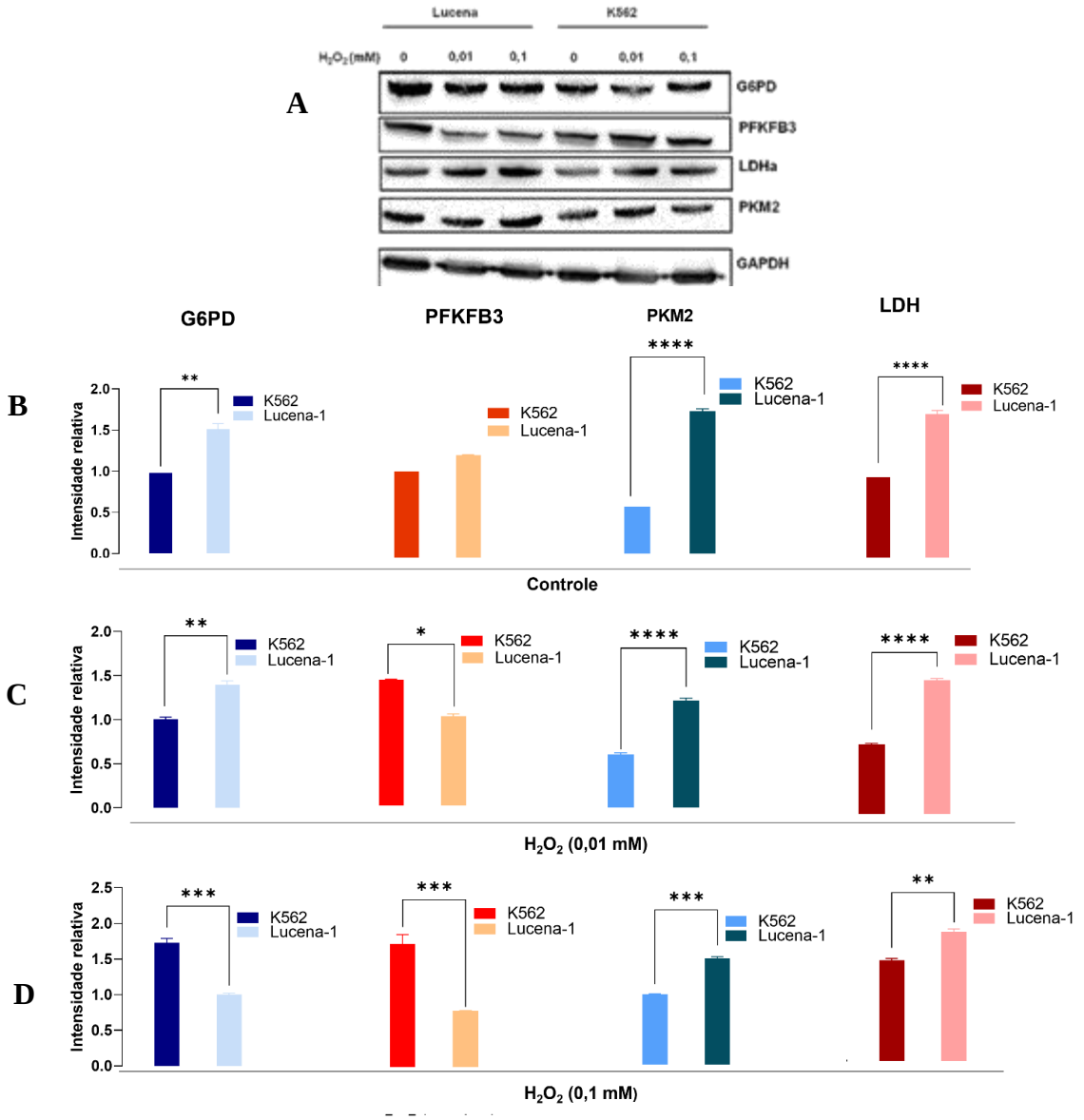


Figura 11. Análise da expressão das proteínas da glicólise e PPP. As linhagens K562 e Lucena -1 foram incubadas com diferentes concentrações de H_2O_2 por 24 horas e submetidas ao ensaio de Western blotting para detecção das proteínas G6PD, PFKFB3, LDH E PKM2 . A expressão dessas proteínas foi normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. **(A)** Imagem representativa das bandas de cada proteína . **(B)** K562 e Lucena-1 sem tratamento com H_2O_2 **(C)** K562 e Lucena-1 submetidas a tratamento com 0,01 mM de H_2O_2 **(D)** K562 e Lucena-1 submetidas a tratamento com 0,1 mM de H_2O_2. Os resultados representam a média dos valores ± SD de 3 a 5 experimentos com a análise de variância (two way ANOVA).

4.5 DETERMINAÇÃO DE CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR 3-PO

O 3PO é um composto permeável às células derivado de dipiridinil-propenona que inibe seletivamente a atividade da enzima PFKFB3, comumente expressa por células neoplásicas, diminuindo rapidamente a concentração de F-2,6-BP, suprimindo assim o fluxo glicolítico para a formação de lactato e a produção de ATP e NAD^+ (SCHOORS *et al*., 2014; CLEM *et al*., 2008).

Ainda com o objetivo de estudar se a resistência da Lucena-1 está relacionada com a glicólise, foi realizado um ensaio de redução por MTT com diferentes concentrações de 3PO (10 a 30 µM), para identificar a citotoxicidade do inibidor. A Figura 12 indica que independente da concentração do inibidor, a Lucena-1 foi mais resistente que a K562 à citotoxicidade deste inibidor.

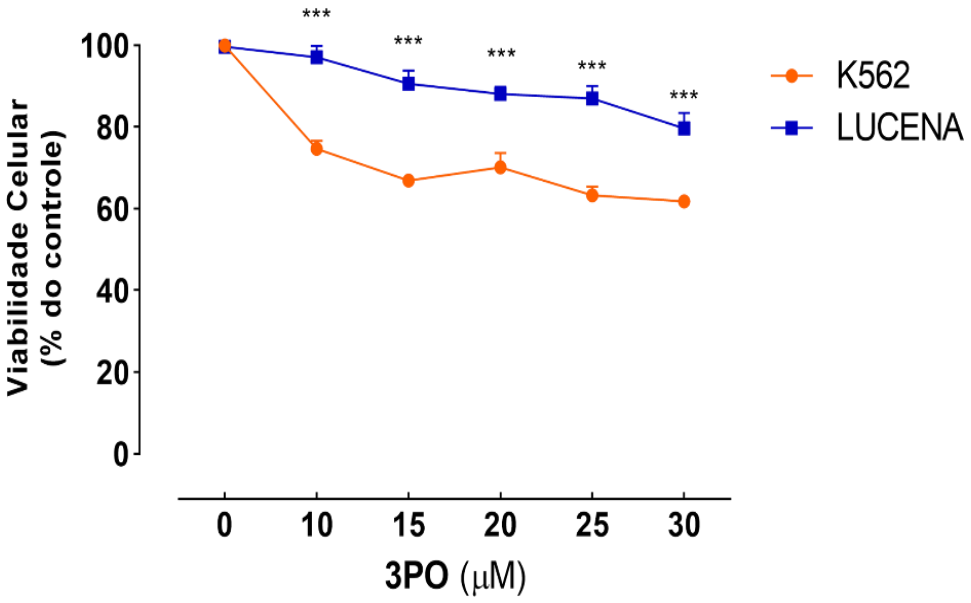


Figura 12. Efeito da 3PO na sobre a viabilidade das células K562 e Lucena-1. As células foram incubadas durante 24 horas com 3PO em diferentes concentrações (10 a 30 µM). Os resultados representam a média dos valores ± SD de 3 a 5 experimentos com a análise de variância (two way ANOVA) e pós-teste Bonferroni. * indicam a diferença estatística entre as linhagens celulares (***p < 0,001).

5 DISCUSSÃO

A resistência quimioterápica a múltiplos fármacos é o principal obstáculo no tratamento de diversos pacientes com tumor. O primeiro e melhor mecanismo caracterizado de multirresistência é a superexpressão de P-gp (RUMJANEK *et al.,* 2001). O modelo de uma linha celular de LMC humana é a K562, derivada de um derrame pleural de um paciente que sofreu de LMC em crise blástica terminal. Desse modo, a K562 foi a primeira linhagem tumoral de LMC com o cromossomo Ph positivo (RUMJANEK *et al*., 2013). O presente estudo foi conduzido usando a linhagem K562 e uma linhagem celular tumoral derivada da K562, exposta a concentrações crescentes do alcaloide Vincristina até se tornar resistente, no intuito de caracterizar as diferenças de cada linhagem. O mecanismo de resistência da Lucena-1 é pela superexpressão de P-gp e tem sua resistência revertida pelos quimio-sensibilizantes verapamil, trifluoperazina, clorpromazina e ciclosporina A (RUMJANEK *et al* 2001; MELLO *et al*., 2006). Estudos anteriores com a Lucena-1 mostraram que a expressão da proteína P-gp, em sua membrana celular era aumentada, com sua região genômica *ABCB1* cinco vezes amplificada em relação a K562 (MOREIRA *et al*., 2014). Essa proteína promove o efluxo de diversos fármacos das células tumorais, diminuindo a concentração intracelular e consequentemente sua ação, resultando em um aumento da resistência tumoral a agentes quimioterápicos. Foi demonstrado que a trifluoperazina diminuiu a expressão de P-gp em um modelo de leucemia resistente à adriamicina (SHIN *et al*., 2006). Apesar da inibição da P-gp já descrita para derivados fenotiazínicos em outros tipos celulares, nosso grupo de pesquisa, em um estudo feito anteriormente, não observou efeito parecido para clorpromazina em Lucena-1 (MELLO *et al*., 2016). Um dos primeiros estudos sobre o estabelecimento de uma linhagem tumoral resistente foi realizado em meados de 1983, com a indução de resistência *in vitro* de células K562 selecionadas usando doses crescentes de vincristina. A partir disso, várias linhagens tumorais com fenótipo MDR foram geradas e comparadas a células leucêmicas de pacientes com LMC incluindo linhagens resistentes ao imatinibe (RUMJANEK *et al*., 2013). Ferreira e colaboradores (2012), mostraram que o tratamento da linhagem Lucena-1 com vincristina leva a superexpressão de proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP). Indicam que essa proteína, está envolvida na resistência quimioterápica por manter as quinases Src e BCR-ABL em um estado mais ativo (FERREIRA *et al*., 2012).

A linhagem celular Lucena-1 é mais resistente ao H_2O_2 e à radiação ultravioleta (UV-A) do que a linhagem parental K562 (TRINDADE *et al.,* 1999). De fato, os nossos resultados

inicialmente obtidos confirmaram que a linhagem portadora de MDR é mais resistente aos efeitos do estresse oxidativo induzido por H_2O_2, mesmo nas concentrações mais baixas que foram utilizadas para esse ensaio (10 e 25 µM), resultado observado de acordo com a figura 6A no teste de redução por MTT e 6B no teste de exclusão de azul de tripan. Além disso, realizamos o ensaio de citometria de fluxo com anexina-V FITC/ PI, e confirmamos o efeito, sendo que nas concentrações 0,1 e 0,5 a viabilidade da K562 reduziu em mais de 90% e o estresse oxidativo causado por H_2O_2 levou a apoptose e necrose nessa linhagem (Figura 7B). Os testes são usados para determinar a viabilidade celular e confirmar o efeito citotóxicos das drogas. Esse efeito também é elucidado na Tabela 3, onde o EC_{50} da Lucena-1 (109 µM) é mais que dobro da K562 (45 µM).

O aumento dos níveis de EROs é bem observado em células tumorais (TRACHOOTHAM *et al*., 2008). Elucidar questões como qual participação das EROs na indução e progressão do tumor e se seu aumento é a razão ou uma consequência da doença auxiliaria o tratamento do câncer (ANTOSZEWSKA-SMITH *et al.,* 2017). De modo geral, as EROs induzem a instabilidade genômica em quase todas as células cancerígenas. Especificamente na LCM a mutação do gene *BCR-ABL1* induz o estresse oxidativo, que é responsável pela progressão da doença (KIM *et al.*, 2005; SATTLER *et al.*, 2000).

A relação entre o gene *BCR-ABL* estimulado, a produção de EROs e mutagênese têm sido considerados um ciclo de retroalimentação. O gene *BCR-ABL* aumenta a produção de EROs que, por sua vez, ataca os genes, provocando mutações. Deste modo, este ciclo pode ser visto como um condutor de apoptose em células que expressam BCR-ABL. Entretanto, provavelmente existam outros mecanismos de controle de EROs que influenciam na estabilidade genômica, permitindo que ocorra a transformação de células e impedindo a apoptose (MUVARAK *et al*., 2015; SLUPIANEK *et al*., 2013). Um estudo recente investigou a associação entre a expressão de Thimet oligopeptidase (THOP) e a resistência ao estresse oxidativo em células K562 e Lucena-1 e apontou um aumento significativo do gene *THOP1* e consequente aumento dos níveis dessa proteína na linhagem K562 em comparação com a Lucena-1, em condições de tratamento com H_2O_2, indicando que o poder redox já descrito da Lucena-1 influencia a modulação da expressão de THOP (NEVES *et al*., 2023). Para a verificação de que outras alterações conferem vantagem antioxidante à Lucena-1 em relação à K562, investigamos outras vias metabólicas.

Ensaios de viabilidade em diferentes condições foram realizados afim de explorar o metabolismo da glicose dessas duas linhagens de LMC. A PPP foi inibida, utilizando o 6-AN,

que se trata de uma amida do ácido monocarboxilico, antagonista potente da niacina. Atua como um inibidor competitivo das enzimas G6PD e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD) dependentes de NADP, inibidas por 6-AN aumentando os níveis da produção de EROs enquanto reduz a biossíntese de NADPH (GHANEM *et al*., 2021). A incubação de 6-AN impediu o crescimento de um painel de células de câncer de tireoide (LIU *et al.,* 2020). Além disso, em câncer de colorretal, o 6-AN reverteu o aumento observado da atividade de G6PD e também reprimiu a resistência a múltiplas drogas de câncer de cólon humano resistentes à doxorrubicina (POLIMENI *et al.,* 2011). Ademais, estudos mostraram que inibidores de PPP, sozinhos ou em combinação com terapias convencionais, oferecem estratégias de tratamento, especialmente em pacientes resistentes a quimioterapia, por exemplo a cisplatina (GIACOMINI *et al.*, 2020). A conclusão que obtivemos com esse experimento foi que a linhagem Lucena-1 passa a ser susceptível ao estresse oxidativo em condição onde o 6-AN e o H_2O_2 estão associados, desse modo, o 6-AN parece potencializar o efeito do agente oxidante (Figura 10), sugerindo a provável dependência da PPP para a defesa antioxidante da Lucena-1. Todavia, com a K562, não houve diferença significativa para a condição tratada com 6-AN em associação ao H_2O_2. Ainda, a variação de glicose no meio de cultura da linhagem Lucena-1 não afetou significativamente a viabilidade celular, mas no caso da linhagem K562, observamos um aumento da viabilidade quando aumentamos a glicose.

Várias situações patológicas, como doenças inflamatórias, tumores, isquemia/reperfusão e até tratamentos como radiação ou quimioterapia, induzem a superprodução de EROs. Por esse motivo, detectar e medir os níveis de EROs é essencial para estudos básicos, pré clínicos e clínicos (WU *et al.*, 2011). Assim, se tornou imprescindível em nosso trabalho o experimento para medição de EROs. Um estudo publicado por um grupo de pesquisa mostrou que houve um aumento da concentração de EROs em células de leucemia linfoide aguda (Jurkat), tratadas com camalexina após 6h de tratamento usando sondas de DCFH-DA (MEZENCEV *et al.,* 2011). Além disso, a sonda fluorescente dihidroetídio (DHE) foi usada para medir os níveis basais de ânion superóxido em células K562 e Lucena-1, e os resultados mostraram um aumento na K562 de quase três vezes em relação a Lucena-1 (NEVES *et al.,* 2023). Ao analisarmos os nossos ensaios sobre o estado redox celular (Figura 8), com medições de DCFH-DA, a linhagem K562 pareceu ter uma produção maior de EROs em comparação a Lucena-1, isso pode estar associado a quantidade de GSH que cada célula produz. Porém, quando as linhagens são submetidas a condição de estresse oxidativo induzido por H_2O_2, o inverso acontece, a Lucena-1 passa a produzir mais EROs se comparada com a

K562, ainda não encontramos relatos na literatura para explicar o porquê desse fenômeno. Somado a isso, a avaliação da produção de GSH (Figura 9) intracelular mostra que a Lucena-1 produz maior quantidade em relação à K562 quando tratada com H_2O_2 na concentração de 0,1 mM. Fato que, provavelmente, explica a maior resistência da Lucena-1 nos testes de viabilidade celular. Para este tipo de estudo com células, *t*-BOOH e H_2O_2 são os dois agentes oxidantes mais comumente utilizados (ALÍA *et al*.,2005). As células tumorais tem níveis elevados de moléculas do sistema de defesa antioxidante para a eliminação de EROs, como uma resposta adaptativa, sendo a GSH o principal agente redutor presente em concentrações milimolares no citosol. Portanto, essa molécula mantem um ambiente altamente redutor nos compartimentos celulares (citosol, núcleo, matriz mitocondrial e peroxissomo) para facilitar o dobramento e a atividade adequados (SINGH *et al*., 2022). Além disso, altos níveis de GSH nas células tumorais também incentivam a metástase e contribuem para o surgimento de resistência aos medicamentos quimioterápicos. Dados indicam que GSH elevado promove metástase tanto em melanoma quanto em câncer de fígado (CARRETERO *et al.*, 1999; HUANG, *et al*., 2001). Ademais, um estudo mostrou que a resistência à doxorrubicina está associada a um aumento na manutenção de GSH e a atividade de enzimas antioxidantes, incluindo a superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase na linhagem K562, sugerindo que a regulação redox dependente de GSH e das enzimas antioxidantes desempenha um papel importante na resistência celular à doxorubicina (KALININA *et al.,* 2001). You e colaboradores (2019), mostraram que a linhagem celular progenitora hematopoiética Baf3 transfectada com $FLT3^{ITD}$ e uma linhagem de LMA, MV4-11 resistentes a sorafenibe possuem um nível de GSH maior do que nas células sensíveis (YOU *et al*., 2019)

A expressão de algumas proteínas chaves no metabolismo da glicose foram avaliadas (Figura 11). Sendo que as proteínas G6PD, LDH e PKM2 tiveram expressão estatisticamente diferente entre as duas linhagens apresentadas em condições basais e tratadas. Diante do exposto observamos que, a Lucena-1 tende a ter uma maior expressão da proteína PKM2, que está ligada à resistência ao estresse oxidativo e à quimioterapia (CAIRNS *et al.,* 2011). A isoforma M2 da piruvato quinase (PKM2), é especificamente expressa em células de proliferação rápida, como células cancerígenas e afeta diretamente a glicólise, desviando substratos para as vias bioenergéticas alternativas e reduzidas de geração de NADPH (CAIRNS, *et al*., 2011). Di-hidroartenisinina (DHA), um derivado de artemisinina (ART), mostrou inibir a proliferação em K562 através da regulação da glicólise aeróbica mediada por PKM2 e GLUT1 (GAO *et al.,* 2020). Ademais, nossos experimentos mostraram que em condições basais e

tratadas com H_2O_2 a Lucena-1 não demonstrou aumento da PFKFB3 em relação a K562. Foi analisado em uma linhagem tumoral de leucemia linfoide U937, que quando a metilação de PFKFB3 é reduzida, a atividade da enzima fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) é diminuida, consequentemente, reduzindo a produção de F-2,6-BP , com aumento da utilização da PPP. Isso auxilia a célula tumoral a se proteger do estresse oxidativo e a produzir mais NADPH e GSH, que são importantes para sobrevivência celular. Tal mudança no metabolismo da glicose pode ajudar as células a se adaptarem a condições de estresse oxidativo (YAMAMOTO *et al*., 2014). Efeito semelhante também foi observado em células HeLa, quando em situação de estresse oxidativo, a atividade celular de PFKFB3 regulou os níveis de Fru-2-6-BP, e, portanto, o redirecionamento de metabolitos da glicólise para PPP (SEO e LEE, 2014). Logo, nosso resultado indica que essa diminuição de PFKFB3 observada na Lucena-1 também sugere que a linhagem está provavelmente usando a glicose como substrato para PPP a fim de aumentar seu poder redox, desse modo, podendo gerar energia a partir de outras moléculas.

Neste trabalho foi possível observar que a Lucena-1 demonstrou aumento da proteína LDH em relação à K562. Essa enzima contribui para a resistência ao paclitaxel / trastuzumab em câncer de mama (ZHAO *et al*., 2013). Sabe-se que a glicólise aeróbica é uma marca registrada no câncer humano (HEIDEN *et al.*, 2009) e a LDH é uma enzima chave na fermentação lática que converte piruvato em lactato, estudos indicam que, a inibição do LDH em modelos de câncer pancreático e de cólon (MIA PaCa-2 e HT29) redireciona o piruvato para fosforilação oxidativa, levando ao aumento da apoptose e à supressão do crescimento e progressão tumoral (OSHIMA *et al.*, 2020) e isso provavelmente se deve, ao fato do aumento da produção de EROs. No entanto, a via piruvato-lactato na sobrevivência das células tumorais é aparentemente dependente do tipo de tumor e do contexto celular, sendo que a inibição da LDH não afetou a sobrevivência das células de melanoma humano (PATHRIA *et al*., 2018).

A enzima G6PD e a via das pentoses fosfato são essenciais para promover o desenvolvimento de células tumorais, mas um grupo de pesquisadores mostraram que a ativação de G6PD aumentou a produção de EROs para ativar as vias de morte celular reguladas por EROs, induzindo assim a morte em modelos de mesotelioma humano (LU *et al*., 2022). Em células tumorais, ocorre o aumento na produção de NADPH via ativação de G6PD e, consequentemente, PPP, para suprir o excesso de EROS e manter a sobrevivência celular (KUEHNE *et al.*, 2015). Um estudo publicado investigou os mecanismos moleculares subjacentes à resistência ao sorafenibe em células de LMA e descobriu que a regulação da capacidade antioxidante e o intercambio metabólico podem estar envolvidos nessa resistência.

Curiosamente, observaram diminuição na expressão de G6PD, nos níveis de NADPH e a consequente, diminuição dos carbonos derivados da glicose para o fluxo de PPP nas células resistentes em comparação com as sensíveis. O estudo conclui que, as principais alterações metabólicas nas células resistentes podem estar associadas atividade glicolítica, acompanhada pelo ciclo de Krebs e uma taxa reduzida de PPP, porém com aumento de GSH e isso pode estar envolvido na resistência ao sorafenibe (YOU *et al* 2019). Apesar da resposta diferente obtida por esse grupo, usando linhagens de LMA, eles afirmam que a linhagem resistente a sorafenibe tem um maior pode antioxidante assim como demonstramos em nosso estudo com a linhagem resistente a vincristina, Lucena-1 e isso pode estar relacionado ao fenótipo MDR.

Clem e colaboradores identificaram uma pequena molécula inibidora da fosfofrutoquinase-2 (PFK-2), o 3PO. Foi sugerido que este composto diminui a captação de glicose e os níveis de F-2,6-BP e suprime o crescimento tumorigênico de células de adenocarcinoma da mama, leucemia e pulmão. Entretanto, devido à forte homologia de todas as quatro proteínas de PFKFB em seu domínio PFK-2, 3PO pode inibir não apenas o PFKFB- 3 (CLEM *et al*., 2008). Assim, a partir da análise desses dados, quando as células estão em condição basal a inibição da glicólise, ocasionada pelo 3PO (Figura 12), diminui a viabilidade da K562 e não altera a Lucena-1, indicando que a energia proveniente da glicólise não é essencial para Lucena-1.

Embora as descobertas aqui relatadas necessitem de mais estudos para elucidar completamente os mecanismos envolvidos na proliferação e sobrevivência de linhagens celulares de LMC e explorar o potencial envolvimento no fenótipo de MDR, esses resultados são indícios importantes para explorar novos alvos terapêuticos em células tumorais, induzindo sua morte por estresse oxidativo e diminuindo o risco do surgimento de células resistentes ao tratamento.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostram que o estresse oxidativo induzido por H_2O_2 causou diminuição da viabilidade e morte celular de forma concentração dependente em linhagens de LMC, entretanto, a linhagem portadora do fenótipo MDR, a Lucena-1 mostrou ser mais resistente aos efeitos do agente oxidante. Além disso, através do resultado que obtivemos com o experimento usando o inibidor seletivo da PPP, conseguimos concluir que a via das pentoses fosfato contribui para resistência ao estresse oxidativo observado na Lucena-1, uma vez que com a via das pentoses inibida essa linhagem celular tumoral se torna susceptível aos efeitos do H_2O_2 e que a glicólise não interfere diretamente nesse processo de homeostase redox da linhagem. Ainda, conclui-se que a expressão de algumas proteínas chave no metabolismo da glicose, podem sustentar esse mecanismo antioxidante da célula, como a PFKFB3 que possui baixa expressão na Lucena-1 desviando substratos para PPP e aumentando o poder redox da célula. Ademais, a resistência ao estresse oxidativo da linhagem Lucena-1 pode ser uma resposta adaptativa à resistência quimioterápica a vincristina, porém um maior detalhamento desse mecanismo ainda é necessário.

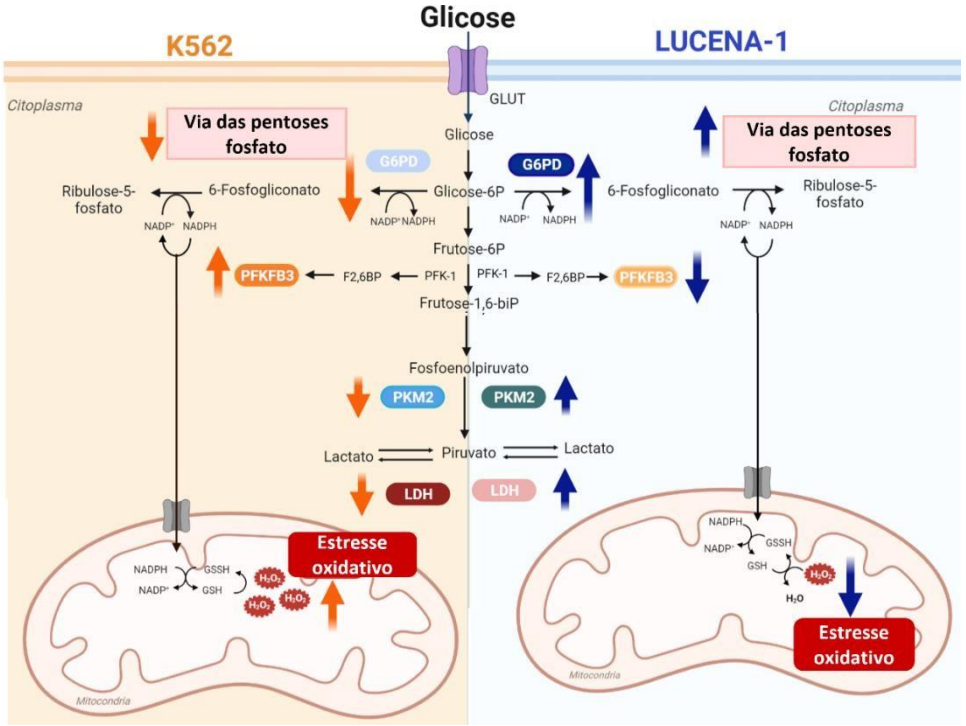


Figura 13. A via das pentoses fosfato contribui para a resistência ao estresse oxidativo da Lucena -1 (LMC resistente à vincristina) em relação à linhagem parental K562, sensível à vincristina. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a linhagem portadora do fenótipo MDR, Lucena-1 é mais resistente ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 por meio da maior utilização da PPP. Parece adaptar seu metabolismo afim de gerar aumento na produção de NADPH, que é um potente regenerador de GSH, e consequentemente diminui a quantidade de EROs intracelular e o estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

ADRIANI, P. P., DE PAIVA, F. C. R., DE OLIVEIRA, G. S., LEITE, A. C., SANCHES, A. S., LOPES, A. R., DIAS, M. V. B., CHAMBERGO, F. S. Structural and functional characterization of the glutathione peroxidase-like thioredoxin peroxidase from the fungus Trichoderma reesei. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 93-100, 2021. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.179

ALBERGHINA, L.; GAGLIO, D. Redox control of glutamine utilization in cancer. **Cell Death and Disease.** v. 5, e1561, p. 1-9, 2014**.** doi:10.1038/cddis.2014.513

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER. P. Molecular Biology of the Cell. 4th Ed. New York: **Garland Science**, 2002.

ALFAROUK, K. O., STOCK, C.-M., TAYLOR, S., WALSH, M., MUDDATHIR, A. K., VERDUZCO, D., BASHIR, A. H. H., MOHAMMED, O. Y., ELHASSAN, G. O., HARGUINDEY, S., RESHKIN, S. J., IBRAHIM, M. E., & RAUCH, C. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. **Cancer Cell International,** v. 15, n. 71, 2015.

ALÍA, M., RAMOS, S., MATEOS, R., BRAVO, L., GOYA, L. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2): Oxidative effect of t-BOOH and H_2O_2on HepG2. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology,** v.*19*(2), p.119–128. 2005. doi.org/10.1002/jbt.20061

ANTOSZEWSKA-SMITH, J. PAWLOWSKA, E. BLASIAK, J. Reactive oxygen species in BCR-ABL1-expressing cells - relevance to chronic myeloid leukemia. **Acta Biochim Pol**. v. 64, (1) p. 1-10, 2017. doi: 10.18388/abp.2016_1396

ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J.; BOROWITZ, M. J.; LEBEAU, M. M.; BLOOMFIELD, C. D.; CAZZOLA, M.; VARDIMAN, J. W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v.19;127(20):2391-405. 2016. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544

ARRIGONI, E., DEL RE, M., GALIMBERTI, S., RESTANTE, G., ROFI, E., CRUCITTA, S., BARATÈ, C., PETRINI, M., DANESI, R., DI PAOLO, A. Concise Review: Chronic Myeloid Leukemia: Stem Cell Niche and Response to Pharmacologic Treatment. **Stem Cells Translational Medicine,** v. 7, n. 3, p. 305–314, 2018. doi: 10.1002/sctm.17-0175

BACCARINI, M.; CASTAGNETTI, F.; GUGLIOTTA, G.; PALANDRI, F.; ROSTI, G. Tratamentrecommendations for cronic myeloid leukemia. **Mediterranean Journal of Hematology Infectious Disease**. v.6, n.1, p. 1-7, 2014. doi: 10.4084/MJHID.2014.005

BARAŃSKA, M.; LEWANDOWSKI, K.; GNIOT, M.; IWOŁA, M.; LEWANDOWSKA, M.; KOMARNICKI, M. Dasatinib treatment can overcome imatinib and nilotinib resistance in CML patient carrying F359I mutation of BCR-ABL oncogene**. J Appl Genet**. v. 49 (2), p. 201-203. 2008. doi: 10.1007/BF03195613

BAR-ZEEV M., LIVNEY Y.D., ASSARAF Y.G. Targeted nanomedicine for cancer therapeutics: Towards precision medicine overcoming drug resistance. **Drug Resist Updat**. v.2017;31:15–30. doi: 10.1016/j.drup.2017.05.002.

BEDOUI, S., HEROLD, M. J., STRASSER, A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology,** v.*21*(11), 678–695. 2020.

BEGICEVIC, R. R.; FALASCA, M. ABC transporters in cancer stem cells: Beyond chemoresistance. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 18, n. 11, 2017. doi: 10.3390/ijms18112362

BERTHELOOT, D., LATZ, E., FRANKLIN, B. S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. **Cellular & Molecular Immunology,** v.*18*(5), p.1106– 1121. 2021.

BHAMIDIPATI, P. K.; KANTARJIAN, H.; CORTES, J. CORNELISON, A. M.; JABBOUR, E. Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia. **Therapeutic Advances in Hematology**. v. 4(2) p. 103-117, 2013. doi: 10.1177/2040620712468289

BIXBY, D.; TALPAZ, M. Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**. v. 25, p. 7-22, 2010. doi: 10.1038/leu.2010.238

BOLLMANN, P. W.; del GIGLIO, A. Chronic myeloid leukemia: past, present, future. **Reviewing Basic Sciences Einstein**. v. 9(2):236-243, 2011. doi.org/10.1590/S1679-45082011RB2022

BUBNOFF, N.V.; DUYSTER, J. Chronic Myelogenous Leukemia. **Dtsch Arztebl Int,** v. 107, n. 7, p. 114-121, 2010.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nat Rev Cancer.** v. 11(2), 85-95, 2011.

CAMGOZ, A.; GENCER, E. B.; URAL, A. U.; BARAN, Y. Mechanisms responsible for nilotinib resistance in human chronic myeloid leukemia cells and reversal of resistance. **Leuk Lymphoma.** v. 54 (6), p. 1279- 1287, 2012.

CARRETERO, J., OBRADOR, E., ANASAGASTI, M. J., MARTIN, J. J., VIDAL-VANACLOCHA, F., ESTRELA, J. M. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. **Clinical & Experimental Metastasis**, v . 17(7), p. 567–574. 1999.

CHEN, K.G. SIKIC, B.I. Molecular pathways: regulation and therapeutic implications of multidrug resistance, **Clin. Cancer Res**. v. 18. p.1863-1869, 2012.

CHEN, J. Reactive Oxygen Species and Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. **Austin J Clin Pathol**. v.1(4) p. 1- 7, 2014.

CHEN, Y., XU, Q., JI, D., WEI, Y., CHEN, H., LI, T., WAN, B., YUAN, L., HUANG, R., CHEN, G. Inhibition of pentose phosphate pathway suppresses acute myelogenous leukemia. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and medicine**, v.*37*(5), p. 6027–6034. 2016.

CHEN, Z.; SHI T.; ZHANG L.; DENG M.; HUANG, C.; HU, T.; JIANG L.; LI J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. **Cancer Letters** v. 370, (1), p. 153–164, 2016.

CHIRIACO M, SALFA I, DI MATTEO G, ROSSI P, FINOCCHI A. Chronic Granulomatous Disease: Clinical, Molecular, and Therapeutic Aspects. **Pediatr Allergy Immunol**. v. 27:242–53. 2016. doi: 10.1111/pai.12527

CLEM, B.; TELANG, S.; CLEM, A.; YALCIN, A.; MEIER, J.; SIMMONS, A.; RASKU, M. A.; ARUMUGAM, S.; DEAN, W. L.; EATON, J.; LANE, A.; TRENT, J. O.; CHESNEY, J. Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. **Mol Cancer Ther**. v. 7(1), p. 110-120. 2008.

COLE. S. P. C.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J. H.; MACKIE, J. E.; GRANT, C. E.; ALNIQUIST. K. C.; STEWART, A. J.;KURZ, E. U.; DUNCAN,A. M. V.; DEELEY R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**. v. 258, p. 1650-1654. 1992.

COOPER, A. J. L.; PINTO, J. T.; CALLERY, P. S. "Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects," **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology,** v. 7, (7), p. 891-910, 2011.

CORTES, J., REA, D., & LIPTON, J. H. Treatment-free remission with first- and second- generation tyrosine kinase inhibitors. **American Journal of Hematology**, v. 94(3), p. 346–357. 2019.

CROWLEY, L.C.; MARFELL, B.J.; SCOTT, A.P.; WATERHOUSE, N.J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. Cold Spring Harbor Protocols, vol. 2016, n. 11, nov., 2016

DEAN, M.; HAMON, Y. CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Journal of Lipid Research**. v. 42, p. 1007-1017, 2001**.**

DEBERARDINIS, R.; MANCUSO, A.; DAIKHIN, E.; NISSIM, I.; YUDKOFF, M.; WEHRLI, S.; THOMPSON, C. B. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104 (49), p. 19345-19350, 2007.

DE FARIA, P.A., BETTANIN, F., CUNHA, R.L., PAREDES-GAMERO, E.J., HOMEM-DE-MELLO, P., NANTES, I.L., RODRIGUES, T. Cytotoxicity of phenothiazine derivatives associated with mitochondrial dysfunction: a structure-activity investigation. **Toxicology**. v. Apr 1;330:44-54. 2015. doi: 10.1016/j.tox.2015.02.004.

DIEHN. M.; CHO, R. W.; CLARKE, M. F. Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. **Semin Radiat Oncol**. v. 19. p. 78-86, 2009.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; O´BRIEN, S.; KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H.M. The biology of chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine,** v.341, n.3, p.164-172, 1999.

FANG, Z.; JIANG, C.; FENG, Y.; CHEN, R.; LIN, X.; ZHANG, Z.; HAN, L.; CHEN, X.; LI, H.; GUO, Y.; JIANG W. Effects of G6PD activity inhibition on the viability, ROS generation and mechanical properties of cervical cancer cells. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1863, (9), p. 2245-2254, 2016.

FARES, J., FARES, M. Y., KHACHFE, H. H., SALHAB, H. A., FARES, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy,** v.*5*(1), 28. 2020. doi: 10.1038/s41392-020-0134-x

FERRANDO, A.A., LÓPEZ-OTÍN, C. Clonal evolution in leukemia. **Nat Med**. (2017) Oct v.6;23(10):1135-1145. doi: 10.1038/nm.4410

FERREIRA, P. A., RUELA-DE-SOUSA, R. R., QUEIROZ, K. C. S., SOUZA, A. C. S., MILANI, R., PILLI, R. A., PEPPELENBOSCH, M. P., DEN HERTOG, J., FERREIRA, C. V. Knocking down low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) reverts chemoresistance through inactivation of Src and Bcr-Abl proteins. **PloS One**, v. *7*(9), e44312. 2012. doi.org/10.1371/journal.pone.0044312

FLIS, S., CHOJNACKI, T. Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities. **Drug Design, Development and Therapy,** v. 13, p. 825–843. 2019.

FLOHÉ, L. (2013). The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. **Biochimica et Biophysica Acta,** v.*1830*(5), p. 3139–3142. 2013.

FORD, R. C., BEIS, K. Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters. **Biochemical Society Transactions**, v. 47(1), p. 23–36. 2019.

GAMBACORTI-PASSERINI, et al., Bosutinib efficacy and safety in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib resistance or intolerance: Minimum 24-month follow-up. **American Journal of Hematology**. v. 89, (7), p. 732-742, 2014.

GAMBACORTI-PASSERINI, C. AND PIAZZA R. How I treat newly diagnosed chronic myeloid leukemia in 2015. **American journal of hematology**. v. 90 (2) p. 156-161, 2014.

GAO, P., SHEN, S., LI, X., LIU, D., MENG, Y., LIU, Y., ZHU, Y., ZHANG, J., LUO, P., GU, L. Dihydroartemisinin inhibits the proliferation of leukemia cells K562 by suppressing PKM2 and GLUT1 mediated aerobic glycolysis. **Drug Design, Development and Therapy**, v.14, p.2091–2100. 2020. doi: 10.2147/DDDT.S248872

GEARY CG. The story of chronic myeloid leukaemia. **Br J Haematol**. v. Jul;110(1):2-11. 2000. doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.02137.x

GHANEM, N., EL-BABA, C., ARAJI, K., EL-KHOURY, R., USTA, J., & DARWICHE, N. The pentose phosphate pathway in cancer: Regulation and therapeutic opportunities. **Chemotherapy**, v.66(5–6), p.179–191. 2021.

GIACOMINI, I., RAGAZZI, E., PASUT, G., MONTOPOLI, M. The pentose phosphate pathway and its involvement in cisplatin resistance. **International Journal of Molecular Sciences,** v**.***21*(3), 937. 2020. doi: 10.3390/ijms21030937

GREAVES, M. Leukaemia ‘firsts’ in cancer research and treatment. **Nature reviews**. v. 16 p. 163-172, 2016.

GORRINI, C, HARRIS, I.S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy**. Nat Rev Drug Discov**. v. 12, p. 931-947, 2013.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug Resistance in Cancer: Role of Atp-Dependent Transporters. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002.

HADZIC, T.; et al. Paclitaxel Combined with Inhibitors of Glucose and Hydroperoxide Metabolism Enhances Breast Cancer Cell Killing Via H_2O_2-Mediated Oxidative Stress. **Free Radic Biol Med.** v. 48(8), p. 1024-1033, 2010.

HAMAD A, SAHLI Z, EL SABBAN M, MOUTEIRIK M, NASR R. Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells. **Stem Cells Int** v. 2013 p. 1-13, 2013.

HANAHAN, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. In Cancer Discovery. **American Association for Cancer Research Inc**. v.12, p.31-46.2022.

HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **In Cell.** v. 144, p. 646–674. 2011.

HANNEKEN, A., LIN, F.-F., JOHNSON, J., MAHER, P. Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. **Investigative Ophthalmology & Visual Science,** v.47(7), p. 3164–3177. 2006.

HAY, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? **Nature Reviews. Cancer**, v.16(10), p. 635–649. 2016.

HEGEDŰS, C.; ÖZVEGY-LACZKA, C.; APÁTI, Á.; MAGÓCSI, M.; NÉMET, K.; ŐRFI, L.; KÉRI, G.; KATONA, M.; TAKÁTS, Z.; VÁRADI, A.; SZAKÁCS, G.; SARKADI. B. Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. v. 158 (4) p. 1153-1164, 2009.

HOLOHAN, C.; SCHAEYBROECK, S. V.; LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G.; Cancer drug resitance: na envolving paradigm. **Nat Ver Cancer**. v.13. p. 714-726, 2013.

HONG, H,; LU, Y.; JI, Z.N.; LIU, G. Q. Up-regulation of P-glycoprotein expression by glutathione depletion-induced oxidative stress in rat brain microvessel endothelial cells. **J Neurochem.** n. 98 p. 1465-1473, 2006.

HUANG, Z. Z., CHEN, C., ZENG, Z., YANG, H., OH, J., CHEN, L., LU, S. C. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology,** v.15(1), p.19–21.2001.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GCO). INTERNATIONAL AGENCY FOR RESERCH ON CANCER (IARC). **Cancer tomorrow**: Globocan. 2020. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype. Acesso em: 14 maio 2023.

IARC, International Cancer Research Agency. Leukaemia Source: Globocan (2020). The Global Cancer Observatory - All Rights Reserved, December, 2020. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/36-Leukaemia-fact-sheet.pdf. Acesso em 14 de maio de 2023.

ILLMER, T. et al. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. **Leukemia**, v. 18, n. 3, p. 401– 408, 2004.

ILARIA, R. L., VAN ETTEN, R. A. P210 and P190 BCR/ABL Induce the Tyrosine Phosphorylation and DNA Binding Activity of Multiple Specific STAT Family Members. J. Biol Chem. V.6;271(49):31704-10. 1996. doi: 10.1074/jbc.271.49.31704.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **O que é câncer**?. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer/. Acesso em:13 maio 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro**, (2019). Disponível em: https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil. Acesso em 14 de maio de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Atlas on-line de mortalidade**. Disponível em: https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo08/consultar.xhtml#panelResultado. Acesso em 15 de maio de 2023.

INDRAN, I. R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in câncer cells. **Biochm Biophys Acta**. v.1807. p. 735-745, 2011.

IZERADJENE, K.; DOUGLAS, L.; TILLMAN, D. M. Reactive oxygen species regulate caspase activation in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligandresistant human colon carcinoma cell lines. **Cancer Res**. v. 65, p. 7436-7445, 2005.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic Myeloid Leukemia: 2020 Update on Diagnosis, Therapy and Monitoring. **American Journal of Hematology**, n. March, p. 1– 19, 2020.

JAMIESON, C.H. Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells. **Hematology**, v.1, p.436-442, 2008.

JEAN KHOURY, H. et al. Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure**. Blood.** v. 119 (15) p. 3403-3412, 2012.

JEON, J. Y,; KIM, S. W.; PARK, K. C.; YUN, M. The bifunctional autophagic flux by 2- deoxyglucose to control survival or growth of prostate cancer cells. **BMC Cancer**. v. 15. p. 623-633, 2015.

KALININA, E., NOVICHKOVA, M., SCHERBAK, N. P., SOLOMKA, V., SAPRIN, A. N. GSH-dependent redox regulation and antioxidant enzymes in the formation of resistance to doxorubicin in K562 human erythroleukemia cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology,** v. 500, p. 241–244. 2001.

KAMPEN, R.K. The discovery and early understanding of leukemia. **Leuk Res**. v. Jan;36(1) p. 6-13. 2012. Doi: 10.1016/j.leukres.2011.09.028.

KEISUKE, I.; TOSHIO, S. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells.

Nature Reviews Molecular Cell Biology. v. 15 p. 243-256, 2014.

KELLAND, L. R. Targeting Established Tumor Vasculature: A Novel Approach to Cancer Treatment. **Current Cancer Therapy Reviews**. v. 1, p. 1-9, 2005.

KIM, J. H.; CHU, S. C.; GRAMLICH, J. L.; PRIDE, Y. B.; BABENDREIER, E.; CHAUHAN. D. et al. Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. **Blood**. v. 105, p. 1717-1723, 2005.

KOWALTOWSKI, A.J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reative oxygen species. Free Radic Biol Med. 47:333–343; 2009.
KRESO, A.; DICK, J. E. Evolution of the Câncer Stem Cell Model. **Cell Stem Cell**. v. 14, p. 275- 291, 2014.

KUEHNE, A., EMMERT, H., SOEHLE, J., WINNEFELD, M., FISCHER, F., WENCK, H., GALLINAT, S., TERSTEGEN, L., LUCIUS, R., HILDEBRAND, J., ZAMBONI, N. (2015). Acute activation of oxidative pentose phosphate pathway as first-line response to oxidative stress in human skin cells. **Molecular Cell,** v.59(3), p.359–371. 2015.

KUMAR, S.; YEDJOU, C. G.; TCHOUNWOU, P. B. Arsenic trioxide induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial pathway of apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 33, p. 42-54, 2014.

LAGAS, J. S., FAN, L., WAGENAAR, E., VLAMING, M. L. H., VAN TELLINGEN, O., BEIJNEN, J. H., & SCHINKEL, A. H. P-glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 16(1), p. 130–140. 2010.

LEBEL, C.P.; BONDY, S.C. Sensitive and rapid quantization of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes. **Neurochem Int**, v.17, n.3, p.435-40, jan., 1990.

LIANG, J.; CAO, R.; WANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, P.; GAO, H.; LI, C.; YANG, F.; ZENG1, R.; WEI, P.; LI , D.; LI, W.; YANG, W. Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2. **Cell Research**. v. 27 p. 329-351, 2017.

LIN, R.; ELF, S.; SHAN, C.; KANG, H. B.; J. I. Q.; ZHOU, L.; et al. 6-Phosphogluconate dehydrogenase links oxidative PPP, lipogenesis and tumour growth by inhibiting LKB1-AMPK signalling. **Nat Cell Biol**. v. 17: 1484-1496, 2015.

LIU, C.-L., HSU, Y.-C., LEE, J.-J., CHEN, M.-J., LIN, C.-H., HUANG, S.-Y., CHENG, S.-P. Targeting the pentose phosphate pathway increases reactive oxygen species and induces apoptosis in thyroid cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinology,** v. 499(110595)110595.2020.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance**.** **J Pathol**. v. 205 (2), p. 275-292, 2005.

LOWE, S. W.; RULEY, H. E.; JACKS, T.; HOUSNIAN, D. E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. **Cell**. v. 74, p. 957-967. 1993.

LU, C., YANG, D., KLEMENT, J. D., COLSON, Y. L., OBERLIES, N. H., PEARCE, C. J.,

COLBY, A. H., GRINSTAFF, M. W., LIU, Z., SHI, H., DING, H.-F.,LIU, K. H3K9me3 represses G6PD expression to suppress the pentose phosphate pathway and ROS production to promote human mesothelioma growth. **Oncogene,** v. 41(18), p. 2651–2662. 2022.

LUSHCHAK, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. **Journal of Amino Acids**. v. 2012, p. 1-26, 2011.

MAITI, A. K. Reactive Oxygen Species Reduction is a Key Underlying Mechanism of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. **Chemotherapy**. v. 1 (104), p. 1-5, 2012.

MANDANAS, R. A., LEIBOWITZ, D. S., GHAREHBAGHI, K., TAUCHI, T., BURGESS, G. S., MIYAZAWA, K., JAYARAM, H. N., & SCOTT BOSWELL, H. . Role of p21 RAS in p 2 1 0 bcr-abl Transformation of Murine Myeloid Cells. **Blood.** v. Sep 15;82(6):1838-47. 1993

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. v. 21(3)p. 361-370. 2000.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E., PEIRIS-PAGÉS, M., PESTELL, R. G., SOTGIA, F., & LISANTI, M. P. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. **Nature Reviews. Clinical Oncology, v.**14(1), p.31. 2017.

MAYUR, Y. C., PADMA, T., PARIMALA, B. H., CHANDRAMOULI, K. H., JAGADEESH, S., GOWDA, N. M. M., & THIMMAIAH, K. N. Sensitization of multidrug resistant (MDR) cancer cells to vinblastine by novel acridones: correlation between anti-calmodulin activity and anti-MDR activity. **Medicinal Chemistry (Shariqah (United Arab Emirates**)), v.2(1), p.63–77. 2006.

MEZENCEV, R., UPDEGROVE, T., KUTSCHY, P., REPOVSKÁ, M.,MCDONALD, J. F. Camalexin induces apoptosis in T-leukemia Jurkat cells by increased concentration of reactive oxygen species and activation of caspase-8 and caspase-9. **Journal of Natural Medicines,** v. 65(3–4), p. 488–499. 2011.

MCCOMB, R. B.; YUSHOK, W. D.; Metabolism of Ascites Tumor Cells. Iv. Enzymatic Reactions Involved in Adenosinetriphosphate Degradation Induced by 2-Deoxyglucose. **Cancer Res**. v. 24. p. 198-205, 19647.

MELO, J. V. AND D. J. BARNES. Chronic myeloid leukemia as a model of disease evolution in human cancer. Nat Rev Cancer v.7(6): 441-453. 2007.

MELLO, J. C. DE, MORAES, V. W., WATASHI, C. M., DA SILVA, D. C., CAVALCANTI, L. P., FRANCO, M. K., YOKAICHIYA, F., DE ARAUJO, D. R., RODRIGUES, T. Enhancement of chlorpromazine antitumor activity by Pluronics F127/L81 nanostructured system against human multidrug resistant leukemia. **Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society**, v.111, p.102–112. 2016.

MOREIRA, M. A. M., BAGNI, C., DE PINHO, M. B., MAC-CORMICK, T. M., DOS SANTOS MOTA, M., PINTO-SILVA, F. E., DAFLON-YUNES, N., RUMJANEK, V. M. (2014). Changes in gene expression profile in two multidrug resistant cell lines derived from a same drug sensitive cell line. **Leukemia Research**, v. 38(8), p. 983–987. 2014.

MUVARAK, N.; KELLEY, S.; ROBERT, C.; BAER, M. R.; PERROTTI, D.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; CIVIN, C.; SCHEIBNER, K.; RASSOOL, F. V. c-myc

generates repair errors via increased transcription of alternative-NHEJ factors, Lig3 and PARP1, in tyrosine kinase-activated leukemias. **Mol Cancer Res** v. 13: p. 699-712. 2015.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Disponível em https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq. Acesso em: 07 de abril de 2023.

NEVES, R. L., MAREM, A., CARMONA, B., ARATA, J. G., CYRILLO RAMOS, M. P., JUSTO, G. Z., MACHADO DE MELO, F. H., OLIVEIRA, V.,ICIMOTO, M. Y. Expression of thimet oligopeptidase (THOP) modulated by oxidative stress in human multidrug resistant (MDR) leukemia cells**. Biochimie,** v. *212*, p. 21–30.2023

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq Acesso em 13 de abril 2023.

NOGUEIRA V, HAY N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. **Clin Cancer Res**. v. 19, p.4309-4314, 2013.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia. **Science**, v. 132, p. 1497, 1960.

O'BRIEN, S.; JABBOUR, E. The Chronic Leukemias. In: Goldman's Cecil Medicine: **Twenty Fifth Edition**. v. 1p. 1246–1257.

OKON, I. S.; ZOU, M. H. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. v.100, p. 170–174, 2015.

OSHIMA, N., ISHIDA, R., KISHIMOTO, S., BEEBE, K., BRENDER, J. R., YAMAMOTO, K., URBAN, D., RAI, G., JOHNSON, M. S., BENAVIDES, G., SQUADRITO, G. L., CROOKS, D., JACKSON, J., JOSHI, A., MOTT, B. T., SHRIMP, J. H., MOSES, M. A., LEE, M.-J., YUNO, A., NECKERS, L. M. (2020). Dynamic imaging of LDH inhibition in tumors reveals rapid in vivo metabolic rewiring and vulnerability to combination therapy. **Cell Reports,** v. 30(6), p. 1798-1810.e4. 2020.

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **J Pharm Sci**. v. 96 n. 9 p. 2181- 2196, 2007.

PARK, J. H.; PYUN, W. Y.; PARK, H. H. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. **Cells,** v. 9, n. 10, 2020.

PASSEGUÉ, E., JAMIESON, C.H., AILLES, L.E., WEISSMAN, I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. Sep 30;100 Suppl 1(Suppl 1):11842-9. 2003

PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? **Nat Rev Drug Discov**. v. 13, p. 497-512, 2014.

PATHRIA, G., SCOTT, D. A., FENG, Y., SANG LEE, J., FUJITA, Y., ZHANG, G., SAHU, A. D., RUPPIN, E., HERLYN, M., OSTERMAN, A. L., RONAI, Z. A. Targeting the Warburg effect via LDHA inhibition engages ATF4 signaling for cancer cell survival. **The EMBO Journal,**

v.37(20), e99735. 2018.

PLAZAR, J., ZEGURA, B., LAH, T. T., FILIPIC, M. Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of benzo(a)pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. **Mutation Research,** v.632(1–2), 1–8.2007.

PICCOLI, C., D'APRILE, A., RIPOLI, M., SCRIMA, R., LECCE, L., BOFFOLI, D. Bone-Marrow Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Express Multiple Isoforms of NADPH Oxidase and Produce Constitutively Reactive Oxygen Species. **Biochem Biophys Res Commun**. v.353:965–72. 2007. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.148

POLIMENI, M., VOENA, C., KOPECKA, J., RIGANTI, C., PESCARMONA, G., BOSIA, A., GHIGO, D. Modulation of doxorubicin resistance by the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **The Biochemical Journal**, v.439(1), p. 141–149. 2011.

RAMANATHAN, B. et al. Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity. **Cancer Res**. v. 65, p. 8455-8460, 2005.

REDAELLI, S.; PIAZZA, R.; ROSTAGNO, R.; MAGISTRONI, V.; PERINI, P.; MAREGA, M.; GAMBACORTI-PASSERINI, C. Activity of Bosutinib, Dasatinib, and Nilotinib Against 18 Imatinib-Resistant BCR/ABL Mutants. **American Society of Clinical Oncology**. v. 27 (3), p. 469-471, 2008.

RENSCHLER, M. F. The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. **European Journal of Cancer .** v. 40 p. 1934-1940, 2004.

ROBINSON, A. J., HOPKINS, G. L., RASTOGI, N., HODGES, M., DOYLE, M., DAVIES, S., HOLE, P. S., OMIDVAR, N., DARLEY, R. L.,TONKS, A. Reactive oxygen species drive proliferation in acute myeloid leukemia via the glycolytic regulator PFKFB3. **Cancer Research,** v. 80(5), 937–949. 2020.

ROMO-GONZÁLEZ, M., IJURKO, C., & HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, Á. Reactive oxygen species and metabolism in leukemia: A dangerous liaison. **Frontiers in Immunolog**y, v.13, 889875. 2022.

ROSSARI, F., MINUTOLO, F., ORCIUOLO, E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy**. Journal of Hematology & Oncology**, v.11(1). 2018.

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

RUMJANEK, V. M.; et al. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. An. **Acad. Bras. Ciênc.** v. 73(1) p. 58-69, 2001.

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. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v.73(1), p. 57–69. 2001.

RUTH A., STEIN WD, ROSE E., RONINSON IB. Coordinate changes in drug resistance and drug-

induced conformational transitions in altered-function mutants of the multidrug transporter P-glycoprotein. **Biochemistry.** v **.** 40, p.4332–4339. 2001.

SACHA, T. Imatinib in chronic myeloid leukemia: an overview. **Mediterr J Hematol Infect Dis**. v. 6(1), p. 1-9, 2014.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, B., GUTIÉRREZ-HERRERO, S., LÓPEZ-RUANO, G., PRIETO- BERMEJO, R., ROMO-GONZÁLEZ, M., LLANILLO, M. NADPH Oxidases as Therapeutic Targets in Chronic Myelogenous Leukemia. **Clin Cancer Res**. v. 20:4014–25. 2014. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3044

SAPPINGTON, D. R.; SIEGEL, E. R.; HIATT, G.; DESAI, A.; PENNEY, R. B.; JAMSHIDI-PARSIAN, A.; GRIFFIN, R. J.; BOYSEN, G. Glutamine drives glutathione synthesis and contributes to radiation sensitivity of A549 and H460 lung cancer cell lines. **Biochim Biophys Acta**. v. 1860(4) p. 836-843, 2016.

SATTLER M.; VERMA, S.; SHRIKHANDE, G.; BYRNE, C. H.; PRIDE, Y. B.; WINKLER, T. et al. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. **J Biol Chem**. v. 275, p. 24273-24278, 2000.

SAWYERS, C. L. Signal transduction pathways involved in BCR-ABL transformation. **Baillieres Clin. Haematol**. v. 10, p. 223-231, 1997.

SCHAGGER, H. Respiratory chain supercomplexes. IUBMB Life 52(3-5): 119-28.2001. SHAROM, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmacogenomics**, v. 9(1), p.105–127. 2008.

SCHOORS, S.; DE BOCK, K.; CANTELMO, A. R.; et al. Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. **Cell Metab**. v. 19 p. 37- 48, 2014.

SCUDIERO, D.A.; SHOEMAKER, R.H.; PAULL, K.D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T.H.; CURRENS, M.J.; SENIFF, D.; BOYD, M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using a human and other tumor cell lines. **Cancer Research**, vol.48, n., p. 4827-4833, set., 1988.

SEO, M.; LEE, Y. H. PFKFB3 regulates oxidative stress homeostasis via its S-glutathionylation in cancer. **J Mol Biol**. v. 426(4), p. 830-842, 2014.

SHET, A.S.; JAHAGIRDAR, B.N.; VERFAILLIE, C.M. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. **Leukemia**, v.16, p.1402-1411, 2002.

SHI, L., PAN, H., LIU, Z., XIE, J., HAN, W. Roles of PFKFB3 in cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy,** v**.***2*, 17044. 2017.

SHIN, S. Y., CHOI, B. H., KIM, J.-R., KIM, J.-H., LEE, Y. H. Suppression of P-glycoprotein expression by antipsychotics trifluoperazine in adriamycin-resistant L1210 mouse leukemia cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v.28(4),p. 300–306. 2006.

SILIC-BENUSSI, M., SHAROVA, E., CICCARESE, F., CAVALLARI, I., RAIMONDI, V., URSO, L., CORRADIN, A., KOTLER, H., SCATTOLIN, G., BULDINI, B., FRANCESCATO, S., BASSO,

G., MINUZZO, S. A., INDRACCOLO, S., D'AGOSTINO, D.
M., CIMINALE, V. mTOR inhibition downregulates glucose-6-phosphate dehydrogenase and induces ROS-dependent death in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. **Redox Biology,** v. 51(102268), 102268. 2022.

SINGH, P., YADAV, R., VERMA, M., & CHHABRA, R. Antileukemic activity of hsa-miR- 203a-5p by limiting glutathione metabolism in imatinib-resistant K562 cells. ***Current Issues in*** **Molecular Biology**, v. *44*(12), p. 6428–6438. 2022.

SLUPIANEK. A.; FALINSKI, R.; ZNOJEK, P.; STOKLOSA, T.; FLIS, S.; DONEDDU, V.; PYTEL, D.; SYNOWIEC, E.; BLASIAK, J.; BELLACOSA, A.; SKORSKI, T. BCR-ABL1 kinase inhibits uracil DNA glycosylase UNG2 to enhance oxidative DNA damage and stimulate genomic instability. **Leukemia** v. 27, p. 629p634. 2013.

SMITH, J. A.; PAWLOWSKA, E.; BLASIAK, J. Reactive oxygen species in BCR-ABL1- expressing cells -relevance to chronic myeloid leukemia. **Acta Biochimica Polonica** v. 64, n. 1 p. 1-10,2017.

STINCONE A.; et al. The return of metabolism: biochemistryand physiology of the pentose phosphatepathway. **Biol Rev Camb Philos**. v. 90, p. 927-963, 2014.

STRATTON, M. R.; PETER J. CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature.** v. 458(7239), p. 719–724, 2009.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Current Protocols in Immunology. **Curr Protoc Immunol**. vol.21, n.3B. 2001.

STOCKERT, J.C.; BLÁSQUEZ-CASTRO, A.; CANETE, M. HOROBIN, R.W. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the Formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, (8), p.785-796, 2012.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOHC, H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: An overview. v.12 (1), p. 376-390. 2013.

TAMASCAR, I.; RAMANARAYANAN, J. Targeted treatment of chronic myeloid leukemia: Role of imatinib. **OncoTargets and Therapy**, v. 2, p. 63–71, 2009.

TERADA, Y.; OGURA, J.; TSUJIMOTO, T.; KUWAYAMA, K.; KOIZUMI, T.; SASAKI, S. Intestinal P-glycoprotein expression is multimodally regulated by intestinal ischemia- reperfusion. **J Pharm Pharm Sci.** v. 17, p. 266-276, 2014.

TONKS, A; DARLEY, R. L.; HOLE, P.S. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias?. **Blood**., v. 117, p. 5816-26, 2011.

TAVAKOLI, M. B., KHEIROLLAHI, M., KIANI, A., KAZEMI, M., JAVANMARD, S. H., MOHEBAT, L. Annexin V FITC conjugated as a radiation toxicity indicator in lymphocytes following radiation overexposure in radiotherapy programs. **Advanced Biomedical Research,** v.4(1), 119. 2015.

TORRESANO, L., NUEVO-TAPIOLES, C., SANTACATTERINA, F., CUEZVA, J. M. Metabolic reprogramming and disease progression in cancer patients. Biochimica et Biophysica **Acta. Molecular Basis of Disease**, v.1866(5), 165721. 2020.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS- mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat Rev Drug Discov**. v. 8 n. 7 p. 579- 591, 2009.

TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; OGASAWARA, M. A.; NILSA, R. D.; HUANG, P. Redox regulation of cell survival. **Antioxid Redox Signal**. v. 10(8), p. 1343-1374. 2008.

TRELA, E.; GLOWACKI, S.; BLASIAK, J. Therapy of chronic myeloid leukemia: twilight of the imatinib era? **ISRN Oncology**. v.30, p.1, 2014.

TRINDADE GS, CAPELLA LS, LEITE AC, DE FREITAS MS, MOURA NETO V, CAPELLA MAM & RUMJANEK VM. 1999. Diferenças na sensibilidade a agentes oxidativos de uma linhagem celular multirresistente que superexpressa a glicoproteína P. In: Anais do 17º Congresso Internacional de Câncer. Bolonha. Monduzzi Editore, pág. 179-182

UDENSI, U. K.; TCHOUNWOU, P. B. Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment.**Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. v. 33, p.106-121. 2014.

VADLAPATLA, R. K., VADLAPUDI, A. D., PAL, D., & MITRA, A. K. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy: coordinated role and regulation of efflux transporters and metabolizing enzymes. **Current Pharmaceutical Design**, v.19(40), p.7126–7140. 2013.

VAGHARI-TABARI, M., FERNS, G. A., QUJEQ, D., ANDEVARI, A. N., SABAHI, Z., & MOEIN, S. Signaling, metabolism, and cancer: An important relationship for therapeutic intervention**. Journal of Cellular Physiology, v.** 236(8). 2021.

VAIDYANATHAN, A., SAWERS, L., GANNON, A.-L., CHAKRAVARTY, P., SCOTT, A. L., BRAY, S. E., FERGUSON, M. J., & SMITH, G. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 115(4), p. 431–441. 2016.

VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L. C., THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science (New York, N.Y.)**, v. *324*(5930), p. 1029–1033. 2009.

VASILIOU, V., VASILIOU, K., NEBERT, D. W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. **Human Genomics**, v. 3(3), 281. 2008.

WARTENBERG. M.; et al. Glycolytic pyruvate regulates P-Glycoprotein expression in multicellular tumor spheroids via modulation of the intracellular redox state. **J Cell Biochem.** v. 109, p. 434-446, 2010.

WEISBERG, E.; MANLEY, P. W.; COWAN-JACOB, S. W.; HOCHHAUS, A.; GRIFFIN, J. D. Secon geration inhibitors of BCR-ABL for treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia**. Nature,** v.7, p. 345-356, 2007.

WEN-SHENG, W. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. **Cancer Metastasis Rev.** v. 25, p. 695-705, 2006.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: https://www.who.int/news- room/fact-sheets/detail/cancer. Acesso em: 08 de maio de 2023.

WU, D., YOTNDA, P. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, v. *57*. 2011.

YAGI, H., ULICI, V.,TUAN, R. S. Polyphenols suppress inducible oxidative stress in human osteoarthritic and bovine chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage Open,** v. *2*(3), 100064. 2020.

YALÇINTEPE, L.; HALIS, E.; ULKU, L. Effect of CD38 on the multidrug resistance of human chronic myelogenous leukemia K562 cells to doxorubicin. **Oncology letters**. v. 11, p. 2290- 2296, 2016.

YAMAMOTO, T.; TAKANO, N.; ISHIWATA, K.; OHMURA, M.; NAGAHATA, Y.; MATSUURA, T.; KAMATA, A.; SAKAMOTO, K.; NAKANISHI, T.; KUBO, A.; HISHIKI, T.; SUEMATSU, M. Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. **Nature Communications.** v.5 (3480), p. 1-16, 2014.

ZHAO, Y.; BUTLER, E. B.; TAN, M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. **Cell Death Dis**. v. 4, e532, 2013.

ZHANG, C.; ZHANG, Z.; ZHU Y.; QIN, S. Glucose- 6- phosphate Dehydrogenase: a Biomarker and Potential Therapeutic Target for Cancer**. Anti- Cancer Agents in Medicinal Chemistry**.. v.14 p. 280-289. 2014.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?. **Trends Cell Biol.,** v.18, p.165-173, 2008.

ZHELEV, Z.; et al. Tissue redox activity as a sensing platform for imaging of cancer based on nitroxide redox cycle. **Eur J Cancer**. v. 49, p. 1467-1478, 2013.