

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Indução da síntese de hemoglobina em células K562 por
doxorrubicina e aclarrubicina: em busca de um mecanismo em
comum**

Andrés Delgado Cañedo

**Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências.**

**Orientadora: Profa. Dra. Nance Beyer Nardi
Co-orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies**

**Porto Alegre
Fevereiro 2005**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento de FAPERGS e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Embora o número de pessoas a agradecer seja grande, vou tentar não me estender durante os agradecimentos para não fazer destes mais um capítulo desta tese.

Agradecimentos:

- **gerais**: para todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram, e também para aquelas que ao menos não atrapalharam, durante o desenvolvimento deste trabalho;
- **econômicos**: para CNPq pela bolsa de doutorado, para as agências que financiaram as pesquisas do laboratório de imunogenética nestes últimos quatro anos e para minha família e amigos pelos empréstimos de fim de mês;
- **de empréstimo de materiais**: ops são muitos... mas principalmente aos laboratórios de Drosophilas e "da Vegetal" do departamento de genética e ao laboratório dos professores Dr. Arnaldo Zaha, Dr. Henrique B. Ferreira do centro de biotecnologia da UFRGS.
- **espaciais**: para os professores e demais participantes do lab. de imunogenética por me permitir trabalhar no seu laboratório.
- **da orientação**: Nance e Zeca, tomara algum dia eu consiga lhes devolver a metade das coisas que vocês me deram. Se isto tivesse que se repetir pediria a quem for para que seja de volta com vocês;
- **por deixar eu me meter**: Imunopovo, Drosopovo, Mi (comadre) e Carlo André, mais do que agradecer peço-lhes desculpa se por tentar colaborar terminei atrapalhando vocês nos seus trabalhos;
- **aos meus "desorientados"**: Dani e Ivan, não tenho palavras para lhes agradecer por terem me aturado e por vir me ajudar nos trabalhos os fins de semanas, sem contar o trabalho após as 19:00 Hs. Eu não ganhei dois orientados e sim dois irmãos da vida;
- **das refeições**: ao pessoal da imuno e drosophila (também para os agregados) pelos momentos vividos no RU e pelo cafezinho pós-almoço no lab. de Drosophila;
- **amistosos**: A cada um dos integrantes do imunopovo e drosopovo, como também aos vizinhos da mutagênese pelas várias horas de diversão dentro ou fora da UFRGS;
- **pelo des-stress**: para o pessoal do futi da segunda (não estou me referindo ao Grêmio);
- **carinhosos**: para Ale, Mi, Milena, Mel, Flá, Lú, Mari, Norminha, Rê, Jaque, Cabeça, Nego, Leo, Maurício, Márcio, Ricardo e Fafá, obrigado pela amizade desinteressada.
- **às minhas famílias do Brasil**: para as famílias Sassi, Teixeira e Arnt por terem me aceitado que nem um filho (mesmo sendo argentino).

Ao Elmo e a Ellem por tudo que fizeram por mim e fazem pelo PPGBM.

Para terminar agradeço especialmente A minha família e amigos da Argentina pelo carinho e força no momento em que mais precisei; aos meus pais e irmão pelo amor (eu também amo vocês) e ajuda econômica (vocês não têm preço). Novamente aos meus orientadores e, por último, ao meu pequeno grande amor e metade da minha nova família (minha esposa Adri) por ter sido a grande responsável por ter terminado a tese em casa e não num hospício, eu te amo muito. Daqui a dois anos, eu espero te retribuir o tratamento diferencial que recebi enquanto escrevia a tese.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	10
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	13
1.1 – Leucemias	14
1.2 - Leucemia mielóide crônica	18
1.3 - Tratamento da LMC	26
1.4 - A linhagem celular K562	28
1.5 – Antraciclinas	29
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	34
CAPÍTULO 3 - 1º ARTIGO: Indução da síntese de hemoglobina em células k562 por doxorubicina e aclarrubicina: em busca de um mecanismo em comum	36
CAPÍTULO 4 - 2º ARTIGO: Induction of fetal haemoglobin expression in erythroid cells - a model based on iron availability signalling	68
CAPÍTULO 5 - 3º ARTIGO: optimization of an electroporation protocol using k562 cell line as a model: role of cell cycle phase and cytoplasmic dnases.....	81
CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO	99
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ACLA = Aclarrubicina;

DD-PCR = PCR da tecnica de *differential display*;

DNR = Daunorrubicina;

DOX = Doxorrubicina;

HbF = Hemoglobina fetal;

HU = Hidroxiuréia;

LLA = Leucemia linfóide aguda;

LLC = Leucemia linfóide crônica;

LMA = Leucemia mielóide aguda;

LMC = Leucemia mielóide crônica;

Ph = Cromossomo Philadelphia;

PCR = Reação em cadeia da DNA polimerase;

RT-PCR = PCR feito usando cDNA como fita molde.

As leucemias são neoplasias que afetam o sistema hematopoiético e compreendem 2,53% dos casos de câncer relatados. Entre as leucemias, 27,95% correspondem a casos de leucemia mielóide crônica (LMC), que apresenta como marcador genético o cromossomo Philadelphia (Ph). Presente em mais de 80% dos casos, o cromossomo Ph é derivado da translocação t(9;22) (q34;q11), que origina um gene híbrido entre a região 5' do gene *bcr* e 3' do gene *abl*. O produto deste gene é uma proteína Bcr-Abl na qual a atividade reguladora e nuclear do domínio tirosina quinase, originado da proteína Abl, torna-se constitutiva e citoplasmática. Estas mudanças na atividade tirosina quinase afetam diferentes vias de sinalização, com consequências em vários processos celulares como adesão, proliferação e apoptose. Em nível fisiológico, foi mostrado tanto *in vitro* quanto *in vivo* que as células hematopoiéticas precursoras Ph⁺ se diferenciam principalmente em células eritróides. Entretanto, quase 70% dos pacientes com LMC sofrem anemia, mostrando que, as células Ph⁺ diferenciadas em células eritróides não conseguem amadurecer até hemácias funcionais. Isto faz da LMC um bom modelo para o estudo da diferenciação de células eritróides e suas características, como os fatores que afetam a síntese de hemoglobina (Hb).

A linhagem K562 é uma linhagem celular eritroleucêmica Ph⁺, amplamente utilizada como modelo para estudar drogas com capacidade anti-proliferativa e/ou indutoras da síntese de hemoglobina fetal. Entre estas drogas encontram-se a aclarrubicina (ACLA) e doxorrubicina (DOX) que, embora sejam análogos químicos pertencentes à família das antraciclinas, possuem mecanismos de ação diferentes e ainda não completamente esclarecidos.

Neste trabalho, foram investigados vários aspectos da biologia das células K562 durante o tratamento com estas drogas. Foi observado que o tratamento com DOX produz um aumento de tamanho nas células e bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M, afetando também grandemente a viabilidade celular, com 70% de células mortas no sétimo dia de tratamento. Já durante o tratamento com ACLA a viabilidade, tamanho e ciclo celular foram menos afetados, com aproximadamente 15% de células mortas no sétimo dia de tratamento e um bloqueio transitório do ciclo na fase G₁. No entanto, as duas drogas causaram um aumento significativo da síntese de hemoglobina, principalmente DOX que induziu um aumento quase duas vezes maior que o induzido por ACLA.

A análise da expressão gênica realizada através da técnica de *differential display* mostrou várias bandas diferencialmente representadas e com diversas cinéticas de

expressão, apresentando semelhanças e diferenças quando são comparados os dois tratamentos ou células tratadas e controle. Destas bandas, 26 estão sequenciadas mostrando genes envolvidos em vários processos celulares como dano do DNA, resistência a drogas, processamento do RNA e codificação de proteínas relacionadas com ferro. Das bandas sequenciadas, 7 foram validadas por RT-PCR (*ndrg1*, *erk2*, *nf2l2*, *atp6ap1*, *rfc1*, *phf20* e *zkscan*) sendo observado um aumento na sua expressão durante o tratamento, com exceção de *ndrg1* para o qual a expressão foi induzida em vez de aumentada e *nf2l2* onde a diferença com o controle foi pequena e não permitiu validar este gene como diferencialmente expresso.

Com o objetivo de procurar por mecanismos comuns entre os vários indutores da síntese de hemoglobina em células K562, estes genes foram também analisados durante o tratamento destas células com os indutores hidroxiuréia e dGTP. Além de induzirem a expressão de hemoglobina, os dois tratamentos provocaram um aumento no tamanho das células tratadas e um bloqueio no ciclo celular na fase S.

Visando futuros trabalhos envolvendo os genes diferencialmente expressos, foi ainda otimizado um sistema de transferência gênica por eletroporação. Para isto foram testados varios parâmetros como campo elétrico, resistência, capacitância, meios de eletroporação, manipulação das células e uso de inibidores de DNAses. Como resultado, foi alcançado com o eletroporador padrão uma eficiência de transfecção de 81%, similar àquela alcançada pelo *nucleoporator* (eletroporador de última geração). As condições estabelecidas foram 750 V/cm, resistência infinita, 500 μ F, meio RPMI1640, centrifugação e sulfato de zinco pós-pulso.

A relação das antraciclina e a hidroxiuréia, assim como de outros indutores da síntese de hemoglobina, com o ferro intracelular, juntamente com a diferença na expressão, durante o tratamento, de genes afetados direta ou potencialmente pela não disponibilidade de ferro intracelular, nos permitiu gerar uma hipótese para a via de sinalização que leva à síntese de hemoglobina. Nesta, sinais de falta ou não disponibilidade de ferro nas células ativariam a maquinaria celular para a captação e internalização do ferro extra-celular, simultaneamente com síntese de proteínas que utilizam o ferro para realizar as suas funções biológicas, entre elas a hemoglobina. Do mesmo modo, propomos a via de sinalização do ferro como um alvo potencialmente afetado por drogas indutoras da síntese de hemoglobina, como as antraciclina, cujos alvos são ainda pouco conhecidos. Contudo,

mais genes desta via de sinalização, bem como outros indutores, deveram ser estudados para saber se a síntese de hemoglobina pode ser induzida por drogas mais específicas e com menos efeitos colaterais que aquelas usadas atualmente para o tratamento de câncer e outras doenças.

Leukemias are neoplasias that affect the hematopoietic system and comprehend 2.53% of the known cancer cases. Among them, 27.95% correspond to chronic myeloid leukemias (CML), which present the genetic marker Philadelphia (Ph) chromosome. This chromosome, occurring in over 80% of the cases, derives from the translocation t(9;22)(q34;q11), which originates a hybrid gene comprehend the 5' region of *bcr* gene and 3' of the *abl* gene. This gene codes for the Bcr-Abl protein, in which the regulator and nuclear activity of the tyrosine kinase dominium, originated from Abl, becomes constitutive and cytoplasmatic. The change in the tyrosine kinase activity affect different cell pathways, with consequences in many cell processes such as adhesion, proliferation and apoptosis. In a physiological level, Ph⁺ hematopoietic precursor cells were shown to differentiate mainly into erythroid cells, *in vitro* as well as *in vivo*. Almost 70% of CML patients, however, are known to present anemia, showing that these erythroid cells are not able to differentiate into functional, mature erythrocytes. CML constitutes thus an interesting model for the study of erythroid differentiation and factors affecting hemoglobin synthesis.

The K562 cell line is an erythroleukemic, Ph⁺ cell line largely employed as a model for the investigation of drugs with anti-proliferative potential and/or capable of inducing the synthesis of fetal hemoglobin. Two of these drug, aclarubicin (ACLA) and doxorubicin (DOX), belong to the anthracyclin family and, although being chemical analogs, present different mechanisms on the target cells.

In this work, several aspects of the biology of K562 cells were investigated during the treatment with those drugs. Treatment with DOX was shown to induce an increase in cell size a block to cell cycle in the phase G₂/M, affecting also cell viability with 70% of mortality on the seventh day of treatment. For ACLA, viability, cell size and cycle were less affected, with around 15% dead cells on day 7 and a transient arrest of cell cycle in G₁. Both drugs, however, induced a significant increase in hemoglobin synthesis, particularly DOX for which the effect was twice that shown by ACLA.

Gene expression was analyzed by differential display, showing many bands differentially expressed and with several expression kinetics, when cells submitted to the two treatments were compared among themselves or with control cells. Twenty-six of the bands are sequenced, showing genes involved in several cell processes such as DNA damage, drug resistance, RNA processing and coding of proteins related to iron. Among

the sequenced bands, 7 were validated by RT-PCR (*ndrg1*, *erk2*, *nf2l2*, *atp6ap1*, *rfc1*, *phf20* e *zkscan*) and showed increased expression during treatment, except for *ndrg1* for which expression was induced instead of increased, and *nf2l2*, for which the difference with control samples was small and did not allow the validation as a gene with differential expression.

In the search for common mechanisms for the several hemoglobin inducers in K562 cells, these genes were also analyzed during the treatment of the cells with two other inducers, hydroxyurea and dGTP. Both were able to induce hemoglobin expression, causing also an increase in cell size and blocking the cell cycle in the S phase.

A gene transfer system based on electroporation was also optimized during this work, for the future study of the differentially expressed genes. Several parameters, such as electric field, resistance, capacitance, electroporation media, cell manipulation and the use of DNase inhibitors were analyzed. As a result, a transfection efficiency of 81% was reached with the standard electroporator, similar to that of the nucleoporator (last generation electroporator). The established conditions included 750 V/cm, infinite resistance, 500 μ F, RPMI1640 medium, centrifugation and the use of zinc sulphate post-pulse.

The relationship between anthracyclins and hydroxyurea, as well as other inducers of hemoglobin synthesis, with intracellular iron, as well as the differences in expression of genes directly or potentially affect by the non availability of intracellular iron, allowed the establishment of a hypothesis for the pathways signalling hemoglobin synthesis. Signs of lack or non availability of iron in the cell would activate the cell machinery for the intake of extracellular iron, along with the synthesis of proteins - hemoglobin among them - using iron for their cell function. We also propose the iron signalling pathway as a target potentially affected by drugs which are inhibitors of hemoglobin synthesis, such as anthracyclins, whose targets are still poorly known. Other genes belonging to this signalling pathway, as well as other inducers, however, must be investigated for the finding whether hemoglobin synthesis can be induced by drugs more specific and with less side effects than those presently used for the treatment of cancer and other diseases.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

As células sanguíneas realizam uma variedade de funções essenciais para a sobrevivência do organismo. No entanto, estas células e os tecidos de onde se originam exibem certas características que as tornam completamente diferentes das de outros órgãos vitais, como a expectativa de vida relativamente curta das células maduras, a multiplicidade de tipos celulares e a grande dispersão destas populações no corpo. Em um indivíduo normal, os níveis das células maduras no sangue são mantidos dentro de limites estritos e, em resposta a emergências como perda sanguínea ou infecções, os tecidos hematopoiéticos são capazes de responder rapidamente aumentando a produção celular (Metcalf, 1988). Em adultos o número de novas células sanguíneas que os tecidos hematopoiéticos devem produzir está estimado em torno de 1 trilhão/dia (Ogawa, 1993). Essas considerações indicam que a regulação da hematopoiese requer a existência de um sistema de controle extremamente complexo.

A hematopoiese está continuamente acontecendo para suprir a necessidade constante de reposição e renovação das células mielóides e linfóides. Entretanto, o organismo pode perder a capacidade de manutenção deste processo contínuo e homeostático, e desencadear um processo leucemogênico. Esse processo se caracteriza por uma proliferação neoplásica do sistema hematopoiético, que resulta em um aumento exagerado de leucócitos em estágios precoces de maturação, os quais podem alcançar a circulação periférica e levar à anemia, trombocitopenia e, na ausência de um tratamento eficaz, à morte.

1.1 - Leucemias

A leucemia é uma neoplasia do tecido hematopoiético originário da medula óssea. A leucemia geralmente envolve o sangue periférico e frequentemente infiltra o baço, o fígado e os nódulos linfáticos. De acordo com o grau de maturidade e a linhagem das células afetadas, a leucemia pode ser classificada em:

Leucemia aguda - caracteriza-se pela proliferação de células imaturas (ou blastos) na medula óssea, sangue periférico e outros órgãos. Se não for tratada, a morte ocorre em um período de aproximadamente 6 meses após o diagnóstico, na maioria dos pacientes.

Leucemia crônica – caracteriza-se pela proliferação de células aparentemente maduras, na medula, sangue periférico e em vários órgãos. A doença tem curso lento, quando comparado com o curso da leucemia aguda, com um intervalo de 2-6 anos entre o

diagnóstico e o surgimento da fase acelerada, dependendo do subtipo de célula proliferativa.

As leucemias podem ainda ser classificadas, segundo a linhagem celular envolvida, em duas categorias: mielóide e linfóide. Assim, temos leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia mielóide crônica (LMC), leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia linfóide crônica (LLC).

Uma das principais metas na investigação do câncer e, portanto, das leucemias, é a identificação dos genes responsáveis por sua origem e progressão. O rápido desenvolvimento das técnicas de seqüenciamento e análise do DNA foi de grande valor para a realização desta meta (a qual ainda não foi inteiramente alcançada). Nas translocações, por exemplo, os pontos de quebra cromossômica podem ser clonados e seqüenciados eficientemente e genes relevantes podem ser rapidamente identificados. As técnicas moleculares muitas vezes permitem diagnosticar translocações conhecidas que se encontram abaixo do nível de resolução da microscopia óptica. Em vários casos, a informação da seqüência apenas define as funções potenciais destes genes como, por exemplo, codificar fatores de transcrição ou proteínas com função tirosino-quinase. Em outras situações, os genes não são conhecidos e os mecanismos leucemogênicos não são imediatamente aparentes. Em ambos os casos, o maior desafio é usar as informações genéticas para a compreensão do fundamento biológico das leucemias e encontrar a chave para uma intervenção terapêutica racional (Sawyers, 1997).

Os genes relacionados com a patogênese do câncer atuam através de dois mecanismos gerais principais (Cline, 1994). O primeiro envolve a alteração estrutural de um gene normal (proto-oncogene), que pode acontecer através de diferentes mecanismos, tais como amplificação, mutação pontual, translocação ou inversão (Sánchez-García, 1997). Esse novo gene alterado (oncogene) produz uma proteína que atua na célula induzindo características malignas. Geralmente esta proteína está envolvida na proliferação, diferenciação ou sobrevivência celular (Cline, 1994). O segundo mecanismo envolve a perda ou inativação de genes que codificam proteínas supressoras de tumores (supressores tumorais).

Determinados defeitos genéticos herdados estão associados à predisposição familiar ao câncer. Entretanto, os resultados obtidos em uma grande quantidade de trabalhos indicam que a maioria dos defeitos genéticos que envolvem leucemias é adquirida, ao

invés de herdada, apesar de pouco se conhecer a respeito dos fatores ambientais que induzem estes defeitos. A ocorrência de leucemias em crianças sugere que estas mudanças possam ser herdadas ou adquiridas *in utero*, mas, com poucas exceções, a origem destas alterações ainda deve ser identificada (Ford *et al.*, 1993).

Alguns genes encontram-se alterados em uma ampla variedade de cânceres, enquanto outros estão restritos a tecidos específicos e determinados tipos de câncer. Os genes que são potencialmente leucemogênicos em células hematopoiéticas podem ser agrupados em 5 famílias (revisado por Cline, 1994):

a) genes envolvidos com a transdução de sinais ativadores da proliferação. Exemplos destes genes são o gene *ras*, cuja mutação pode ser encontrada em 15-20% das LMA e 14% das LLA, e o gene *c-abl*, cuja translocação com o gene *bcr* é encontrada em >95% das LMC e em 5-20% das LLA;

b) genes ativadores da transcrição. As proteínas produzidas por estes genes reconhecem seqüências específicas no DNA e estimulam a síntese de mRNA. Estes genes podem ser subdivididos segundo o mecanismo utilizado pela proteína para o reconhecimento das seqüências (*helix-loop-helix*, *zinc finger*, etc.). Exemplos destes genes são: *c-myc* e *mlo2*.

c) genes envolvidos na diferenciação celular. Alguns destes genes possuem domínios chamados *homeobox* além de apresentarem similaridade a genes que atuam no desenvolvimento em organismos primitivos. Outros são membros de superfamílias de receptores de hormônios. A maioria destes genes, senão sua totalidade, tem influência sobre a transcrição de outros genes. Entre os genes envolvidos na diferenciação celular podem ser citados o *hox11*, cuja translocação com genes *tcg* é encontrada em 7% das LLA-T, e o *mll*, que se encontra translocado com mais de 20 diferentes genes, estando rearranjado em 5% das LMA e 10% das LLA e em 80% das leucemias infantis;

d) genes envolvidos na morte celular programada (apoptose). Muitas células, como os granulócitos, mostram ativação de genes específicos de diferenciação que programam sua morte após um breve período de vida. Uma mutação nestes genes pode provocar a perda do controle da morte celular, levando a uma excessiva proliferação destas células. Por exemplo, cerca de 5% das LLC apresentam o gene *bcl* ativado, por translocação com um gene de imunoglobulina;

e) genes supressores de tumor. Os três supressores tumorais com potencial leucemogênico atualmente conhecidos são o *p53* que se encontra mutado em 3-7% das LMA (Fenaux *et al.*, 1991), 2% das pré-LLA-B, <2% das LLA e 15% das LLC; o gene *rb1* cuja alteração pode ser encontrada em 20% das LLA-T e pre-LLA-B, 25% das LMMA, <3% das LMA e mais de 30% das LLA Ph¹-positivas; e o gene *w1* cuja perda é detectada em 20% das LMA.

As translocações cromossômicas são a causa mais comum de leucemias em humanos. Nesta anormalidade, o ponto de quebra nos cromossomos pode separar genes em duas partes e, durante o processo de reparo, produzir a justaposição de porções de genes diferentes. Em consequência, pode ocorrer ativação ou fusão gênica. A ativação gênica é produzida quando um proto-oncogene, que normalmente não seria expresso em um tipo celular, é introduzido no mesmo contexto cromossômico de um gene muito expresso nesta célula. Quando um gene não expresso em células linfóides, por exemplo, é introduzido no mesmo contexto cromossômico de um gene de imunoglobulina (Ig) ou de receptor de células T (TCR), passa a ser expresso sob o mesmo padrão deste. O fato de um gene de Ig ou TCR estar freqüentemente envolvido em translocações sugere que a enzima recombinase, que normalmente medeia a recombinação V(D)J, possa estar envolvida na criação do rearranjo cromossômico que produz a leucemia (Tsujimoto *et al.*, 1985). Estudos como os realizados em leucemias linfóides envolvendo as translocações t(8;14) (q24;q11) (Shima *et al.*, 1986), t(7;9) (q34;q34) (Ellisen *et al.*, 1991), t(1;14) (p32;q11) (Rabbitts, 1994), além de outros, têm sido particularmente informativos sobre o possível envolvimento da recombinase nestas anormalidades cromossômicas.

Outra consequência comum das translocações cromossômicas em leucemias, a fusão gênica, resulta em um transcrito quimérico que codifica proteínas híbridas. Como o ponto de quebra no gene é geralmente dentro de um íntron, as seqüências codificantes de cada gene envolvido devem ser mantidas sob a mesma fase de leitura.

Quando se produzem proteínas quiméricas, nem todos os domínios dos genes envolvidos têm a mesma importância na leucemogênese. Por exemplo, trabalhos realizados em translocações E2A-PBX e E2A-HLF (Monica *et al.*, 1994) mostraram que o domínio de ativação N-terminal de E2A é essencial, enquanto que o homeodomínio é dispensável. Estes dados mostram que o *partner* que se liga ao DNA é dispensável no que se refere à alteração na capacidade de proliferação, mas necessário para o bloqueio da diferenciação.

Isto implica que porções distintas do híbrido podem ser necessárias na interação com as proteínas celulares que assistem ou medeiam alterações em genes que controlam a proliferação e diferenciação celular. Os dados sugerem que as funções transcricionais de proteínas quiméricas requerem a interação com proteínas heterólogas. Estas interações podem direcionar as proteínas quiméricas para genes-alvo apropriados ou, alternativamente, formar complexos que seqüestram fatores supressores de tumor. Um claro entendimento dos mecanismos de ação de genes associados ao câncer pode ajudar a elucidar o controle regulatório comum que coordena a proliferação e a diferenciação celular, onde o desbalanço das proteínas associadas a translocações promove um acúmulo de células proliferativas imaturas ou cancerosas.

1.2 - Leucemia mielóide crônica

A leucemia mielóide crônica é uma desordem clonal de células tronco hematopoiéticas que resulta em um incremento de células mielóides no sangue periférico e na medula óssea. A idade média dos indivíduos afetados é de aproximadamente 53 anos, mas todos os grupos etários podem ser atingidos pela doença. A maioria dos pacientes apresenta também trombocitose, consistente com a presença de um defeito em uma célula tronco hematopoiética pluripotente. Os sintomas típicos da doença são fadiga, anorexia e perda de peso, mas aproximadamente 40% dos pacientes são assintomáticos e neles o diagnóstico é baseado somente na contagem anormal de células (Tabela 1). A anormalidade mais comum no exame físico é a esplenomegalia, presente em mais da metade dos pacientes. A história natural da LMC inclui a progressão de uma fase crônica benigna até uma fase acelerada. Em contraste à maturação celular durante a fase crônica, na crise blástica as células falham em sua maturação e se assemelham aos mieloblastos ou linfoblastos encontrados em pacientes com leucemia aguda (revisado em Sawyers, 1999).

Tabela 1 - Características dos pacientes com leucemia mielóide crônica no diagnóstico (Sawyers, 1999).

Características clínicas *
Fatiga, anorexia, perda de peso
Esplenomegalia
Hepatomegalia
Características do sangue periférico
Número elevado de leucócitos (geralmente $>25000/\text{mm}^3$)
Número elevado de plaquetas em 30-50% dos casos
Basofilia
Atividade reduzida da fosfatase alcalina leucocitária
Todas as etapas de diferenciação dos granulócitos são visíveis
Características da medula óssea
Hiperplasia, conteúdo de gordura reduzido
Aumento da relação de células mielóides/células eritróides
Incremento no número de megacariócitos
Blastos e promielócitos constituem menos de 10% do total de células

* Aproximadamente 40% dos pacientes são assintomáticos

Translocação BCR-ABL

O diagnóstico de LMC está baseado principalmente na detecção do cromossomo Philadelphia (Ph). Essa anormalidade, descrita pela primeira vez como um cromossomo 22 mais curto (Nowell e Hungerford, 1960) e depois identificada como uma translocação t(9;22) (Rowley, 1973), está presente em 90-95% dos pacientes. Em 5-10% dos pacientes podem ser observadas outras variações do cromossomo Ph, com cariótipo normal (Ganesan *et al.*, 1986) ou translocações complexas onde, geralmente, um terceiro cromossomo diferente do 9 e do 22 está envolvido. Usualmente, o segmento do terceiro cromossomo está translocado à banda 9q34 a qual já se encontra translocada com 22q11 (Heim *et al.*, 1985).

No plano molecular, a translocação que resulta no cromossomo Ph envolve o movimento da maior parte do proto-oncogene *c-abl* do cromossomo 9 para a extremidade 3' da parte restante do gene *bcr* no cromossomo 22, resultando em um gene híbrido *bcr-abl*, que é expresso (Groffen *et al.*, 1984; Shtivelman *et al.*, 1985).

O gene *c-abl* é o homólogo humano do gene transformante do vírus da leucemia murina Abelson, *v-abl* (Heisterkamp *et al.*, 1985). Este gene estende-se por uma distância de 300 kb e está localizado perto da extremidade do braço longo do cromossomo 9, orientado com sua extremidade 5' dirigida para o centrômero (Shtivelman *et al.*, 1986).

Possui dois possíveis éxons 1 (chamados 1a e 1b) localizados a 15 kb e a mais de 100 kb da extremidade 5' do éxon 2, respectivamente (Figura 1). Existem evidências de que, quando a transcrição começa no éxon 1b, o éxon 1a é retirado e o éxon 1b é fusionado ao éxon 2 durante o processamento do RNA, de tal forma que existem dois possíveis mRNAs. Estes dois mRNAs, de 6 e 7 kb, são traduzidos em proteínas que diferem por 19 aminoácidos na extremidade aminoterminal e que migram como uma banda de 145 kD em géis de poliacrilamida (Shtivelman *et al.*, 1986; Zeleznik-Le *et al.*, 1995). A proteína Abl apresenta atividade tirosino-quinase e pertence a uma família de proto-oncogenes da qual Scr é o protótipo. Esta proteína é expressa em baixos níveis em uma ampla variedade de tecidos, sendo fortemente expressa no baço, timo e testículos, com exceção das células reprodutivas haplóides, e localiza-se no núcleo, podendo também ser encontrada no citoplasma quando expressa em quantidades maiores (Van Etten *et al.*, 1989).

Análises da seqüência dos cDNAs do gene *c-abl* humano, de camundongo, de *Drosophila* e de nematódeos indicam que a proteína apresenta domínios estruturais altamente conservados. Estes domínios incluem a presença de sítios de miristilação na extremidade aminoterminal, domínios com homologia a Src, SH2 e SH3, um domínio com atividade de tirosino-quinase (SH1), um domínio de ligação a DNA, sinais de localização nuclear e um domínio de ligação à actina (revisado por Chung e Wong, 1995). Os resultados de testes bioquímicos, biológicos e genéticos sugerem que estes domínios atuam na regulação do ciclo celular, transcrição, diferenciação celular e desenvolvimento (Chung e Wong, 1995). Outros resultados indicam que a c-Abl nuclear inibe a proliferação celular, interagindo com elementos centrais do aparato de controle do ciclo celular como os genes supressores de tumor Rb e p53 (Wen *et al.*, 1996)

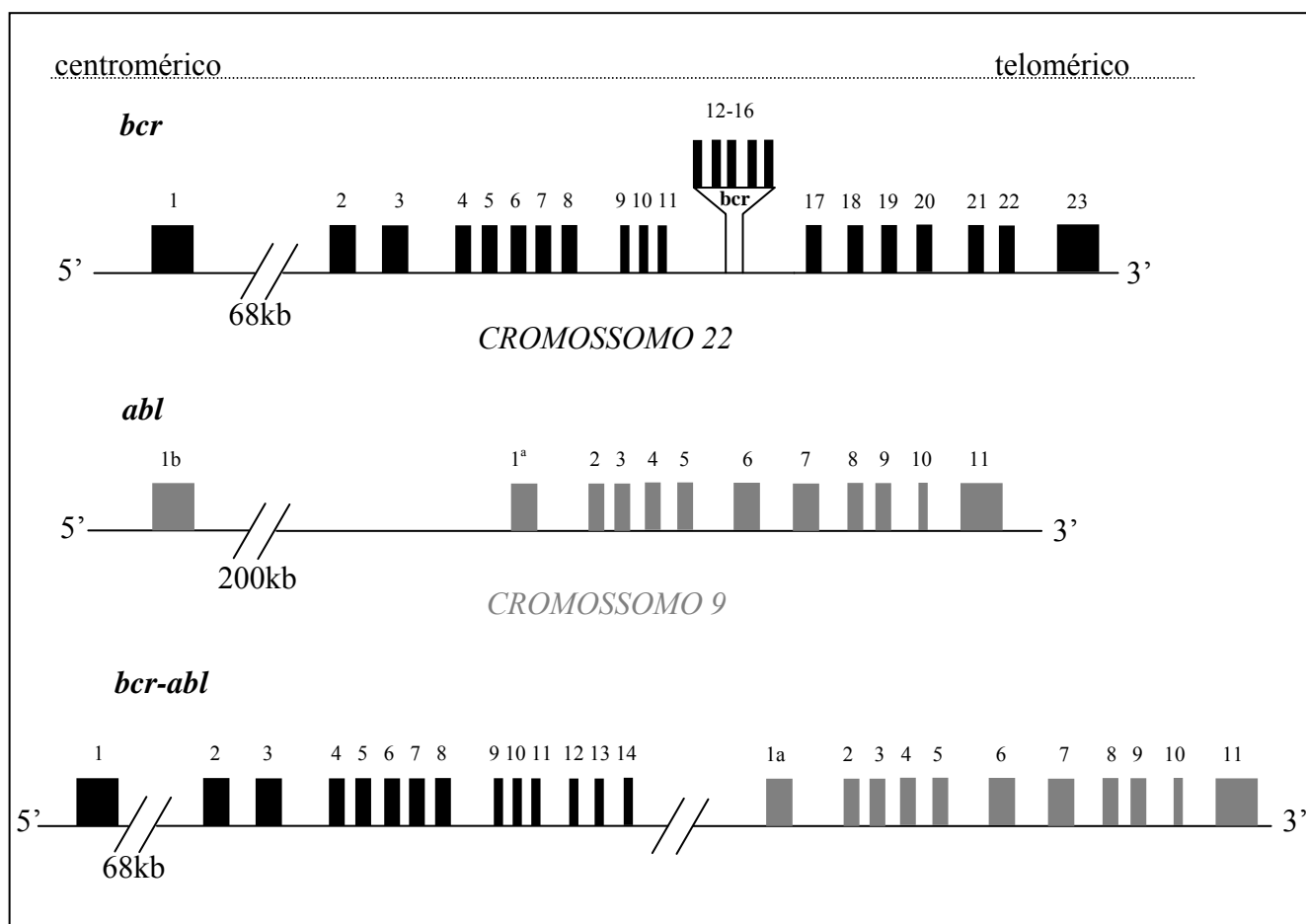


Figura 1 - Representação esquemática dos genes *c-abl*, *bcr* e *bcr-abl*. Os éxons são mostrados como retângulos claros para o ABL e escuros para o BCR (Zeleznik-Le *et al.*, 1995).

O gene *bcr* no cromossomo 22 foi assim denominado devido à observação inicial que os pontos de quebra no cromossomo 22 se agrupavam em um segmento relativamente pequeno de 5,8 kb, o qual foi chamado de região de agrupamento de pontos de quebra (*breakpoint cluster region*, *bcr*). Este gene é também grande, compreendendo aproximadamente 130 kb (Figura 2). Ele é expresso de forma relativamente constante em uma ampla variedade de tecidos e tipos celulares (Collins *et al.*, 1987). O gene *bcr* produz dois tipos de mRNA, de 4,5 e 6 kb, que não parecem diferir funcionalmente (Heisterkamp *et al.*, 1985; Hariharan e Adams, 1987).

Análises sorológicas e estudos de expressão direta têm demonstrado que o produto do *bcr* é uma proteína de 160 kD, a p160^{Bcr}. Esta proteína apresenta atividade de

auto-transfosforilação para vários substratos protéicos *in vitro* (Maru e Witte, 1991). O domínio associado com atividade serina/treonina quinase é codificado por um único éxon, o éxon 1 do *bcr*, onde também é encontrada uma região de ligação com domínio SH2, envolvida na regulação de quinases e que apresenta capacidade de interagir com o domínio SH2 do *Abl* (Pendergast *et al.*, 1991). A porção central do *bcr* apresenta um domínio similar ao oncogene *dbl* que codifica um fator de troca GDP-GTP para o polipeptídeo similar ao Ras CDC42Hs (Hart *et al.*, 1991; Boguski e McCormick, 1993). A extremidade carboxila codificada pelo *bcr* apresenta atividade GTPase ativadora (GAP) para a proteína Rac relacionada a Ras e que é expressa em grandes quantidades nas células mielóides (Diekmann *et al.*, 1991).

A fusão do *bcr* ao *c-abl* converte a proteína Abl de uma tirosina quinase de baixa atividade nuclear em uma tirosina quinase citoplasmática com atividade muito aumentada e com capacidade de ligação a actina (McWhiter e Wang, 1993; Sawyers *et al.*, 1994). Dependendo do sítio onde ocorre o ponto de quebra no gene *bcr*, a proteína de fusão pode variar em tamanho, de 190 kD a 230 kD. Cada gene quimérico codifica a mesma porção do domínio tirosina quinase de ABL, mas difere no tamanho da seqüência de BCR retida no extremo aminoterminal (Figura 2). A maioria dos pacientes com LMC em fase crônica típica expressa uma proteína Bcr-Abl de 210 kD, enquanto que os pacientes com LLA Ph⁺ podem expressar tanto a proteína Bcr-Abl de 210 kD como a proteína de 190 kD. A proteína quimérica de 230 kD foi encontrada em um grupo de pacientes com LMC que apresentava um número de leucócitos menor que aquele característico da doença e nos quais a progressão da crise blástica era lenta (Pane *et al.*, 1996). A possível relação entre a proteína de fusão e diagnósticos diferentes levou vários laboratórios a estudar sua atividade biológica relativa. Os resultados indicaram que a proteína BCR-ABL de 190 kD tem maior atividade tirosina quinase e maior potencial oncogênico que a proteína de 210 kD, sugerindo que a magnitude do sinal tirosina quinase afeta a expressão da doença (Lugo *et al.*, 1990; Voncken *et al.*, 1995).

O gene *bcr* cujo éxon b3 tenha sido excluído é transcrito em um RNA onde o éxon b2 é justaposto ao éxon 2 (a2) do ABL durante o processamento (mRNA b2a2), enquanto o gene que não excluiu o éxon b3 produz um mRNA onde b3 é justaposto ao a2 do ABL (mRNA b3a2) e que, por mecanismo alternativo de processamento, pode gerar um mRNA b2a2 (Morgan *et al.*, 1990; Nakamura *et al.*, 1991; Mills *et al.*, 1991) (Figura 2).

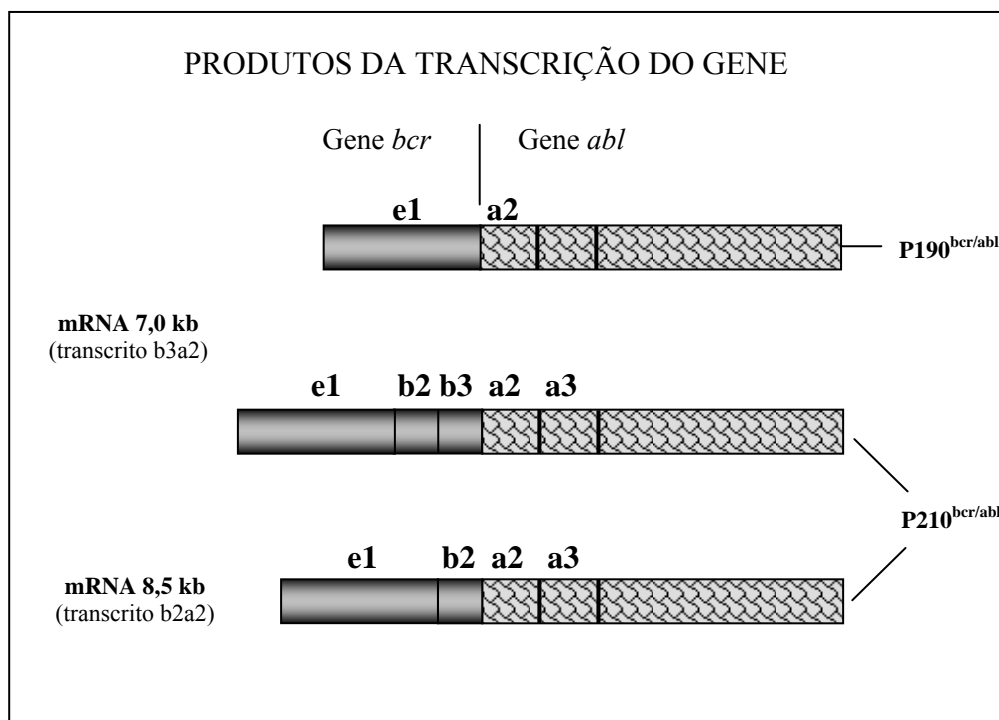


Figura 2 - Representação esquemática dos possíveis transcritos gerados por processamento alternativo do mRNA BCR-ABL (adaptado de Mills *et al.*, 1991).

Estudos demonstraram que, dependendo da localização dos pontos de quebra na região denominada *major bcr* (M-bcr), duas espécies distintas de mRNAs ser gerados a partir do gene *bcr-abl*, as quais diferem pela presença ou ausência do éxon b3 (Nakamura *et al.*, 1991; Mills *et al.*, 1991). Os dois tipos de mRNA e as proteínas p210 por eles codificadas diferem em tamanho por 75 bases e 25 aminoácidos, respectivamente. Não se sabe exatamente se esta diferença tem influência nas propriedades do produto protéico híbrido resultante ou no fenótipo da doença, apesar de vários estudos indicarem que ela não interfere nestas características.

A proteína de 190 kD é o produto protéico resultante da tradução do mRNA onde o primeiro éxon e1 do gene *bcr* é unido ao éxon a2 do *c-abl*. O gene híbrido *bcr-abl*, formado neste caso, resulta de um ponto de quebra na região denominada *minor bcr* (m-bcr) (Figura 2) e na mesma região no *c-abl* que a envolvida na p210. Tanto a região de ponto de quebra como o produto gênico são característicos das LLA Ph positivas, M-bcr negativas (LLA Ph⁺, M-bcr⁻). A p190^{Bcr-Abl} apresenta a atividade tirosina quinase

grandemente aumentada em relação à p210^{Bcr-Abl}, o que está correlacionado com seu maior poder transformante e sua associação com formas de leucemias agudas em vez de crônicas (Lugo *et al.*, 1990; Kelliher *et al.*, 1991).

Na LMC, a co-expressão é observada em amostras tanto da fase crônica como da fase aguda e também em uma grande proporção de indivíduos que recebem intrfron- α (IFN- α) (Van Rhee *et al.*, 1996).

Como anteriormente citado, os oncogenes interferem em várias vias de sinalização celular que levam a uma desregulação da proliferação e/ou proliferação celular. O conhecimento das vias afetadas por estes oncogenes é de vital importância tanto para a compreensão dos processos leucemogênicos quanto para o direcionamento de drogas contra os mesmos, com a finalidade de tratar especificamente a doença.

No caso da translocação BCR-ABL várias anomalias acontecem:

-Adesão celular alterada

Como revisado por Verfaillie *et al.* (1997), a adesão de células progenitoras hematopoiéticas a células secretoras de citocinas, como as células estromais, regula o destino que estas células hematopoiéticas terão. Assim, dependendo do sinal recebido através das citocinas, as células progenitoras hematopoiéticas podem sofrer apoptose ou proliferar, e a proliferação pode gerar novas células progenitoras (auto renovação) ou gerar células diferenciadas (diferenciação).

Em células leucêmicas com translocação *bcr-abl* esta adesão a células estromais está grandemente reduzida e, desta forma, estas perdem a capacidade de regulação da proliferação e, ao mesmo tempo, passam a circular no sangue periférico. Entre as moléculas envolvidas na adesão afetadas neste processo encontram-se as β integrinas (Verfaillie *et al.*, 1997) Mip-1 α (Durig *et al.*, 1999) e CrkL (Uemura *et al.*, 1999), entre outras.

-Ativação de vias de sinalização mitogênica

A taxa de proliferação aumentada é uma característica geral das neoplasias. Em células leucêmicas com translocação *bcr-abl* diversas vias de sinalização mitogênica estão afetadas:

a- Via de sinalização Ras e MAPKs

A proteína híbrida Bcr-Abl tem a capacidade de autofosforilar a tirosina 177. Quando a fosforilação ocorre é criado um sítio de ligação para a proteína adaptadora Grb-2, que depois se associa com a proteína Sos, a qual estimula a troca do GDP ligado à proteína Ras inativa por GTP, ativando assim a proteína Ras (Puil *et al.*, 1994). Esta então ativará a via das proteínas com atividade quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) através da ativação da proteína serina/treonina quinase Raf-1 (Marais *et al.*, 1995). A mesma via de sinalização também pode ser ativada pela associação entre Grb-2 e Gab2, que também pode ativar a via de sinalização fosfatidilinositol 3 (PI3) quinase/akt (Sattler *et al.*, 2002). Neste mesmo trabalho, células mielóides Gab2^{-/-} mostraram-se resistentes à transformação *in vitro* com Bcr-Abl. Estes resultados podem ser relacionados com os dados que mostram que mutação na tirosina 177 de Bcr-Abl impede a indução de leucemia mielóide em um modelo murino (He *et al.*, 2002). Embora a ativação da via de sinalização Ras-Raf-Mek-Erk em células hematopoiéticas pareça uma consequência direta da atividade de Bcr-Abl, alguns membros da família MAPK parecem ser inativados por ela ou mesmo não ser afetados. Kabarowski *et al.* (1994), por exemplo, observaram que a proteína Erk2 não era ativada por Bcr-Abl. Por outro lado, foi mostrado que a via de sinalização de p38 MAPK é ativada através do tratamento de linhagem celular ou cultura primária com interferon- α , sugerindo que a proteína Bcr-Abl regula negativamente esta via e que a sua ativação pode ser responsável pelo efeito antiproliferativo do interferon- α (Mayer *et al.*, 2001).

b- Via de sinalização do PI3 quinase

A ativação da PI3 quinase parece ser essencial para a proliferação das células Ph⁺. Esta ativação acontece provavelmente porque Bcr-Abl forma um complexo com PI3 quinase, p120^{Cbl}, e as proteínas adaptadoras Crk e CrkL (Sattler *et al.*, 1996). A PI3 quinase ativada estimula a Akt que ativa a degradação mediada por proteassoma, do inibidor do ciclo celular p27^{Kip1} através da fosforilação do fator de transcrição FKHRL1 o que resulta em uma entrada mais rápida da célula na fase S (Jonuleit *et al.*, 2000).

c- via de Myc

Myc é capaz de transformar sinais mitogênicos em sinais que alteram o padrão de expressão gênica. Entre os alvos de Myc encontram-se tanto genes relacionados ao ciclo

celular quanto a apoptose (Menssen e Hermeking 2002). Na ativação de Myc participam os domínios SH2 e a região C-terminal de Bcr-Abl (Afar *et al.*, 1994; Okuda *et al.*, 1998). Foi mostrado por Xie *et al.* (2001) que a proteína Jak2 está envolvida também neste processo, aparentemente induzindo a transcrição de Myc e estabilizando esta proteína.

Inibição de sinais apoptóticos

Através do estudo de linhagens celulares transfectadas com Bcr-Abl, submetidas a diferentes agentes indutores de apoptose, foi demonstrado que a proteína Bcr-Abl fornece resistência aumentada aos processos apoptóticos (Bedi *et al.*, 1994 e 1995). Entretanto, estes estudos parecem estar longe da situação fisiológica devido à super-expressão da proteína híbrida, e quando foram estudadas células progenitoras de LMC os dados se mostraram controversos. Bedi *et al.* (1994) mostraram que os progenitores Ph⁺ eram mais resistentes à apoptose que os progenitores normais quando a apoptose era induzida por ausência de fatores de crescimento, enquanto Amos *et al.* (1995) não encontraram diferenças quanto à resistência à apoptose sob as mesmas condições.

Vários processos parecem estar envolvidos nesta possível vantagem anti-apoptótica oferecida por Bcr-Abl, entre eles: o bloqueio da liberação do citocromo C da mitocôndria, o qual é um pré-requisito para a ativação da caspase-3 (Amarante-Mendes *et al.*, 1998) e o aumento na expressão de Bcl-2 que interage com Raf-1 para inativar a proteína pró-apoptótica Bad por meio da fosforilação de resíduos serina (Sanchez-Garcia e Martin-Zanca, 1997). Um mecanismo interessante através do qual as células Bcr-Abl adquiririam resistência à apoptose foi proposto por Vigneri e Wang (2001), que mostraram que a proteína Bcr-Abl pode induzir apoptose quando confinada ao núcleo. Estes dados ilustram a importância não apenas da presença da proteína Bcr-Abl na célula mas também de sua localização citoplasmática.

1.3 - Tratamento da LMC

Terapia molecular

No final dos anos 80, o acúmulo de dados sobre o mecanismo molecular da proteína híbrida Bcr-Abl estimulou o desenvolvimento de terapias moleculares dirigidas para o tratamento das leucemias que apresentam esta translocação. O principal alvo desta terapia foi o domínio tirosino quinase e, com a finalidade de inibir este domínio, foram

desenvolvidos vários análogos de ATP não hidrolizáveis. Estes análogos têm a capacidade de se ligar ao domínio quinase mas, considerando que não podem ser hidrolizados, não serão utilizados como fornecedores de fosfato para a fosforilação de proteínas alvo. Ao mesmo tempo, estes análogos permanecem ligados ao domínio quinase por um grande espaço de tempo, competindo, desta maneira, com o ATP celular e como consequência há uma interrupção do sinal oncogênico. Durante os anos 90 vários inibidores de tirosino quinase foram produzidos através da purificação de substâncias naturais como a herbimicina A ou foram sintetizados em laboratório, como a tyrfostina (Levitzki e Gazit, 1995; Druker e Lydon, 2000; Traxler *et al.*, 2001).

O inibidor que apresentou maior sucesso na interrupção do sinal oncogênico foi o mesilato de imatinib, conhecido comercialmente como STI571 ou Glivec. Este composto inibe a atividade tirosina quinase das proteínas relacionadas a Abl (ARPs). O STI571 também é capaz de inibir, além destas proteínas, o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas e também o receptor KIT (Buchdunger *et al.*, 1996; Okuda *et al.*, 2001). Como consequência desta inibição, a proliferação das células é inibida, induzindo apoptose nas células leucêmicas (Druker *et al.*, 1996). O sucesso do STI571 em desempenhar uma função pré-determinada levou ao desenvolvimento de outras drogas com alvos diferentes, como a adafostina (uma Abl tirfostina), a geldanamicina (inibidora da HSP90 chaperona de Abl) e o inibidor da farnesil transferase que previne a ativação de Ras e outras proteínas farnesiladas (Mow *et al.*, 2002; Gorre *et al.*, 2002; Hoover *et al.*, 2002). Entre estas terapias molecularmente direcionadas também encontram-se aquelas dirigidas contra Abl-Bcr em nível do mRNA como a ribozima dimérica “maxizyme” (Tanabe *et al.*, 2000) e o RNA de interferência (Wilda *et al.*, 2002).

Transplante de medula óssea

Uma das técnicas de tratamento mais utilizada em LMC é o transplante de medula óssea. Este tratamento consiste na depleção do sistema imune do paciente por quimio ou radioterapia para que este possa receber células progenitoras hematopoiéticas normais derivadas de um doador. Assim, durante a depleção, as células leucêmicas devem ser eliminadas e as células progenitoras hematopoiéticas do doador devem recolonizar o sistema hematopoiético do paciente (Barret, 2003). Atualmente é sabido que neste sistema, além da depleção celular, também são de grande importância os linfócitos T citotóxicos do

doador, os quais eliminam as células hematopoiéticas remanescentes do paciente, entre elas as células leucêmicas. Este fenômeno não acontece nos transplantes autólogos, diminuindo as chances de indução de remissão da doença. Além disto, foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que as células estromais, as quais interagem diretamente com as células hematopoiéticas na medula óssea, também desempenham um importante papel no desenvolvimento da LMC, uma vez que as células estromais de indivíduos sadios suportam a hematopoiese com mais eficiência que as células estromais dos pacientes com LMC (Cordero *et al.*, 2004).

Outras terapias

Além dos tratamentos com drogas que atacam especificamente a proteína híbrida Bcr-Abl, outros tratamentos desenvolvidos anteriormente ao STI571 continuam a ser utilizados (revisado por Smith, 2003). A hidroxiuréia e o busulfan são utilizados quando o interferon α ou o STI571 não podem ser usados e quando o transplante de medula óssea não é possível. Entre estas duas drogas, a hidroxiuréia é a mais usada por ser melhor tolerada do que o busulfan. A citarabidina é um antimetabólito que pode ser aplicado, subcutaneamente, como droga única ou em combinação com outros tratamentos. Por último, o interferon α é um estimulante do sistema imune, tendo demonstrado maior efeito que os três quimioterápicos anteriormente citados, induzindo remissão hematológica completa em aproximadamente 80% do pacientes e remissão citogenética em 30% destes; o que se reflete através do aumento da sobrevida dos pacientes em 6 a 8 anos.

1.4 - A linhagem celular K562

A linhagem celular K562 foi estabelecida a partir do cultivo de células de um paciente com leucemia mielóide crônica onde cromossomo Philadelphia estava presente (Lozzio e Lozzio, 1975). Esta linhagem possui um considerável grau de plasticidade que permite sua diferenciação, quando submetida a diferentes agentes químicos, em células eritróides, com produção de hemoglobina fetal (HbF), ou em células megacariocíticas, com aumento de tamanho e ploidia além de marcadores de superfície específicos (revisado por Tsiftoglou *et al.*, 2003) (tabela 2). Esta plasticidade faz da linhagem celular K562 um

ótimo modelo experimental para trabalhos envolvendo o que se denomina de “terapia da diferenciação do câncer”, que é o tratamento de células neoplásicas com agentes indutores de diferenciação celular. Além disso, por ter características eritróides, esta mesma abordagem metodológica sobre esta linhagem permite estudar os caminhos que levam à expressão de hemoglobina, fator de fundamental importância para o tratamento de pacientes com talassemia e anemia falciforme.

Tabela 2 - Indutores de diferenciação na linhagem eritroleucêmica K562 (atualizado a partir de Tsiftoglou *et al.*, 2003)

Agentes indutores	Fenótipo terminal da diferenciação
5-Azacytidina	Eritróide
5-FU	Eritróide
Ácido butírico	Eritróide
Antraciclina	Eritróide
Apicidina	Eritróide
Ara-C	Eritróide
Butirato de Sódio	Eritróide
	megacariocítico
cis-platina	Eritróide
Cromomicina	Eritróide
Guanina, guanosina e dGTP	Eritróide
Ésteres de Forbol (PMA, TPA)	megacariocítico
Hemina	Eritróide
Herbimicina	Eritróide
HMBA	Eritróide/ megacariocítico
Hidroxiuréia	Eritróide
Mitramicina	Eritróide
PA	Eritróide
PMEA	Eritróide
Resveratrol	Eritróide
Tallimustina	Eritróide
Tiazofurina	Eritróide
Vitamina B12	Eritróide

1.5 - Antraciclina

Como demonstrado por diversos autores, a síntese de hemoglobina fetal em células da linhagem K562 pode ser induzida através do tratamento destas células com vários compostos diferentes, entre os quais encontram-se as antraciclina.

As antraciclina são uma das famílias de drogas anticâncer mais efetivas. As primeiras foram isoladas de *Streptomyces peucetius* nos anos 1960 e foram denominadas doxorubicina (DOX) e daunorubicina (DNR). A única diferença entre DOX e DNR é que a cadeia lateral de DOX termina em um grupo álcool primário, enquanto a cadeia lateral de DNR termina em um grupo metil. Esta pequena diferença tem consequências importantes no espectro de atividade de DOX e DNR. Assim, DOX é um componente essencial para o tratamento de câncer de mama, tumores sólidos em crianças, sarcoma de tecidos moles, e linfomas agressivos. DNR, por sua vez, mostra atividade em leucemias linfóides ou mielóides agudas (Weiss, 1992).

Com o objetivo de identificar novas antraciclina superiores a DOX e DNR em termos de atividade e/ou tolerância cardíaca, foram sintetizados mais de 2000 análogos diferentes (Weiss, 1992). No entanto, poucas destas antraciclina foram aprovadas para uso clínico; entre aquelas aprovadas se encontram a pirarubicina, a aclacinomicina A (aclarubicina) e a mitoxantrona. As células em geral desenvolvem menor resistência às duas primeiras drogas, quando comparadas com DOX e DNR (Lothstein *et al.*, 2001). Entretanto, a aclarubicina induziu eventos cardíacos tardios em um estudo de fase II de pacientes adultos com LMA e LLA refratárias (Dabich *et al.*, 1986), além de ser inativa em mulheres com câncer de mama metastático (Natale *et al.*, 1993).

Embora a utilização clínica seja freqüente, os mecanismos de ação das antraciclina em células tumorais é um tema de muita controvérsia. Considerando-se a ação das antraciclina, os seguintes mecanismos podem ser avaliados: a) intercalação no DNA, levando à inibição da síntese de macromoléculas; b) geração de radicais livres, produzindo dano do DNA ou peroxidação lipídica; c) ligação ao DNA e alquilação; d) *crosslinking* com o DNA; e) interferência na desespiralização do DNA ou na separação das fitas e atividade helicase; f) efeitos diretos na membrana; g) início do dano do DNA via inibição da topoisomerase II; e h) indução de apoptose em resposta à inibição da topoisomerase II. A controvérsia dos mecanismos de ação está focalizada principalmente na relação “concentração de droga x efeito”, já que muitos dos efeitos anti-câncer observados só ocorrem em altas concentrações da droga (concentrações acima das utilizadas durante o tratamento). Por esse motivo, foi proposto que estudos com concentrações da droga acima de 2 μM deveriam ser revisados utilizando-se concentrações abaixo deste limite (revisado por Gewirtz, 1999).

A topoisomerase II é uma enzima que modifica a topologia do DNA sem interferir na estrutura e seqüência dos deoxinucleotídeos. Estas podem causar quebras transitórias de uma fita ou de ambas as fitas do DNA, dependendo da topoisomerase inibida (Topoisomerase I ou topoisomerase II respectivamente), no entanto estas quebras podem ser restauradas após a mudança no estado de helicoidização da dupla fita. Isto caracteriza as topoisomerases como um alvo fundamental, visto que a supertorção do DNA é modulada conforme a fase do ciclo celular ou atividade transcricional (Binaschi *et al.*, 2001). As antraciclina atuam estabilizando a reação onde as fitas de DNA são cortadas e ligadas covalentemente aos resíduos de tirosina da topoisomerase II, impedindo a eventual religação do DNA. A formação e estabilidade do complexo ternário antraciclina-DNA-topoisomerase II é devida a determinantes estruturais definidos. O sistema de anéis planares é fundamental para que uma molécula possa se intercalar no DNA, nas antraciclina os anéis B e C se superpõem com pares de bases adjacentes e o anel D passa através do sítio de intercalação. A metade externa (não intercalante) da molécula de antraciclina (por exemplo o resíduo de açúcar ou o anel A ciclohexano) tem um papel importante na formação e estabilização do complexo ternário. Em particular, a metade açúcar, localizada no sulco menor, é o determinante crítico da atividade das antraciclina como veneno das topoisomerase I ou II (Guano *et al.*, 1999; Binaschi *et al.*, 2001). A morte celular provocada pelas antraciclina é baixa, mas depende significativamente do conteúdo de topoisomerase I das células, sugerindo que a inibição de topoisomerase I pode representar uma atividade suplementar na ação das antraciclina (Guano *et al.*, 1999). O dano do DNA mediado por topoisomerase II é seguido pela parada do crescimento em G₁ e G₂ e morte celular programada (Perego *et al.*, 2001; Zunino *et al.*, 2001). Provavelmente a resistência a antraciclina por parte das células tumorais pode ser devida a uma alteração na expressão ou atividade da topoisomerase II (Lage *et al.*, 2000).

Da mesma forma que outros agentes genotóxicos, a doxorubicina ativa a ligação do p53 ao DNA. Baseado no papel fundamental do p53 na indução de algumas formas de apoptose, tem sido proposto que p53 pode ter uma função importante na citotoxicidade causada por antraciclina. Esta hipótese é apoiada por estudos clínicos e pré-clínicos (Penault-Llorca *et al.*, 2003; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2003; Stearns *et al.*, 2003), mas evidências negativas também foram descritas (Inoue *et al.*, 2000; Perego *et al.*, 2001; Bertheau *et al.*, 2002; Gariboldi *et al.*, 2003). Esta incerteza no papel do p53 na apoptose induzida por

antraciclina pode ser atribuída a vários fatores, como a heterogeneidade dos tumores examinados, heterogeneidade dos métodos usados para estudar o estado do p53 e à resposta do tumor (Bertheau *et al.*, 2002).

Um fator fundamental de consideração pertence ao papel de p53 na regulação da transição no ciclo celular em células tratadas com DOX. De fato, a ativação de p53 por DOX contribui na indução do produto do gene p21^{waf1/cip1}, um forte inibidor de quinases dependentes de ciclinas envolvidas na transição G₁-S (Zhang *et al.*, 1995). Entretanto, foi proposto que tanto a presença quanto a ausência de p53 desempenhariam papéis importantes na indução à morte celular. Na primeira situação, as células que conseguem passar o *check point* da fase G₁ sofreriam uma quantidade considerável de dano no DNA e isto promoveria a apoptose mediada por p53 (Dunkern *et al.*, 2003). Na segunda situação, com a falta de p53 não haveria *check point* e mais células estariam proliferando, com o conseqüente dano do DNA e eventos de morte celular independente de p53 (Perego *et al.*, 2001).

As antraciclina também podem atuar através da geração de radicais livres. Este evento acontece durante um ciclo redox onde uma quinona do anel C é transformada em semi-quinona ao receber um elétron e quando este anel volta ao seu estado quinona reduz oxigênio formando espécies reativas de oxigênio (ROS) tais como o ânion superóxido (O₂⁻) (Vasquez-Vivar *et al.*, 1997). Este ciclo também pode ser acompanhado de ligação da droga a ferro e, neste caso, o complexo pode converter O₂⁻ e H₂O₂ em radicais mais potentes como a hidroxila (OH) (Myers, 1998). A interação ferro, DOX, ROS foi proposta como um mecanismo para promover apoptose em células endoteliais (Kotamraju *et al.*, 2002). No trabalho anteriormente citado, foi demonstrado que a internalização de ferro na célula, via receptor de transferrina, é essencial para que a apoptose aconteça durante o tratamento com DOX.

Embora as antraciclina sejam drogas anticâncer muito potentes, usadas tanto para tumores sólidos quanto para leucemias, seu uso no tratamento de LMC Ph⁺ é limitado ao tratamento durante a fase aguda da doença. Vários autores propõem que esta resistência das LMC Ph⁺ às drogas anti-leucêmicas, usadas para tratar LMA, pode ser devida a características próprias desta translocação e dois mecanismos foram propostos para explicar esta resistência ao tratamento. O primeiro deles está baseado nos sinais antiapoptóticos estimulados pela proteína Bcr-Abl explicados anteriormente e o segundo

está baseado na capacidade desta mesma proteína de impedir a entrada de certas drogas nas células ou de eliminar estas drogas das células de forma muito eficiente (Carter *et al.*, 2001).

A linhagem K562 tem a característica de não apresentar resistência contra as antraciclina ou outras drogas antileucêmicas (embora já tenham sido obtidas linhagens derivadas de K562 resistentes a drogas) e por este motivo é amplamente usada como modelo para testar diferentes compostos. A finalidade destes estudos é a de identificar um mecanismo que possa ser utilizado para bloquear a capacidade proliferativa das células leucêmicas, principalmente aquelas com cromossomo Ph, ou que estimule a síntese de HbF explorando a sua característica eritróide. Seja qual for o objetivo do uso dos diferentes compostos, antileucêmico ou indutor da síntese de hemoglobina, estudos bioquímicos e de genômica funcional têm grande importância, pois permitem não apenas estudar a etiologia das células leucêmicas, como também conhecer os principais alvos a serem atacados por compostos mais específicos. Existe ainda a possibilidade de alterar os compostos para que produzam respostas mais específicas, evitando efeitos colaterais que diminuem a qualidade de vida dos pacientes.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Levando em consideração os pontos acima expostos, este trabalho tem como objetivos:

1 - Estudar os efeitos do tratamento com aclarrubicina e doxorrubina em células da linhagem K562;

1a - Estudar mudanças morfológicas durante o tratamento com as duas drogas;

1b - Estudar mudanças no ciclo celular durante o tratamento com as duas drogas;

1c - Estudar mudanças na expressão gênica durante o tratamento com as duas drogas;

2- Estudar, em células tratadas com outros indutores da síntese de hemoglobina (hidroxiureia e dGTP), a expressão de genes diferencialmente expressos durante o tratamento das células K562 com antraciclina;

3- Estabelecer algum mecanismo de transferência gênica para futuros trabalhos envolvendo os genes diferencialmente expressos durante o tratamento de células da linhagem K562 com drogas indutoras da síntese de hemoglobina fetal.

CAPÍTULO 3

**INDUÇÃO DA SÍNTESE DE HEMOGLOBINA EM CÉLULAS K562 POR
DOXORRUBICINA E ACLARRUBICINA: EM BUSCA DE UM MECANISMO EM
COMUM**

**Andrés Delgado Cañedo, Daniel Garcia dos Santos, José Artur Bogo Chies, Nance
Beyer Nardi**

Artigo em preparação

**Indução da síntese de hemoglobina em células K562 por doxorubicina e
aclarrubicina: em busca de um mecanismo em comum**

Andrés Delgado Cañedo, Daniel Garcia dos Santos, José Artur Bogo Chies, Nance Beyer
Nardi

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande
do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil

Artigo em preparação

INTRODUÇÃO

A linhagem celular K562 foi estabelecida a partir do cultivo de células de um paciente com leucemia mielóide crônica (LMC) apresentando o cromossomo Philadelphia (translocação cromossômica t(9;22)) (Lozzio e Lozzio, 1975). Esta linhagem possui um considerável grau de plasticidade, diferenciando-se quando submetida a determinados agentes químicos em células eritróides, com produção de hemoglobina fetal, ou em células megacariocíticas com aumento de tamanho e ploidia, além de marcadores de superfície específicos (revisado por Tsiftoglou *et al.*, 2003). Esta plasticidade faz da linhagem celular K562 um ótimo modelo experimental para trabalhos envolvendo o que se denomina “terapia da diferenciação do câncer”, que é o tratamento de células neoplásicas com agentes indutores de diferenciação celular. Além disso, a mesma abordagem metodológica com esta linhagem permite estudar os caminhos que levam à expressão de hemoglobina nestas células, de fundamental importância para o tratamento de pacientes com talassemia ou anemia falciforme.

Entre os agentes químicos que induzem a diferenciação de células K562 em células eritróides capazes de produzir hemoglobina fetal, encontram-se a doxorubicina (DOX) ou adriamicina e a aclarubicina (ACLA), também denominada aclacinimicina, ambas pertencentes à categoria de drogas conhecidas como antraciclina. As antraciclina encontram-se entre as drogas anticâncer mais efetivas (Weiss, 1992). As primeiras antraciclina (DOX e daunorrubicina) foram isoladas a partir de *Streptomyces peucetius* na década de 1960; a partir de então, muitos análogos foram sintetizados com o objetivo de procurar a “melhor antraciclina”, entre eles a ACLA.

Embora a utilização clínica seja freqüente, os mecanismos de ação das antraciclina sobre células tumorais constituem um tema de muita controvérsia, sendo considerados diversos mecanismos: a) intercalação no DNA levando à inibição da síntese de macromoléculas; b) geração de radicais livres, produzindo dano do DNA ou peroxidação lipídica; c) ligação ao DNA e alquilação; d) ligação cruzada com o DNA; e) interferência no desenrolamento do DNA ou na separação das fitas e atividade helicase; f) efeitos diretos na membrana; g) início do dano do DNA via inibição da topoisomerase II; e h) indução de apoptose em resposta à inibição da topoisomerase II (revisado por Gewirtz, 1999). Estudos mais recentes propuseram também a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e

diminuição do pool lábil de ferro (LIP) como possíveis mecanismos alternativos de ação anticâncer (Richard *et al.*, 2002), embora Wu e Hasinoff (2005) descartem ROS como causadores do efeito antiproliferativo das antraciclina.

Mesmo sendo análogos químicos, ACLA e DOX interferem de forma diferente no crescimento e diferenciação das células K562. O tratamento das células com doxorrubicina produz um bloqueio do ciclo celular acoplado à sua diferenciação, ao passo que estes dois processos não estão acoplados na indução de diferenciação com ACLA, em que a diferenciação pode ocorrer sem o bloqueio completo do ciclo celular (Nyoung *et al.*, 1994). Morceau *et al.* (1996a) estudaram estas diferenças mostrando que DOX bloqueia a síntese de proteínas não-globinas, enquanto ACLA estimula a super-expressão dos fatores de transcrição GATA-1 e NF-E2, indicando mecanismos diversos de ativação de genes globinas nestes dois tratamentos.

Neste trabalho, analisamos o papel destas drogas na indução da síntese de hemoglobina em células da linhagem K562, demonstrando que existem diferenças morfológicas e no ciclo celular em resposta aos dois tratamentos. Além disso, através de análise do padrão de expressão gênica das células tratadas, realizada por *differential display*, mostramos que enquanto para alguns genes o padrão de expressão é comum em resposta a ambos tratamentos, para outros esta resposta é específica a cada um deles. A análise por RT-PCR semiquantitativo da expressão de alguns destes genes, diferencialmente expressos, após tratamento das células K562 com outros indutores da síntese de hemoglobina (hidroxiuréia e dGTP) permitiu a sugestão de mecanismos comuns entre os quatro indutores estudados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular e tratamentos

Células da linhagem K562 (originadas do Banco de Células do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab, SP, Brasil) com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O tratamento foi realizado com 20 nM de ACLA (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA)

ou 40 nM de DOX (Sigma) durante 7 dias sem reposição de meio. Como controle foram usadas células não tratadas.

Análise da diferenciação eritróide

Alíquotas de 100 µl de suspensão celular derivada de cada tratamento e controle foram coletadas e centrifugadas por 7 minutos a 400 g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 40 µl de solução de Hank sem Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Sigma). A esta suspensão foram adicionados 8 µl de solução 5X de benzidina (Sigma), composta por benzidina 1% e ácido acético glacial 15% (Nuclear, SP, Brasil) e 2 µl de H_2O_2 30 vol (Nuclear). As células foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente e a frequência de células positivas foi analisada ao microscópio, com ajuda de uma câmara de Neubauer. Um mínimo de 300 células foram analisadas para cada tratamento.

Análise do ciclo celular

Foi usado o método descrito por Overton e McCoy (1994) para a análise do ciclo celular, com pequenas modificações. Aproximadamente 5×10^5 células foram centrifugadas e ressuspensas em solução contendo 50 µg de iodeto de propídio (PI, Calbiochem, La Jolla, CA, EUA), 10 mM Trizma base (Sigma), 10 mM NaCl, 0,7 U RNase (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA), e 0,01% NP-40 (USB, Suíça). Depois de 5 min, as células foram analisadas em um citômetro de fluxo FASCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os dados foram coletados em um gráfico que analisava o tamanho (FL2W) e a área (FL2A) de 15.000 pulsos FL2 (vermelho-laranja), e analisados com o software ModFit (Verity Software House, Topsham, ME, EUA).

Extração de RNA

RNA total, extraído usando-se o reagente TRIzol (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante, foi ressuspenso em 30 µl H_2O tratada com DEPC (Sigma). A suspensão foi tratada com 2 unidades de DNase (Promega, Madison, WI, EUA), para eliminar o DNA contaminante da amostra, durante 30 min a temperatura ambiente. A DNase foi removida da amostra através de um segundo ciclo de TRIzol (200 µl). Os outros reagentes foram usados nas proporções recomendadas pelo fabricante. O RNA foi ressuspenso em H_2O e

quantificado por espectrofotometria. A pureza e integridade do RNA foram analisadas em gel de agarose não desnaturante 1,5%, em TBE 0,5%, corado com brometo de etídeo.

Síntese de cDNA e differential display (DD-PCR)

O *differential display* foi realizado usando reagentes e protocolos recomendados por (Liang *et al.*, 1993) com algumas modificações. Para cada amostra foram feitas 3 reações de transcrição reversa. Para isto, 500 ng de RNA total, 2 pmole de um dos 3 oligo-dT usados (H-T_{11A}, H-T_{11G} ou H-T_{11C}), dNTP 20 µM e H₂O até um volume de 15 µl foram aquecidos a 70°C por 2 minutos e resfriados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Após este período, 200 U de RT-mMLV (Promega) e 4 µl de tampão 5X (fornecido com a transcriptase reversa) foram adicionados e a preparação foi incubada a 37°C durante 90 minutos.

Uma fração de 1,5 µl deste cDNA foi usado como molde para a reação de DD-PCR em volume de 20 µl contendo tampão de PCR 1X, MgCl 2 mM, 2 pmol de 1 dos 9 primers randômicos usados, 2 pmol do primer oligo-dT usado para sintetizar o cDNA molde empregado, dNTP 20 µM e 1 U de taq platinum (Invitrogen). Os 9 primers randômicos utilizados incluíram AT1-8 (GenHunter Corporation, Nashville, TN, EUA) e um primer específico por nós desenhado baseado no gene Hox-A9 e que denominamos AT-hox-a9. Este primer não possui sítio de reconhecimento por enzima de restrição, sendo sua sequência

5' TCTGTTCTGTCCT 3'.

As reações foram amplificadas usando 94°C - 2 min; 94°C - 40 s, 38°C - 2 min e 72°C - 40 s durante 40 ciclos e extensão a 72°C durante 5 min. Esta amplificação foi realizada em um termociclador PCR Express Thermal Cycler (Thermo Hybaid, Ashford, Middlesex, Reino Unido) Uma alíquota de 7 µl de cada produto de PCR foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, 8 M de Uréia em TBE 1X.

Os géis foram corados com AgNO₃ segundo Sanguinetti *et al.* (1994) com pequenas modificações. Terminada a eletroforese, os géis foram fixados durante 5 min em solução de EtOH 10% e ácido acético 0,5% pré-aquecida a aproximadamente 60°C e lavados 3 vezes com H₂O destilada/deionizada durante 2 minutos. A próxima etapa envolveu reação por 20 minutos em solução de AgNO₃ (Sigma) 0,1% pré-aquecida a aproximadamente 60°C, 2 lavagens com H₂O destilada/deionizada entre 30 e 60 segundos

e revelação em NaOH (Synth, Brasil) 3% com 3 ml/l de formaldeído 37%, até desenvolvimento da coloração desejada. Após esta etapa os géis foram lavados rapidamente com uma solução de ácido acético 3%, para retirar o NaOH superficial, sem ser realizada fixação.

As bandas com expressão diferencial aparente entre os géis derivados do material tratado e do controle foram recortadas e deixadas em um tubo de reação de 500 µl por 2-5 minutos, tempo suficiente para desidratação do gel, sendo depois esmagadas com ajuda de uma ponteira e re-hidratadas com 300 µl de H₂O. O DNA eluído foi usado para PCR sem purificação. A reamplificação das bandas foi feita através do mesmo protocolo usado para o primeiro PCR, partindo-se de 3 µl da banda eluída.

Sequenciamento

Todas as bandas reamplificadas foram sequenciadas. Os produtos de PCR reamplificados foram marcados com o kit bigdye v3.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em reações de 10 µl, mantendo os reagentes nas proporções indicadas pelo fabricante. O ciclo de marcação usado foi: 2 minutos a 96°C seguidos de 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 38°C e 4 minutos a 60°C. Os produtos foram analisados em sequenciador MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Uma busca comparativa das sequências foi realizada usando o algoritmo BLASTAn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Validação por RT-PCR semi-quantitativo dos genes diferencialmente expressos

As sequências de interesse foram validadas por RT-PCR semi-quantitativo com primers específicos, desenhados a partir das sequências obtidas da base de dados do NCBI. Primers específicos para amplificar os genes da 6GPHD e β-actina foram usados como controles internos.

Os oligos usados foram:

NOME	DIRETO	REVERSO
MAPK-1	5' ACTAGCACTGTTCTGTCCTC 3'	5'CTGGATAGCATTTTCCGTGG 3'
NFE2L2	5' GGAGTGTCAGTATGTTGAATC 3'	5'GCCATTTTTTGTCCATACAG 3'
NdrG1	5' AAAGACCACTCTCCTCAAG 3'	5'TGGTTAATGGAAGAGGATGC 3'
PHF20	5' ACCAAGGAATCTGAAGAAGG 3'	5'TTTGGACATGCCTCTTTCCC 3'
RFC1	5' CCTTACTAACCTGTTGTGTG 3'	5'TCACAGAGGTAGCACAGACC 3'
ATP6AP1	5' TCATGCTCTTCATCTTCACC 3'	5'TGTTAGCACAAACATCACCAG 3'
ZKSCAN1	5' CTAAAGCACTATCGCACTCC 3'	5'CTTTGCCACAGAAAGATGTC 3'
6GPHD	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'
B-actina	5' ACGGCTCCGGCATGTGCAAG 3'	5' TGACGATGCCGTGCTGCATG 3'

RESULTADOS

Indução de síntese de hemoglobina em células K562 tratadas com ACLA ou DOX

Para estudar a indução de hemoglobina com os agentes ACLA e DOX, células da linhagem K562 foram submetidas às concentrações utilizadas por Morceau *et al.* (1996a), 20 nM e 40 nM respectivamente. Conforme apresentado na figura 1, a revelação com benzidina mostra claramente a proporção mínima de células produzindo hemoglobina na cultura. A análise da frequência de células positivas mostrou uma diferença significativa na frequência de células produtoras de hemoglobina a partir do terceiro dia de tratamento, quando comparadas com o controle, e um aumento nesta frequência dependente do tempo de tratamento (tabela 1). Simultaneamente com o aumento na porcentagem de células produtoras de hemoglobina também foi observado um aumento na mortalidade celular, detectada através da técnica de exclusão do corante azul tripan. Esta diminuição de viabilidade é mais visível a partir do terceiro dia de tratamento para DOX e quarto dia para ACLA. O efeito foi maior nas células tratadas com DOX, onde no sétimo dia de tratamento a viabilidade foi inferior a 25%.

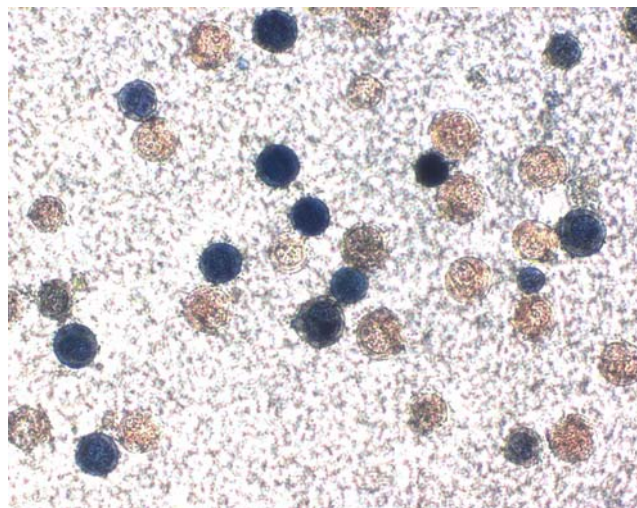


Figura 1 – Microfotografia em contraste de fase (400X) de células da linhagem K562 no 4º dia de tratamento com DOX (40 nM) para induzir a síntese de hemoglobina. As células azuis correspondem àquelas produzindo hemoglobina, reveladas pela técnica de benzidina.

Tabela 1- Viabilidade celular e frequência de células K562 produtoras de hemoglobina (benzidina+) durante os 7 dias de tratamento com DOX ou ACLA. Células K562 não tratadas foram usadas como controle.

Dia	Controle		Aclarrubicina		Doxorrubicina	
	Viabilidade (%)	Benzidina + (%)	Viabilidade (%)	Benzidina + (%)	Viabilidade (%)	Benzidina + (%)
0	>99,0	9,72	>99,0	9,72	>99,0	9,72
1	>99,0	10,38	>99,0	12,23	> 99,0	8,9
2	>99,0	7,61	98,22	9,91	97,80	13,45
3	>99,0	6,95	98,70	16,23	93,88	17,53
4	>99,0	8,06	94,30	20,20	84,97	30,30
5	98,90	9,85	90,77	20,96	58,34	54,28
6	98,92	10,89	92,75	34,73	51,56	54,26
7	97,77	10,04	84,70	35,47	24,15	49,58

Modificações na morfologia das células tratadas

Para estudar possíveis modificações induzidas na morfologia, uma fração das células tratadas com DOX ou ACLA, assim como também as células não tratadas (controle), foram analisadas por citometria de fluxo usando um gráfico de FSC (tamanho celular) vs. SSC (complexidade celular), sendo outra fração corada com Giemsa e observada em microscópio óptico. Tanto na análise por citometria de fluxo quanto na análise morfológica através da coloração celular foram evidenciadas diferenças morfológicas entre as células tratadas e controle, bem como entre células submetidas aos dois tratamentos. As células tratadas com DOX apresentaram um aumento de tamanho simultâneo à alteração em sua complexidade, quando analisadas por citometria de fluxo. O aumento nestes dois parâmetros é visível a partir do primeiro dia de tratamento (Figura 2), tornando-se mais clara no terceiro dia de tratamento e parecendo reverter para o fenótipo normal após este período. Esta diferença pode ser observada, também, na análise microscópica, além de um aumento na relação citoplasma/núcleo acompanhado por um aumento da região clara perinuclear (Figura 3). Ao contrário das células tratadas com DOX, as células tratadas com ACLA apresentaram uma pequena redução no tamanho celular, quando comparadas com as células controle, sem que fossem afetadas outras características normais. As células controle possuíam as características normais da linhagem K562: núcleo central ocupando quase dois terços do volume celular rodeado por um citoplasma basófilo, superfície celular irregular e uma região perinuclear clara.

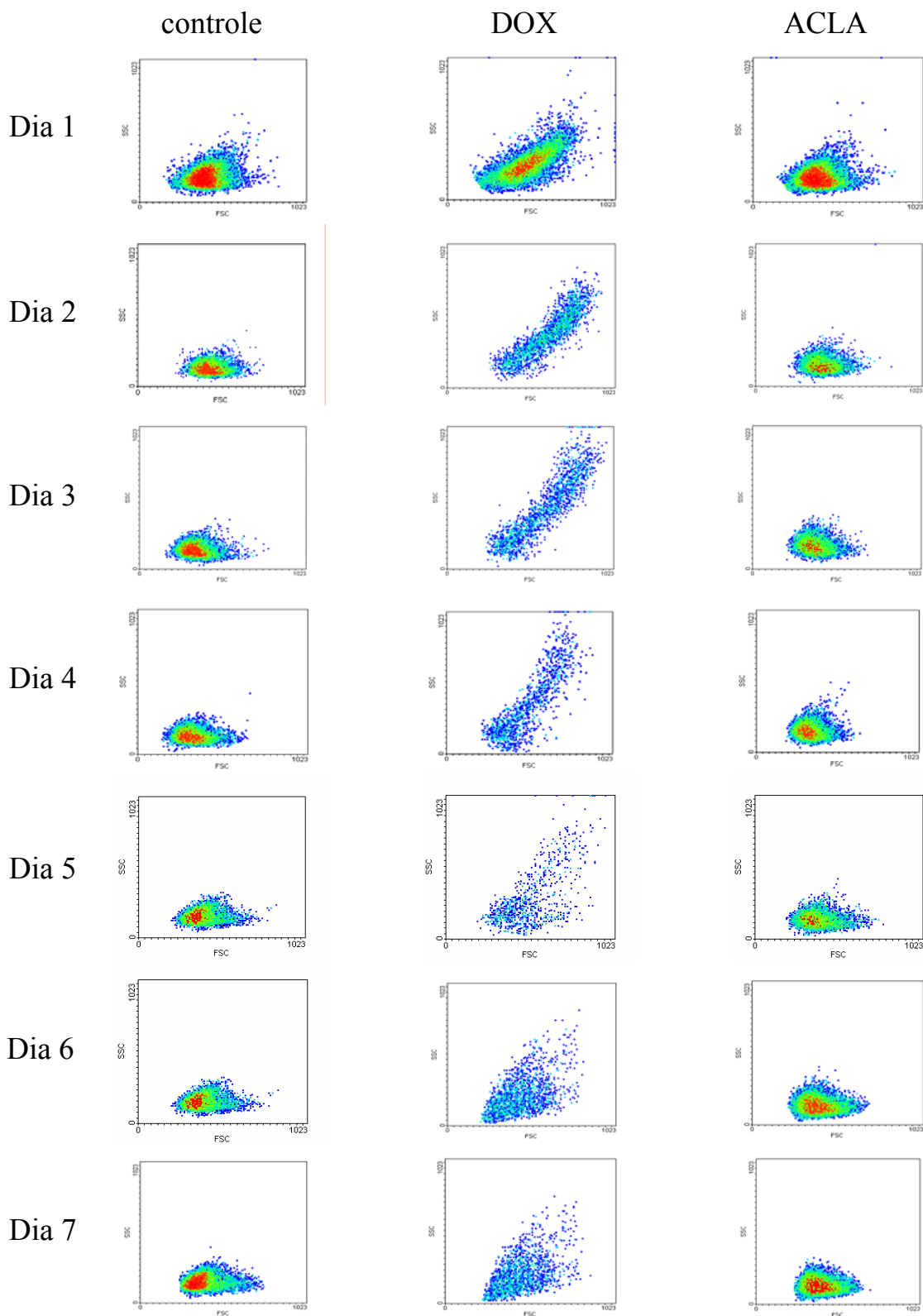


Figura 2- Análise do tamanho e complexidade celular [FSC (Y) vs. SSC (X) em gráfico de densidade] de células tratadas durante 7 dias com DOX ou ACLA. Células não tratadas foram usadas como controle.

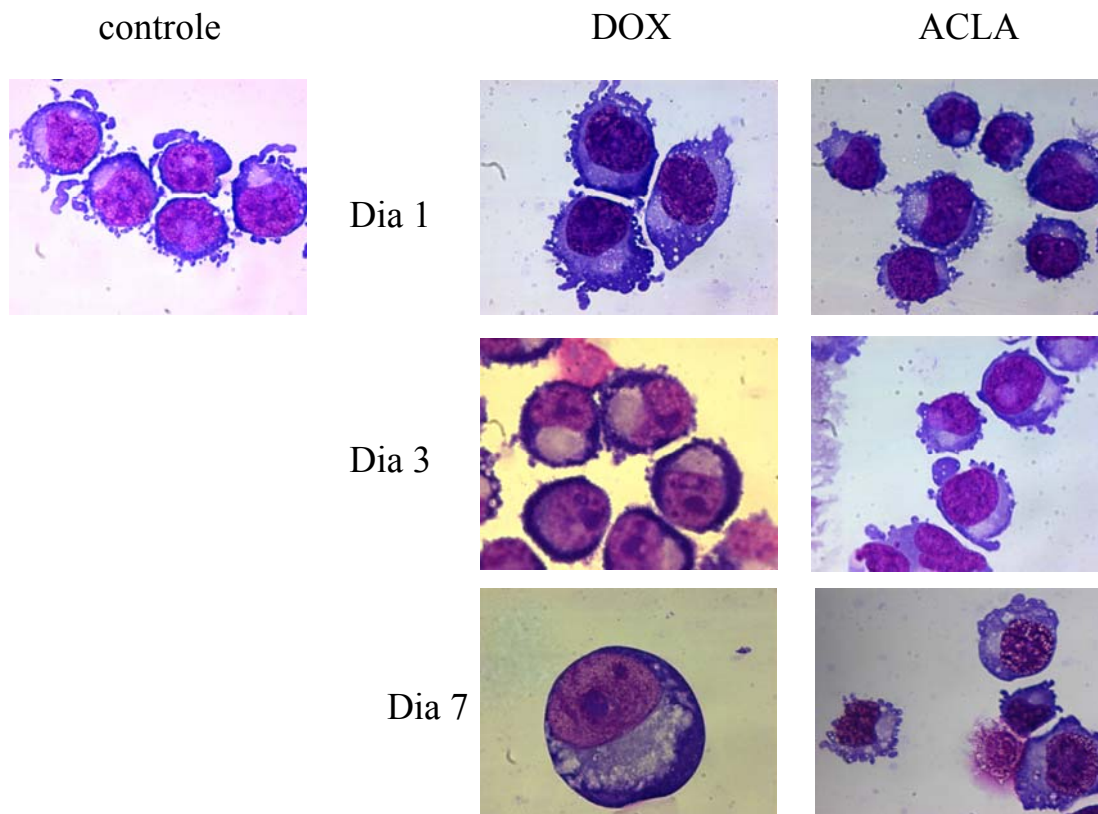


Figura 3 – Fotomicrografias de células tratadas durante 7 dias com DOX ou ACLA. Células não tratadas foram usadas como controle. As células foram coradas com Giemsa em tampão fosfato pH 6,8. (1000X)

Análise do ciclo celular após tratamento com DOX e ACLA

Para saber se a perda da capacidade proliferativa referida para as células tratadas com DOX ou ACLA era devida ao bloqueio em alguma fase específica do ciclo celular, o ciclo celular de células tratadas e não tratadas foi estudado através da técnica de marcação do núcleo com iodeto de propídeo (PI) e análise por citometria de fluxo. Da mesma forma que na análise morfológica, foi observada diferença entre células tratadas e não tratadas e também entre células submetidas a cada um dos dois tratamentos. As células tratadas com DOX apresentaram um bloqueio na fase G_2/M , visível a partir do primeiro dia de tratamento. Este bloqueio alcançou o valor máximo no segundo dia de tratamento e este valor foi mantido até o quarto dia quando começou a diminuir (figura 4). Nas células tratadas com ACLA, foi observado um bloqueio na fase G_1 , visível até o terceiro dia de tratamento. Após este dia, o bloqueio parece ter sido ultrapassado e a frequência de células em cada fase do ciclo aproximou-se da normalidade (figura 4). O padrão do ciclo celular das células controle não apresentou variação ao longo do período de cultura (figura 4).

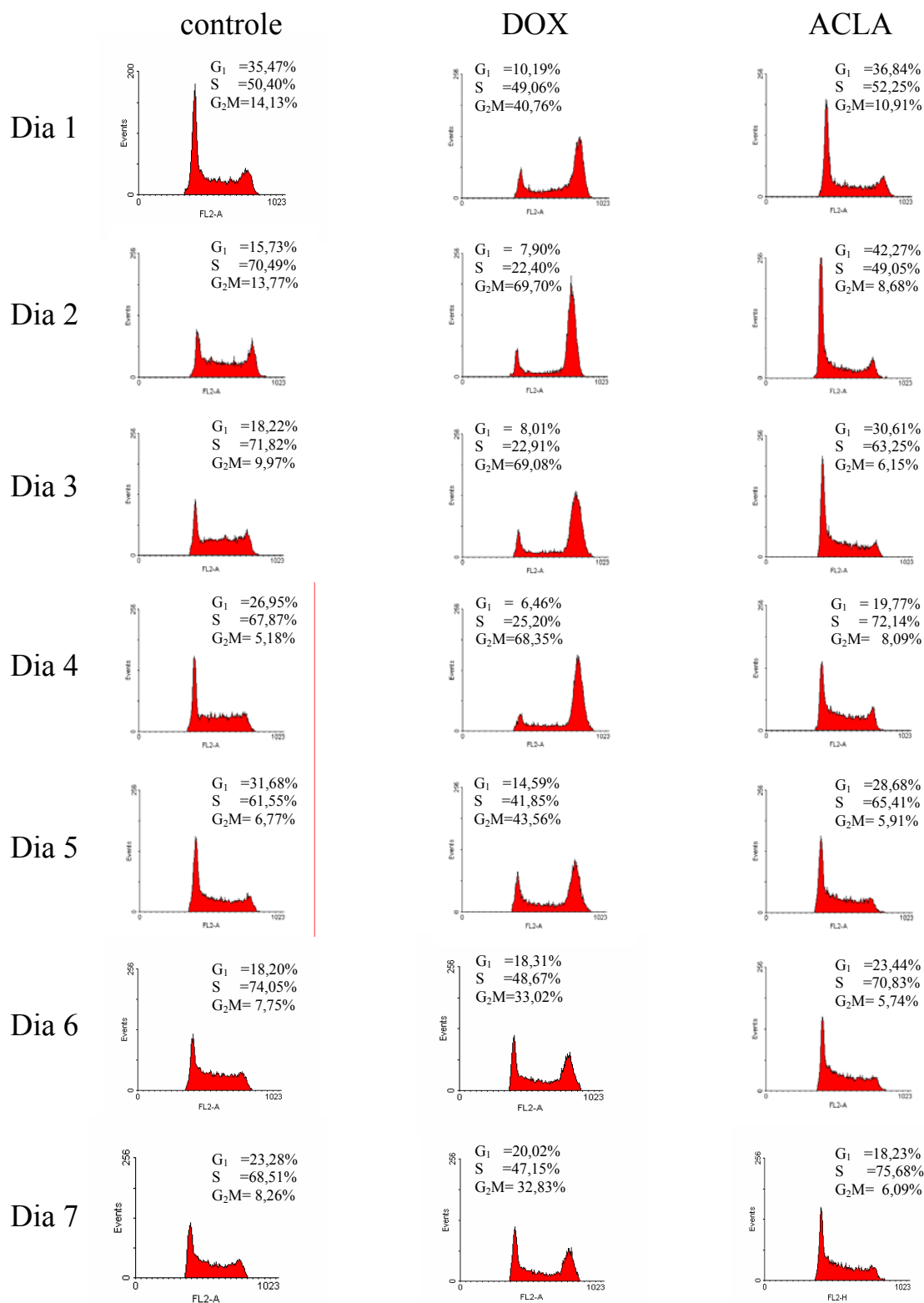


Figura 4 - Histogramas da análise do ciclo celular de células tratadas durante 7 dias com DOX ou ACLA. Células não tratadas foram usadas como controle. As frequências de células em cada fase do ciclo são apresentadas.

Análise da expressão gênica por DD-PCR em células tratadas e controle

Para o estudo da variação na expressão gênica ao longo do tratamento das células K562 com ACLA ou DOX, RNA total foi extraído das células nos dias 1, 3 e 7 de tratamento e também de células controle no dia 1. O RNA destas células foi reversamente transcrito para cDNA e DD-PCR foi realizado sobre este material. A revelação com prata dos géis de DD-PCR resultou em uma média de 68 bandas em cada uma das 27 combinações diferentes de primers. Destas bandas, 110 mostraram uma provável diferença entre o controle e as células tratadas ou entre os diferentes tratamentos, mas apenas 80 bandas puderam ser reamplificadas com os mesmos primers que as geraram (tabela 2). Uma fotografia típica do gel de DD-PCR revelado é apresentada na figura 5.

Tabela 2 – Relação das bandas diferencialmente representadas no gel de DD-PCR que foram reamplificadas. As mesmas foram separadas pela aparente cinética de expressão.

Expressão diferencial	Bandas
Indução pelo tratamento	1C-7, 8C-1, 9C-1, 9C-4, 9C-9, 2G-2, 2G-5, 2G-7, 3G-2, 9G-2, 9G-4, A5-5, A5-7, A5-8, A6-1, A6-2, A6-5
Redução/bloqueio pelo tratamento	1G-5, 2G-6, 2G-8, 3G-1, 3G-4, A5-2, A5-3, A5-6, A6-3, A6-4, A7-2
Indução pelo tratamento com ACLA	1C-4, 1C-5, 9C-7, A3-3, A3-4, A5-1
Indução pelo tratamento com DOX	4G-7, 8G-3
Indução em 24 h de tratamento	1C-8, 1C-9, 2C-1, 2C-5, 5C-3, 7C-2, 8C-2, 9C-8, 3G-3, 4G-8, 4G-9, 8G-2, 9G-5, A3-1, A7-6, A7-10, A7-12,
Bloqueio em 24 h de tratamento	1G-2, 4G-5, 8G-1
Expressão dependente do tempo de tratamento	1C-2, 2C-4, 9C-2, 9C-10, 2G-4, 4G-10, 9G-1, A1-1, A3-2, A3-5, A5-4
Bloqueio ou baixa expressão após tratamento com ACLA	9C-6, A7-1, A7-4, A7-5
Bloqueio ou baixa expressão após tratamento com DOX	5C-4, 9C-3, 1G-1*, 2G-3*, A5-9, A7-3, A7-9, A7-11*, A7-13*

* Bandas expressas somente com 24 h de tratamento.

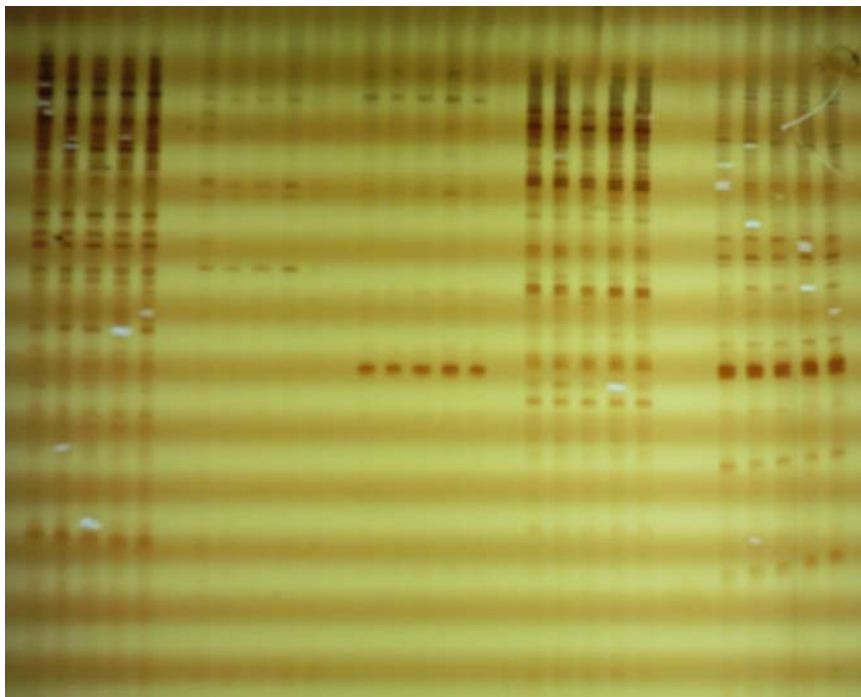


Figura 5 – Imagem típica do padrão de bandas em um gel com produtos de DD-PCR corados com prata.

Análise das bandas reamplificadas

As bandas extraídas dos géis foram reamplificadas e os produtos de PCR foram sequenciados. Do sequenciamento das 80 bandas, foram obtidas 26 seqüências com qualidade para análise, todas elas a partir do uso dos primers HT₁₁G e HT₁₁C. É provável que o primer HT₁₁A não seja adequado para as condições de sequenciamento utilizadas, o que indica a necessidade de um novo processo de sequenciamento com os primers randômicos que as geraram no lugar de HT₁₁A. Das bandas restantes, obtidas a partir de HT₁₁G e HT₁₁C, 6 mostraram mais de uma fita molde no sequenciamento e 20 mostraram pouca qualidade para a análise, embora a eletroforese em gel de agarose tenha sugerido a existência de uma banda única e a concentração do produto fosse a recomendada para a reação de sequenciamento. Estes casos deverão ser clonados antes de serem novamente submetidos a sequenciamento.

Uma vez analisadas as bandas, as suas seqüências foram investigadas usando o algoritmo BLASTAn, com resultados conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Fragmentos diferencialmente expressos durante o tratamento de células K562 com ACLA e DOX.

Banda	Homologia	Código	Nome oficial
1C8	Não corresponde a transcritos conhecidos ou hipotéticos	AC004142	
1C11	Proteína hipotética FLJ20507	NM_017849	FLJ20507
2C1	Ribonucleoproteína heterogênea nuclear A2/B1	NM_002137	HNRPA2B1
2C5	UDP-glicose ceramida glucosiltransferase	NM_003358	UGCG
2C6	Sequência 1 amplificada em células T malignas	NM_014060	MCTS-1
7C2	Ubiquinol-citocromo c reductase	NM_001003684	HSPC051
9C1	Proteína zinc finger 596	NM_173539	ZNF596
9C4	Factor de replicação C (ativador 1)	NM_002913	RFC1
9C9	Polipeptídeo 21 com box DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)	NM_004728	DDX21
9C10	Proteína hipotética FLJ21986	NM_024913	FLJ21986
1G5	Proteína hipotética FLJ12787, Scr relacionada com SAW	NM_032175	FLJ12787
2G2 e 4G9	Fator nuclear eritróide 2	NM_006164	NFE2L2
2G3	Proteína hipotética similar a Rap1b	XM_509210	LOC452065
2G4	Proteína PHD Finger 20	MN_016436	PHF20
2G5	NADH desidrogenase (ubiquinona) 1	NM_004549	NDUFC2
2G7	Sequência do cromossomo 8 (não aparece como gene) não relacionada com genes ou ESTs conhecidos	AC0232966	
3G2	Gene regulado <i>downstream</i> por N-myc 1	NM_006096	NDRG1
3G3	ORF 78 do cromossomo 9	NM_016520	C9orf78
4G8	GK001 protein hipotética	NM_020198	GK001
4G10	Proteína SSC L12	NM_015200	SCC-112
8G2	Zinc finger, contendo 2 domínios CSL	NM_206831	ZCSL2
8G3	Sequência mitocondrial não relacionada com genes nem ESTs conhecidos	AY714014	
9G1	Variante 1 do transcrito da proteína quinase 1 ativada por mitógenos	NM_002745	MAPK1
9G4	Proteína ATPase lisossomal de transporte de H ⁺	NM_001183	ATP6AP1
9G5	Proteína zinc finger com domínios KRAB e SCAN	NM_003439	ZKSCAN1

Validação da expressão diferencial por RT-PCR de 7 bandas

Para confirmar a expressão diferencial de algumas das bandas sequenciadas, foram sintetizados primers específicos para amplificar aquelas correspondentes aos genes *erk2*, *nfe2l2*, *ndrg1*, *phf20*, *rfc1*, *atp6ap1* e *zkscan1*. Assim, um novo tratamento das células foi realizado e RNA total das células tratadas com DOX ou ACLA foi extraído nos dias 1, 3 e 7 como também do controle no dia 1. A expressão diferencial dos genes foi analisada por RT-PCR. Os géis foram fotografados e analisados segundo a densidade das bandas usando o software Gel-Pro Analyser v3.1 (MediaCybernetics, Silver Spring, MD, EUA) Foi

observada uma certa constância na relação dos dados dos dois controles internos: a β -actina mostrou-se, em média, 0,633 vezes expressa com respeito à 6GPHD, com uma variação dos valores desde 0,521 até 0,685. Sendo assim, tomamos esta diferença (0,164) como um valor de variação permitido durante a relação entre os dados de expressão de cada gene e o valor obtido para a 6GPHD do mesmo tratamento.

A expressão do gene *ndrg1* foi induzida pelo tratamento com as duas drogas, com expressão visível no terceiro e sétimo dias de tratamento com DOX e primeiro dia de tratamento com ACLA. A maior diferença na expressão foi vista para o gene *rfc1*, para o qual dados de densitometria durante o tratamento mostraram-se mais de 3 vezes maiores que aqueles do controle. Também foi encontrado aumento da expressão dos genes *zkscan1*, *phf20*, *rfc-1*, *erk2* e *atp6ap1*. Já os valores obtidos para o gene *nf212* foram muito próximos daqueles do controle e alguns deles possuem valores com menos de 0,164 de diferença com respeito a este último, pelo qual nós não o consideraremos como diferencialmente expresso. Além da diferença na cinética de expressão do gene *ndrg1* entre os dois tratamentos, também foram encontradas diferenças nos genes *phf20*, *rfc-1*, *erk2* e *atp6ap1*, os quais tem um aumento de expressão visível a partir do primeiro dia, sendo que os valores se mantêm constantes quando do tratamento com DOX e aumentado durante o tratamento com ACLA. A expressão do gene *zkscan1* foi aumentada já no primeiro dia de tratamento com ambas drogas, mantendo-se constante durante os dias seguintes de tratamento. Os dados brutos e relativos de densitometria são mostrados na tabela 4.

Tabela 4 – Dados brutos (A) ou relativos à expressão de *6gphd* (B) da análise dos genes *erk2*, *nfe2l2*, *ndrg1*, *phf20*, *rfc1*, *atp6ap1*, *zkscan1*, β -*act* e *6gphd* durante o tratamento de células K562 com ACLA e DOX.

A

Gene	Controle dia 1	DOX			ACLA		
		dia 1	dia 3	dia 7	dia 1	dia 3	dia 7
<i>ndrg-1</i>			0,07350	0,10377	0,07158		
<i>atp6</i>	0,11115	0,33074	0,34937	0,34147	0,19340	0,26982	0,37469
<i>mapk1</i>	0,13779	0,32331	0,30674	0,39949	0,13897	0,28397	0,38744
<i>nfe2l2</i>	0,18033	0,28382	0,29247	0,27834	0,21144	0,28613	0,29163
<i>phf20</i>	0,08720	0,25676	0,29178	0,23386	0,07353	0,21635	0,32907
<i>rfc-1</i>	0,06933	0,28380	0,30354	0,29204	0,14681	0,23937	0,37627
<i>zkscan</i>	0,17754	0,56172	0,59710	0,49767	0,35122	0,39579	0,51736
<i>B-actina</i>	0,14096	0,17242	0,18996	0,14564	0,15868	0,16348	0,22131
<i>6gphd</i>	0,22491	0,25157	0,30364	0,27930	0,24490	0,24563	0,34736

B

Gene	Controle dia 1	DOX			ACLA		
		dia 1	dia 3	dia 7	dia 1	dia 3	dia 7
<i>ndrg-1</i>			0,242	0,371	0,292		
<i>atp6</i>	0,494	1,314	1,15	1,222	0,789	1,098	1,078
<i>mapk1</i>	0,612	1,285	1,01	1,43	0,567	1,156	1,115
<i>nfe2l2</i>	0,801	1,128	0,963	0,996	0,863	1,164	0,839
<i>phf20</i>	0,387	1,020	0,960	0,837	0,300	0,880	0,947
<i>rfc-1</i>	0,308	1,128	0,999	1,045	0,599	0,974	1,083
<i>zkscan</i>	0,789	2,023	1,966	1,781	1,434	1,611	1,489
<i>B-actina</i>	0,626	0,685	0,625	0,521	0,647	0,665	0,637
<i>6gphd</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Análise dos genes erk2, ndrg1, phf20, rfc1, atp6ap1 e zkscan1 durante o tratamento de células K562 com os indutores de diferenciação hidroxurêica e dGTP

Para saber se os genes *erk2*, *ndrg1*, *phf20*, *rfc1*, *atp6ap1* e *zkscan1*, diferencialmente expressos durante o tratamento das células K562 com ACLA ou DOX, eram específicos a estes tratamentos ou característicos de tratamentos que visam a indução da síntese de hemoglobina, culturas de células K562 foram tratadas com hidroxurêica (HU) ou dGTP sob uma concentração final de 200 μ M e 75 μ M respectivamente (Cokic *et al.*, 2003; Osti *et al.*, 1997). RNA total foi extraído destas células nos dias 1, 3 e 7 de tratamento e analisados por RT-PCR. Os produtos destas ampliações foram analisados

com os mesmos procedimentos utilizados para analisar as amostras tratadas com DOX e ACLA.

Durante o tratamento com HU, o gene *nf2l2* não mostrou uma diferença suficiente para ser considerado diferencialmente expresso em relação à amostra controle. Os genes *atp6ap1*, *erk2*, *rfc1* e *zkscan1* mostraram diferenças na expressão quando comparado com o controle, vistas a partir do primeiro e mantidas até o último dia de tratamento. O gene *phf20*, por outro lado, apresentou um valor próximo ao do controle no primeiro dia de tratamento aumentando sua expressão com a continuação do tratamento. A indução da expressão de *ndrg1* só foi vista no primeiro dia do tratamento com HU. Durante o tratamento com dGTP, a indução da expressão do gene *ndrg1* foi detectada no primeiro e sétimo dias de tratamento, sendo que este último apresentou uma intensidade maior que a do primeiro dia. Os genes restantes apresentaram um aumento na expressão até o terceiro dia de tratamento, mas no sétimo dia sua expressão diminuiu alcançando valores próximos ao do controle com os mesmos procedimentos utilizados para analisar as amostras tratadas com DOX e ACLA.

Embora a expressão diferencial do gene *nf2l2* não tenha sido validada para o tratamento com ACLA e DOX, ele foi igualmente analisado durante o tratamento com HU ou dGTP. A análise das amostras tratadas com HU não mostrou diferenças na expressão do gene *nf2l2*. Já no tratamento com dGTP, a expressão deste gene foi bastante diferente com relação ao seu comportamento nos demais tratamentos, mostrando uma tendência a um aumento de expressão dependente do tempo de exposição às drogas. Os dados de expressão relativa destes genes durante o tratamento são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Dados brutos (A) ou relativos à expressão de *6gphd* (B) da análise dos genes *erk2*, *nfe2l2*, *ndrg1*, *phf20*, *rfc1*, *atp6ap1*, *zkscan1*, *β -act* e *6gphd* durante o tratamento de células K562 com HU e dGTP.

A

Gene	Controle dia 1	HU			dGTP		
		dia 1	dia 3	dia 7	dia 1	dia 3	dia 7
<i>ndrg-1</i>		0,06968			0,04982		0,05366
<i>atp6</i>	0,11115	0,26048	0,16953	0,27240	0,22172	0,30990	0,14570
<i>mapk1</i>	0,13779	0,32864	0,19938	0,28672	0,21364	0,31961	0,14550
<i>nf2l2</i>	0,18033	0,24616	0,20561	0,23268	0,19678	0,25849	0,18926
<i>phf20</i>	0,08720	0,14020	0,16852	0,23551	0,17156	0,25896	0,12184
<i>rfc-1</i>	0,06933	0,24292	0,17069	0,25188	0,19703	0,31174	0,12355
<i>zkscan</i>	0,17754	0,57541	0,28542	0,45307	0,31159	0,47995	0,13596
<i>B-actina</i>	0,14096	0,16438	0,14831	0,16976	0,15716	0,19493	0,14727
<i>6gphd</i>	0,22491	0,28414	0,22595	0,27176	0,26793	0,26810	0,21755

B

Gene	Controle dia 1	HU			dGTP		
		dia 1	dia 3	dia 7	dia 1	dia 3	dia 7
<i>ndrg-1</i>		0,245			0,185		0,246
<i>atp6</i>	0,494	0,916	0,75	1,002	0,827	1,155	0,669
<i>mapk1</i>	0,612	1,156	0,882	1,055	0,797	1,192	0,668
<i>nf2l2</i>	0,801	0,866	0,909	0,856	0,734	0,964	1,149
<i>phf20</i>	0,387	0,493	0,745	0,866	0,64	0,965	0,56
<i>rfc-1</i>	0,308	0,854	0,755	0,926	0,735	1,162	0,567
<i>zkscan</i>	0,789	2,025	1,263	1,667	1,162	1,790	0,724
<i>B-actina</i>	0,626	0,622	0,656	0,624	0,586	0,727	0,676
<i>6gphd</i>	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

As células tratadas com HU ou dGTP, de modo similar ao realizado nas células tratadas com ACLA ou DOX, foram analisadas pela técnica de benzidina para identificação da proporção de células com expressão de hemoglobina e, através da técnica de exclusão de azul tripan, para determinação da viabilidade das células ao longo do tratamento. As células também foram estudadas quanto a possíveis alterações morfológicas (por coloração com Giemsa e citometria de fluxo) e em seu ciclo celular (através de citometria de fluxo).

Os dados da frequência de células expressando hemoglobina e viabilidade durante o tratamento estão apresentados na tabela 6. Pode ser observado que ambos os compostos

induzem a síntese de Hb nas células, mais aparente no terceiro dia de tratamento, com uma simultânea diminuição da viabilidade.

Tanto as células tratadas com HU quanto aquelas tratadas com dGTP apresentaram um aumento de tamanho e complexidade ao longo do tratamento quando analisadas por citometria de fluxo (figura 6). Conforme apresentado na figura 7, a análise morfológica mostrou, além de uma alteração no tamanho, a formação de pequenos vacúolos que vão aumentando, ou se fusionando, conforme passam os dias de tratamento com HU. Neste mesmo tratamento pôde ser observada uma alteração do pH nuclear que provoca a mudança de coloração do vermelho para rosa, acompanhada de um aumento da basofilia da região citoplasmática próxima à membrana plasmática (figura 7). O tamanho e complexidade das células tratadas com dGTP mostraram o mesmo comportamento do de células tratadas com HU quando analisadas por citometria de fluxo, exceto pelo fato de que estas parecem voltar ao tamanho normal a partir do quinto dia de tratamento (figura 6), enquanto na análise microscópica só foi visto um aumento do tamanho (figura 7).

A análise do ciclo celular mostrou que os tratamentos com HU ou dGTP promovem um bloqueio no começo da fase S, detectável a partir do primeiro dia de tratamento (figura 8).

Tabela 6 - Viabilidade e frequência de células K562 produtoras de hemoglobina (benzidina +) durante os 7 dias de tratamento com HU ou DOX. Células K562 não tratadas foram usadas como controle.

Dia	Controle		Hidroxiuréia		dGTP	
	Viabilidade (%)	Benzidina + (%)	Viabilidade (%)	Benzidina + (%)	Viabilidade (%)	Benzidina + (%)
0	>99,0	9,72	>99,0	9,72	>99,0	9,72
1	>99,0	10,38	>99,0	13,30	> 99,0	13,95
2	>99,0	7,61	>99,0	14,81	98,13	13,86
3	>99,0	6,95	96,57	16,23	98,44	25,83
4	>99,0	8,06	84,74	28,84	92,92	40,16
5	98,90	9,85	82,71	47,79	83,09	64,40
6	98,92	10,89	75,32	85,08	67,36	75,82
7	97,77	10,04	49,63	65,23	51,56	65,32

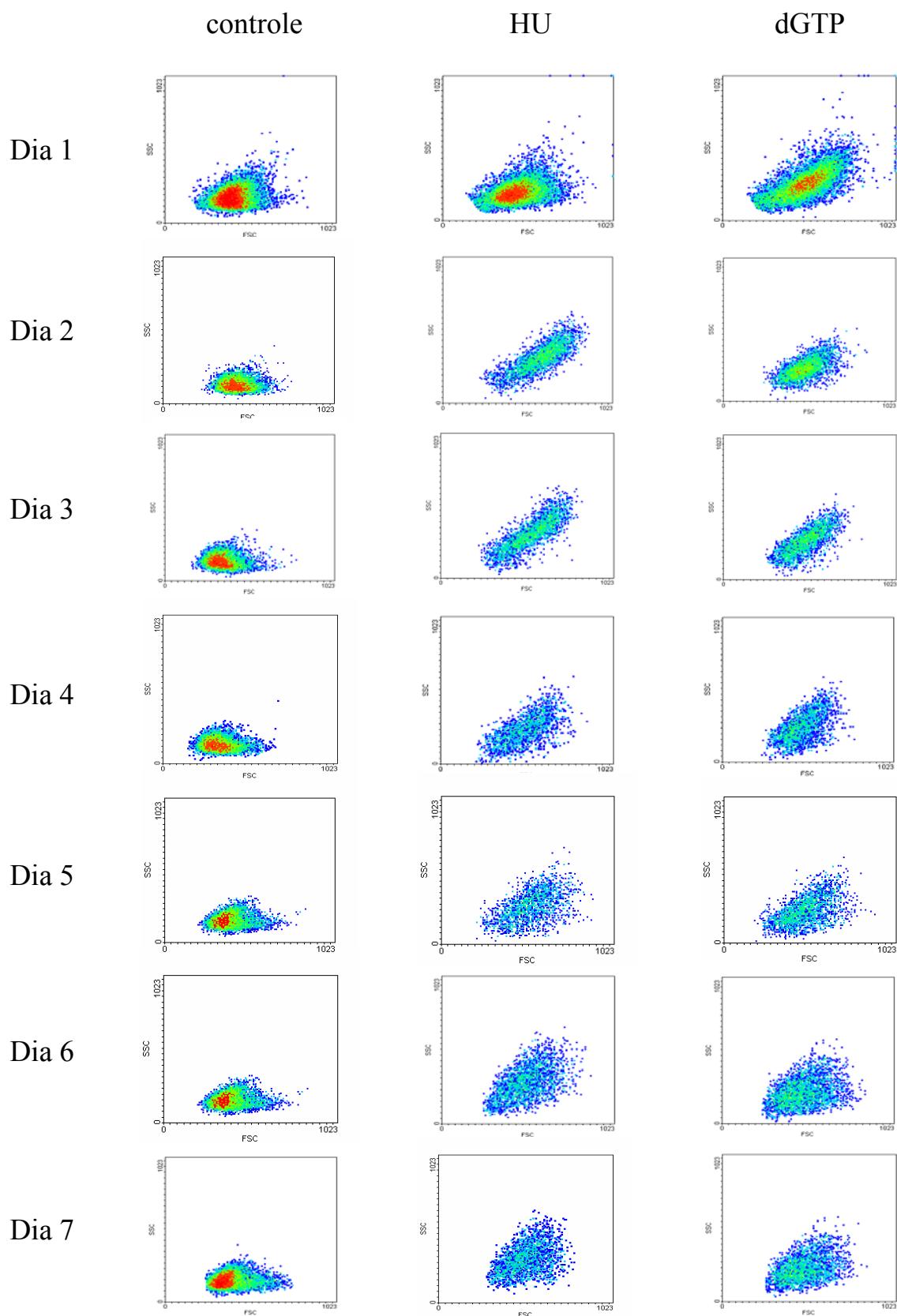


Figura 6 - Análise do tamanho e complexidade celular [SSC (Y) vs. FSC (X) em gráfico de densidade] de células tratadas durante 7 dias com HU e dGTP. Células não tratadas foram usadas como controle.

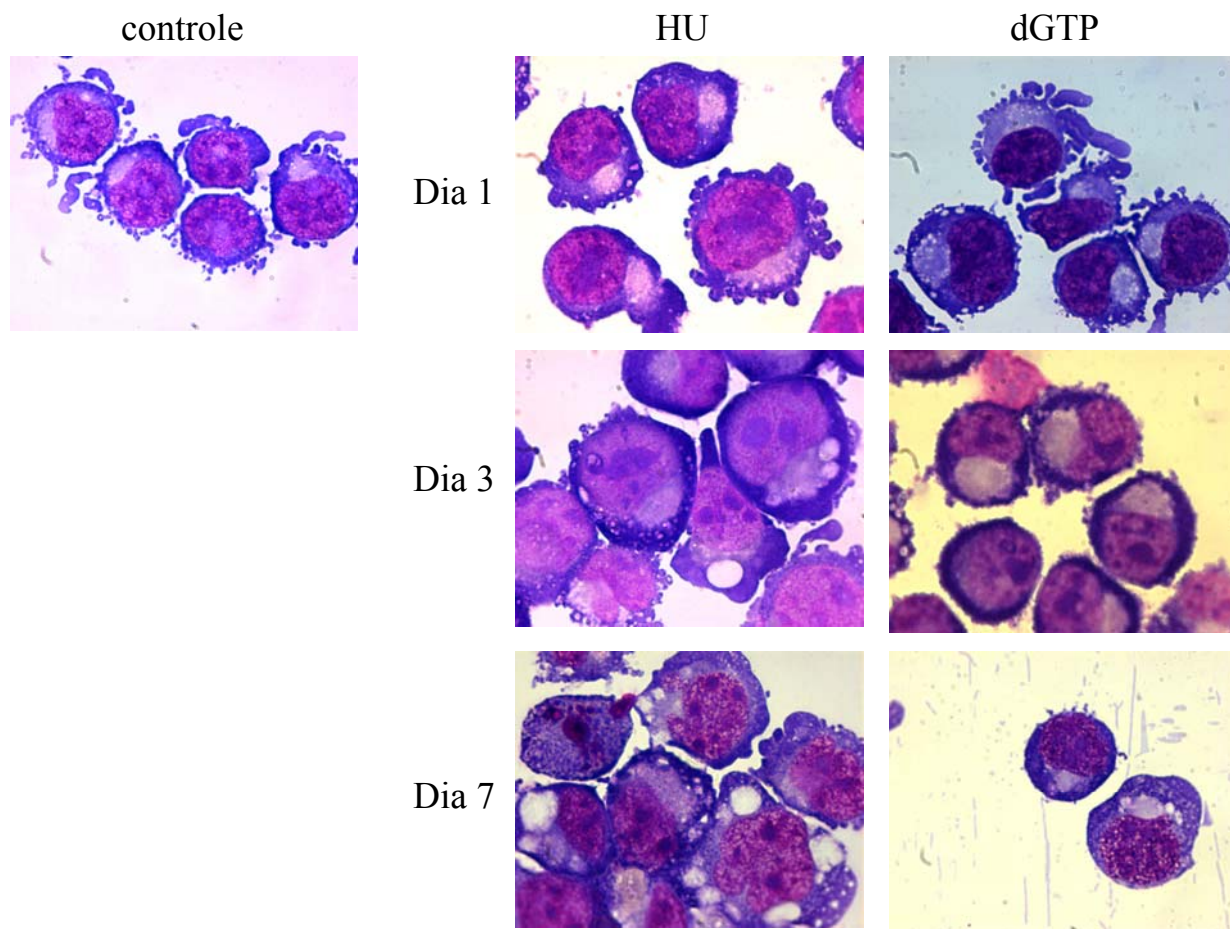


Figura 7 - Fotomicrografias de células tratadas durante 7 dias com HU ou dGTP. Células não tratadas foram usadas como controle. As células foram coradas com Giemsa em tampão fosfato pH 6,8. (1000X)

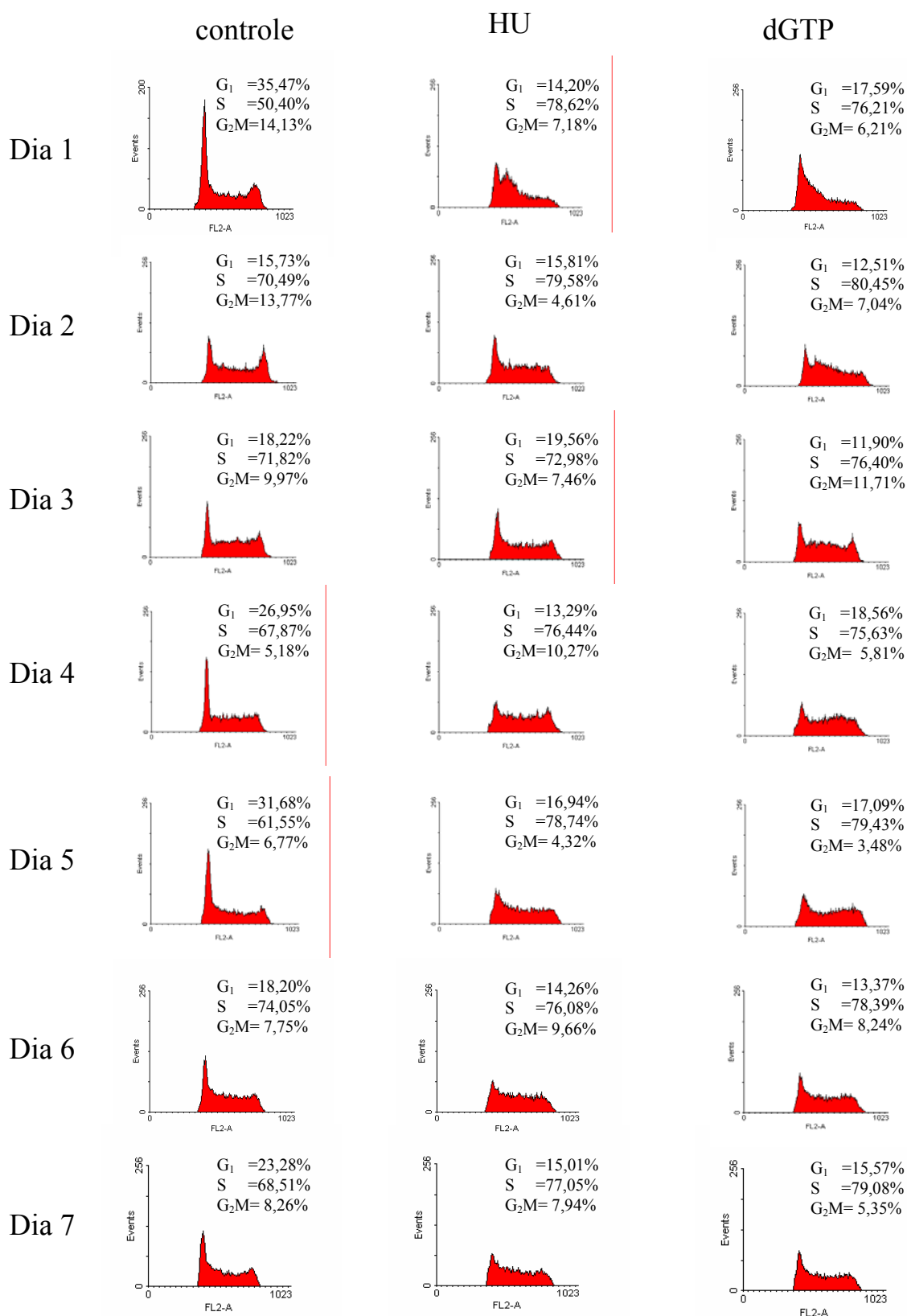


Figura 8 - Histogramas da análise, por citometria de fluxo, do ciclo de células K562 tratadas durante 7 dias com HU ou dGTP. Células não tratadas foram usadas como controle. A frequência de células em cada fase do ciclo é mostrada para cada dia de tratamento.

DISCUSSÃO

A plasticidade da linhagem eritroleucêmica K562 classifica-a como um ótimo modelo para estudar o poder antiproliferativo ou indutor da síntese de hemoglobina de diferentes drogas. As antraciclina, amplamente utilizadas como droga anticâncer, têm a capacidade de cumprir ambos papéis, antiproliferativo e indutor de síntese de hemoglobina. Entretanto, existem diferenças visíveis no modo de ação das várias antraciclina. Morceau *et al.* (1996a) mostraram que, enquanto ACLA induzia a expressão dos fatores de transcrição NF-E2 e GATA-1 e o receptor de eritropoietina, o tratamento com DOX provocava unicamente uma pequena diminuição de NF-E2 no terceiro dia de tratamento. Morceau *et al.* (1996b) também demonstraram, mediante inibição da transcrição, que embora DOX não estimule a transcrição do gene *gata-1*, possui a capacidade de estabilizar seu transcrito.

Além do transcrito de *gata-1*, DOX também estabiliza o transcrito de PBGD, proteína importante na síntese do grupo heme cuja expressão é estimulada tanto por ACLA quanto por DOX. A estabilização de transcrito não aconteceu quando as células foram tratadas com ACLA, sugerindo um mecanismo de indução por ACLA e estabilização por DOX. Aries *et al.* (1996) estudaram a ação dos promotores dos genes *gata-1* e do receptor de eritropoietina e dos seus *enhancers*, em um sistema onde estes dirigiam a síntese de luciferase, durante o tratamento com ACLA ou DOX de K562 transformadas com estes vetores. Foi observado que os genes eram estimulados pelo tratamento com ACLA, mas não com DOX.

Embora existam mecanismos diferentes de ação de ACLA e DOX, no que concerne aos genes eritróides envolvidos, mecanismos gerais pelos quais estas drogas atuariam foram propostos por diferentes autores. Chenais *et al.* (2000) demonstraram que o co-tratamento de células K562 com ACLA ou DOX e antioxidantes diminui a síntese de HbF reduzindo-a ao nível de expressão basal. Ao mesmo tempo, tanto ACLA quanto DOX alteram significativamente a atividade de marcadores redox celulares como GSht, GPx, Grase, TBARs, SODt e CAT de forma similar, com exceção de TBARs que sofreu aumento sob tratamento com DOX e diminuição quando do tratamento com ACLA. Estes mesmos autores também observaram alterações similares na atividade de CuZnSOD ao longo do tratamento com ACLA e DOX. No entanto, a atividade de MnSOD só foi

significativamente alterada quando do tratamento com DOX. Também foi possível observar nestes experimentos um aumento de ROS na primeira hora pós- tratamento.

Quanto ao efeito destas drogas sobre o ciclo celular, sabe-se que elas também se comportam de forma diferente, entretanto os trabalhos que estudaram estes parâmetros foram realizados com o uso de linhagens diferentes da K562. No presente trabalho analisamos o ciclo celular de células K562 tratadas com concentrações sub-tóxicas de ACLA ou DOX e observamos que, enquanto ACLA induzia um bloqueio do ciclo celular na fase G₁ até o segundo dia de tratamento, DOX bloqueava o ciclo na fase G₂/M levando a cultura até um valor de quase 70% de células nesta fase entre o segundo e quarto dia de tratamento. O bloqueio causado por DOX parece ser reversível, mas tendo-se em conta a capacidade de DOX de gerar dano do DNA, também pode ser possível que o bloqueio em G₂/M seja estável. Neste caso, a morte celular afetaria principal ou exclusivamente as células que se encontram nesta fase do ciclo celular, desbalanceando para o lado de G₁ a relação vista entre células em G₁ e células em G₂ após o quarto dia de tratamento. As células que se encontram na fase G₁ poderiam, então, ser células resistentes a DOX ou, alternativamente, encontrar-se no início do tratamento com DOX em algum ponto entre o final da mitose e G₀, ficando bloqueadas neste ponto.

Os dados de tratamento obtidos com DOX são semelhantes aos obtidos em células da linhagem de fibroblastos murinos Swiss3t3 por Siu *et al.* (1999). Neste estudo, foi demonstrado que DOX, além de bloquear o ciclo celular em G₂/M, também o bloqueia em G₁ se células sincronizadas são tratadas no período final da mitose/começo da fase G₁. Neste caso, o bloqueio em G₀/G₁ foi mantido até as 70 horas de análise realizadas pelos autores. O bloqueio em G₁ foi relacionado à expressão de p53 que induziria a expressão do inibidor de quinases dependentes de ciclinas (CDK) p21^{Cip1/Waf1} o qual promoveria a parada do ciclo em G₁. Entretanto este mecanismo não poderia ocorrer em células K562 pois estas são p53 negativas, ocorrendo portanto apenas o bloqueio em G₂/M. Entretanto, se as células que aparecem em G₁ a partir do 4^o dia de tratamento fossem células bloqueadas nesta fase do ciclo, o papel de p53 neste bloqueio deveria ser revisado. Assim, estudos do tratamento de células K562 sincronizadas em fase pre-G₀ com DOX seria um bom modelo para entender este ponto.

No estudo do ciclo celular de hibridomas tratados com DOX ou ACLA, o bloqueio do ciclo em G₂/M foi observado quando da utilização da primeira droga. Já o tratamento

com ACLA não apresentou diferenças em relação ao controle (Teillaud *et al.*, 1998), apesar de um aumento da concentração de ACLA, acima da concentração considerada sub-tóxica, provocar um aumento na porcentagem das células em G₁. Este comportamento havia sido anteriormente mostrado por Traganos *et al.* (1981), que também observaram que altas concentrações da droga bloqueava irreversivelmente o ciclo celular das células tratadas (Friend leukemia, L1210 e CHO) em G₂/M. Nossos dados com as células K562 permitem observar um aumento na frequência de células na fase G₁ nas concentrações sub-tóxicas usadas, mostrando que os efeitos das drogas são dependentes de sua concentração, do tempo de tratamento e do tipo de célula empregada no estudo.

Quando o tamanho e a complexidade das células tratadas foi analisado por citometria de fluxo, foi observado um aumento de ambos parâmetros quando do tratamento com DOX e uma pequena diminuição do tamanho nas células tratadas com ACLA que, neste último caso, poderia ser devido ao elevado número de células com tamanho normal na fase G₁. Eventos de mudança no tamanho e complexidade celular semelhantes aos nossos foram observados por Teillaud *et al.* (1998) em células de hibridomas, sendo estes os únicos dados de tamanho e complexidade celular disponíveis na literatura para estas duas drogas. As diferenças no tamanho, inicialmente observadas por citometria de fluxo, foram confirmadas através de análise morfológica por microscopia óptica. Embora as diferenças em tamanho que observamos por citometria de fluxo sejam semelhantes àquelas observadas por Teillaud *et al.* (1998), o tratamento com DOX por 48 horas aparentemente não altera a morfologia das células quando são analisadas as imagens publicadas por Zeng *et al.* (2000) referentes ao tratamento da linhagem de câncer de ovário Bcap37. Os estudos de ciclo celular feitos por estes mesmos autores mostraram que, 48 horas após o início do tratamento, podiam ser observadas células bloqueadas tanto em G₂/M como na parte final da fase S. Como o controle do ciclo celular em eucariotos depende de diversos fatores que asseguram que cada fase seja finalizada antes que a próxima fase tenha início (Hartwell e Weinert, 1989), a desregulação, ou descontrole, de qualquer um destes fatores pode ocasionar uma progressão do ciclo de forma independente de sinais gerados por estímulos extracelulares ou dano do DNA, como acontece em células tumorais (Elledge, 1996). Assim, existe a possibilidade de que, dependendo do perfil genético das células tratadas, as drogas afetem diferencialmente seu ciclo. Deste modo, este tipo de análise toma

importância quando pretende-se estudar os efeitos destas drogas em diferentes linhagens celulares.

Tendo em conta estas diferenças no ciclo celular e morfologia geradas durante o tratamento das células K562 com ACLA ou DOX, o estudo da expressão gênica nestas células através de técnicas de genômica funcional poderia oferecer informações importantes sobre o mecanismo de ação das mesmas. Foi incluído portanto neste trabalho o estudo, por *differential display*, do perfil de expressão gênica durante o tratamento de células K562 por 7 dias com ACLA ou DOX. A técnica utilizada foi a proposta por Liang *et al.* (1993) com algumas alterações, entre elas a quantidade de dNTP usada, já que a utilização de uma solução com concentração 400 μM permitiu aumentar a eficiência do PCR quando comparada com a obtida usando a solução a 25 μM recomendada. Por outro lado, usamos a técnica de coloração com AgNO_3 que permitiu, além de otimizar a técnica, não ficar dependente da vida média dos produtos radioativos para a análise. Outra alteração introduzida na técnica foi referente ao tratamento da banda recortada antes da reamplificação. A banda foi colocada em um tubo de reação de 500 μl e deixada repousando por alguns minutos, durante os quais o pedaço de gel de poli(acrilamida) sofre desidratação, o que permite a realização de um fácil esmagamento que melhora a eficiência da reamplificação sem a necessidade de precipitação com álcool.

O produto de DD-PCR gerou aproximadamente 1.836 bandas representando possíveis fragmentos gênicos, das quais 80 (4,5%) estavam diferencialmente representadas e foram sequenciadas. Atualmente 26 bandas estão identificadas: 9 sequências referem-se a genes ainda não estudados funcionalmente, 3 não aparecem na base de dados como possíveis genes (sendo que um destes pertence a uma sequência mitocondrial) e 2 representam proteínas com função determinada hipoteticamente a partir de sua sequência. As sequências restantes representam fatores de transcrição, genes direta ou potencialmente envolvidos na via de sinalização do ferro, envolvidos no dano do DNA, no processamento do RNA e na resistência a xenobióticos.

Devido ao fato que o ferro é um fator importante na síntese do grupo heme e sabendo-se que as antraciclinas interagem diretamente com este elemento, decidimos validar por RT-PCR semi-quantitativo a expressão diferencial de dois genes potencialmente envolvidos nesta via de sinalização, *ndrg1* e *atp6ap1*. Além destes dois genes, também foram analisados os genes *zkscan1*, *erk2*, *nfe2l2*, *phf20* e *rfc1*. O gene

mapk1 foi escolhido devido ao fato de que vários processos celulares são dependentes da sua atividade quinase; *nfe2l1* por estar relacionado com o gene *nfe2* analisado por Morceau *et al.* (1996a) o qual mostrou diferença na sua expressão durante o tratamento com ACLA; *rcfs1* por ser indicador de dano celular e *phf20* e *zkscan1* por serem fatores de transcrição de função desconhecida que podem ser bons modelos para futuros trabalhos. Esta análise permitiu validar os genes *ndrg1*, *atp6ap1*, *zkscan1*, *erk2*, *phf20* e *rfc1* como diferencialmente expressos quando comparados com sua expressão nas células não tratadas. Entretanto, as diferenças observadas na expressão de *nfe2l2*, quando comparada com as células controle, foram baixas e portanto a validação deste gene como diferencialmente expresso não foi possível.

Entre os 25 genes sequenciados, dois (*ndrg-1* e *ndufc2*) mostraram-se diferencialmente expressos quando células K562 foram tratadas com butirato de sódio durante 3 dias (Plonczynski *et al.*, 1999), sendo que *ndufc2* também apresentou expressão diferencial durante o tratamento de K562 com o indutor hemina (Addya *et al.*, 2004). Isto demonstra que drogas diferentes podem ativar um mecanismo geral que estimula a síntese de hemoglobina. O mesmo deverá ser observado quando do tratamento de células K562 com outros indutores da síntese de hemoglobina.

Quando a síntese de hemoglobina foi estimulada por HU foram vistos os resultados de ciclo celular esperados, com um bloqueio na fase S, devido à inibição da ribonucleotídeo reductase por parte da HU que resulta na inibição da síntese dos dNTPs necessários durante a fase S (Moore e Hurlbert, 1985). Já o aumento do número e tamanho de vacúolos fica como um ponto a ser estudado posteriormente, pois não achamos nenhuma referência explicando este evento, que não foi visto nos outros tratamentos. Quanto à análise do tamanho e complexidade celular analisados por citometrias de fluxo, as duas drogas se comportaram de forma semelhante com aumento do tamanho e complexidade dependente do tempo de tratamento, evidente a partir do primeiro dia de tratamento. O bloqueio do ciclo celular em S com dGTP foi visto pela primeira vez neste trabalho, e a possibilidade de que exista um mecanismo em comum com HU deverá ser estudado.

O estudo dos genes *ndrg1*, *atp6ap1*, *zkscan1*, *erk2*, *phf20* e *rfc1*, durante o tratamento com HU e dGTP, mostrou que estas drogas induziram aumento de expressão similar ao observado durante o tratamento com ACLA e DOX. Assim, os genes *ndrg1*,

atp6ap1, *zkscan1*, *erk2*, *phf20* e *rfc1* seriam possíveis alvos a serem estudados como mecanismo geral na estimulação da síntese de hemoglobina com diferentes drogas indutoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addya S, Keller MA, Delgrosso K, Ponte CM, Vadigepalli R, Gonye GE and Surrey S (2004) Erythroid-induced commitment of K562 cells results in clusters of differentially expressed genes enriched for specific transcription regulatory elements. *Physiol Genomics* 19:117-130.
- Aries A, Trentesaux C, Ottolenghi S, Jardillier JC, Jeannesson P and Doubeikovski A (1996) Activation of erythroid-specific promoters during anthracycline-induced differentiation of K562 cells. *Blood* 87:2885-2890.
- Chenais B, Andriollo M, Guiraud P, Belhoussine R and Jeannesson P (2000) Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. *Free Radic Biol Med* 28:18-27.
- Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT and Schechter AN (2003) Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest* 111:231-239.
- Elledge SJ, Winston J and Harper JW (1996) A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 6:388-392.
- Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727-741.
- Hartwell LH and Weinert TA (1989) Checkpoints - controls that ensure the order of cell-cycle events. *Science* 246:629-634.
- Liang P, Averboukh L and Pardee AB (1993) Distribution and cloning of eukaryotic messenger-RNAs by means of differential display - refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 21:3269-3275.
- Lozzio CB and Lozzio BB (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood* 45:321-334.

- Moore EC and Hurlbert RB (1985) The inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea, guanazole and pyrazoloimidazole (impy). *Pharmacol Ther* 27:167-196.
- Morceau F, Aries A, Lahlil R, Devy L, Jardillier JC, Jeannesson P and Trentesaux C (1996a) Evidence for distinct regulation processes in the aclacinomycin- and doxorubicin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells. *Biochem Pharmacol* 51:839-45.
- Morceau F, Chenais B, Gillet R, Jardillier JC, Jeannesson P and Trentesaux C (1996b) Transcriptional and posttranscriptional regulation of erythroid gene expression in anthracycline-induced differentiation of human erythroleukemic cells. *Cell Growth Differ* 7:1023-1029.
- Nyoung MN, Trentesaux C, Aries A, Carpentier Y, Jardillier JC, Gorisse MC and Jeannesson P (1994) Effect of aclacinomycin-doxorubicin association on differentiation and growth of human erythroleukemic K562 cells. *Anticancer Res* 14:1203-1208.
- Osti F, Corradini FG, Hanau S, Matteuzzi M and Gambari R (1997) Human leukemia k562 cells: induction to erythroid differentiation by guanine, guanosine and guanine nucleotides. *Haematologica* 82:395-401.
- Plonczynski M, Hardy CL, Safaya S, Harrell A, McCoy L, Brinson A, Agwarangbo L and Steinberg MH (1999) Induction of globin synthesis in K562 cells is associated with differential expression of transcription factor genes. *Blood Cells Mol Dis* 25:156-165.
- Richard D, Morjani H and Chenais B (2002) Free radical production and labile iron pool decrease triggered by subtoxic concentration of aclarubicin in human leukemia cell lines. *Leuk Res* 26:927-931.
- Sanguinetti CJ, Neto ED and Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of pcr products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:914-921.
- Siu WY, Yam CH and Poon RYC (1999) G1 versus G2 cell cycle arrest after adriamycin-induced damage in mouse Swiss3T3 cells. *FEBS Lett* 461:299-305.
- Teillaud JL, Gruel N, Moncuit J, Mishal Z, Fridman WH, Lampidis TJ and Tapiero H (1998) Structurally different anthracyclines provoke different effects on cell cycle and tumor B cell differentiation. *Biomed Pharmacother* 52:282-290.

- Traganos F, Staianocoico L, Darzynkiewicz Z and Melamed MR (1981) Effects of aclacinomycin on cell-survival and cell-cycle progression of cultured mammalian-cells. *Cancer Res* 41:2728-2737.
- Tsiftoglou AS, Pappas IS and Vizirianakis IS (2003) Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther* 100:257-290.
- Weiss RB (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?. *Semin Oncol* 19:670-686.
- Wu X and Hasinoff BB (2005) The antitumor anthracyclines doxorubicin and daunorubicin do not inhibit cell growth through the formation of iron-mediated reactive oxygen species. *Anticancer Drugs* 16:93-99.
- Zeng S, Chen YZ, Fu LW, Johnson KR and Fan WN (2000) In vitro evaluation of schedule-dependent interactions between docetaxel and doxorubicin against human breast and ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 6:3766-3773.

CAPÍTULO 4

**INDUCTION OF FETAL HAEMOGLOBIN EXPRESSION IN ERYTHROID
CELLS - A MODEL BASED ON IRON AVAILABILITY SIGNALLING**

Andrés Delgado Cañedo, José Artur Bogo Chies, Nance Beyer Nardi

Artigo aceito para publicação em Medical Hypotheses

**Induction of fetal haemoglobin expression in erythroid cells - a model based on iron
availability signalling**

A. Delgado-Cañedo, M.Sc., J. A. B. Chies, Ph.D., N. B. Nardi, Ph.D.*

Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
Brazil

Corresponding author:

Nance Beyer Nardi

Dep Genetica, UFRGS

Av Bento Goncalves 9500

91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-33166740

Fax: 55-51-33167311

E-mail: nardi@ufrgs.br

Grant support: This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq] and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul [FAPERGS].

Abstract

The K562 cell line has erythroid origin and is used for the study of fetal haemoglobin (HbF) production after treatment with several drugs, such as hydroxyurea, cisplatin and cytosine arabinoside (Ara C). It represents an important tool for the study of cancer differentiation therapy and treatment of thalassaemia and sickle cell disease. Although subject to intense research, the mechanisms involved in the induction of HbF are not fully established, and the regulation of several genes and signalling pathways has been proposed. Using the methodology of differential display, we investigated the changes in gene expression in K562 cells treated with doxorubicin and aclarubicin, which induce HbF expression and cell cycle arrest. Several genes were shown to present differential expression patterns, many of them related to the iron signalling pathway. Particular attention was given to *NdrG1*, expressed as early as 24 h after treatment, which can be regulated by iron and is involved with blocking of the cell cycle. A review of the literature shows that, similar to doxorubicin and aclarubicin, most of the drugs used to induce HbF present some kind of effect on the iron signalling pathway, activating in the cells the machinery necessary for the incorporation of extracellular iron. Considering these results, as well as the fact that in erythroid cells the synthesis of haemoglobin is of vital importance, we propose that the production of fetal haemoglobin in erythroid cells is highly dependent on the iron signalling pathway.

Introduction

Cell differentiation involves the regulation of expression of a great number of genes in response to external stimuli. Understanding the mechanisms responsible for this complex process is of great importance for several areas of research, such as cancer therapy and stem cell manipulation. Since in many cases primary cell culture is not easily established, permanent cell lines represent a very useful tool for these investigations.

The K562 cell line has been largely employed in the study of the mechanisms involved in erythroid differentiation. It was established from a patient with chronic myeloid leukemia, in which the Philadelphia chromosome [t(9;22)] is present [1]. The cells present considerable plasticity, differentiating into erythroid cells producing fetal haemoglobin (HbF) or into megakaryocytes with increased size and ploidy, besides specific surface markers, when treated with different chemical agents (reviewed in 2). K562 represent thus a very useful experimental model for the study of cancer differentiation therapy, or the treatment of neoplastic cells with agents inducing cell differentiation. This same methodology allows the investigation of mechanisms involved in the induction of haemoglobin expression, a process of fundamental importance for the treatment of thalassaemia and sickle cell disease.

Differentiation of K562 cells and the mechanisms proposed for the induction of fetal haemoglobin expression

Doxorubicin (DOX) and aclarubicin (ACLA), also known as adriamycin and aclacinimycin respectively, are among the chemical agents which induce the differentiation of K562 cells into erythroid cells producing HbF [3]. They are anthracyclines, which are included among the most effective anticancer drugs [4] even though the mechanisms

through which they operate are not fully understood. Similarly, the mechanisms of induction of fetal haemoglobin expression by these and several other compounds, although subject to intense research, are still unclear. Several studies have pointed to a relationship between expression of HbF and blocking of cell proliferation. Rapamycin, an inhibitor of the mTor protein, induces HbF expression along with the blockage of cell proliferation, in which the interaction FRAP/mTOR - a checkpoint in the control of protein synthesis - is affected [5]. Similar effects are observed when HbF synthesis is induced in K562 cells by many other compounds, such as cytosine arabinoside (Ara C), angelicin, resveratrol and cisplatin [2, 6, 7], suggesting that modifications in the expression of different genes and metabolic pathways have the same response. Thus, different targets can be elicited for the induction of fetal haemoglobin synthesis.

Since inhibitors of nitric oxide (NO) synthesis have also been shown to block the induction of HbF synthesis, an involvement of NO through the cAMP pathway in the expression of HbF after treatment with hydroxyurea or its structural analog zileuton has been proposed [8, 9]. The relationship between NO and Hb synthesis however remains controversial, since Inoue et al. [10] suggested that the induction of NO synthesis blocks Hb synthesis.

A role for the iron signalling pathway in the induction of haemoglobin synthesis

Haemoglobin is composed of a heme group (an iron-containing porphyrin) linked to the protein globin. In the serum, iron is transported by proteins known as transferrins (Tf). When a sign for iron need is received by a cell, it synthesizes a membrane receptor able to link to transferrin (TfR). The interaction Tf-TfR results in endocytosis of the transferrin-linked iron. When the endosomal pH raises, iron is released from Tf and transported by the protein Nramp1 to the cytoplasm, where it can link to heme or non-heme proteins, form

low molecular weight iron or be stored linked to ferritin (reviewed in 11) . It is probable that the protein mobilferrin is involved in the transfer of iron from Nramp1 to haemoglobin [12]. All the proteins involved in the process are post-transcriptionally regulated by iron regulatory proteins (IRPs), which link to iron regulated elements (IREs) consisting of hairpin-loop structures present in the mRNA coding for them [13]. The IRP-IRE interaction can be stimulated by several factors which signal the cell for the need to incorporate extracellular iron, including free radicals such as O_2^- , nitric oxide and iron itself [14].

The relationship anthracyclines-iron

In a series of experiments aiming at analyzing the genetic profile of cells induced to produce fetal haemoglobin, we treated K562 cells (obtained from Banco de Celulas do Rio de Janeiro, RJ, Brazil) with the anthracyclines doxorubicin and aclarubicin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Treatment was done in doses of 40 and 20 nM respectively, according to Morceau et al. [3], and resulted in increased HbF production (as measured by the benzidine method) and blocking of cell proliferation. Total RNA of treated and control cells was extracted on days 1, 3 and 7 after treatment and the pattern of gene expression was analyzed by differential display (DD-PCR). Several bands, representing potential genes expressed on the treated and/or control cells, showed differential expression profiles, particularly on samples collected on day 1. Sequencing of some of these bands allowed the identification of genes whose expression is dependent on the availability or concentration of intracellular iron, such as *Ndrp-1*. This gene has been shown to be activated by compounds with Ni^{2+} , through hypoxia, homocystein or iron chelators [15-17]. Particularly on account of these last two conditions, Park et al. [17] suggested that *Ndrp-1* expression is

directly, or indirectly, regulated by a protein containing a heme group. More recently, Le and Richardson [18] suggested that the hypoxia inducible factor 1- α [HIF 1- α] acts as an enhancer of *NdrG-1*, whose expression is detected as early as 3 hours after treatment.

Anthracyclines share a structure composed by four rings - A, B, C and D - which differ in the radicals linked to them. The main biological role of the drugs belonging to this family depends on a quinone on ring C. By gaining one electron, the ring becomes a semiquinone which, when returning to its original conformation, converts O_2 and H_2O into O_2^- and H_2O_2 respectively (reviewed in 19) . The cycle can also result in the linking of anthracyclines with iron in a 3:1 (drug:iron) complex which converts O_2^- and H_2O_2 into the even stronger hydroxyl radical [20].

Several studies have shown that anthracyclines can affect the iron signalling pathway. A general model [21] proposes that, in the absence of iron or when the aconitase cluster (4Fe-4S) is disrupted, oxygen increases the stability of binding between IRPs and IREs present in several mRNA molecules coding for proteins involved in the iron signalling pathway. The process can result, for instance, in the increase of TfR synthesis and decrease of ferritin synthesis simultaneously.

Chemical agents inducing haemoglobin synthesis in K562 cells and their relationship with iron signalling pathway

Due to the large number of compounds used to induce the differentiation of K562 cells into erythroid, HbF-producing cells, and the seemingly different targets on which these compounds act, there is no general model to explain how they operate. Although several pathways for haemoglobin induction have been proposed, few studies have approached the same pathways when different drugs are analyzed.

A general model can be proposed considering that, since haemoglobin production demands iron availability, when the iron signalling pathway is activated it will, as a bystander effect, induce also the expression of HbF. Reviewing the literature, we can observe that the different drugs used to induce HbF expression in K562 cells have a strict relationship with proteins that contain or are modulated by iron. Hydroxyurea, for instance, can interact with a tyrosyl radical of ribonucleotide reductase (RR) subunit R2. When this radical interacts with iron, R2 binding to the R1 subunit becomes stable and RR is activated, transforming ribonucleotides into dNTPs. When hydroxyurea binds to this radical, however, R1-R2 binding becomes unstable and the enzyme is inactivated [22]. Since other proteins are also regulated by the iron-tyrosyl interaction, it is possible that some of them also belong to the iron signalling pathway, so that their inactivation stimulates the cascade which leads to iron uptake.

In primary cultures of peripheral blood cells from acute myeloid leukemia patients, Ara C depletes the non-heme iron stimulating the IRP-IRE interaction [23]. Used in neuronal cells, resveratrol was shown to be able to increase the production of heme oxygenase 1 (HO-1), which degrades heme groups in Fe (II), CO and biliverdin/bilirubin. The degradation of heme groups may have a protective role in neuronal cells, since this group presents pro-oxidant activities which are toxic to this type of cell [24]. The same kind of degradation may be interpreted in erythroid cells as indicating the unavailability of iron, inducing the activation of the pathway signalling iron incorporation. This relationship between drugs and iron can be seen in many other compounds, such as cisplatin [25] and tellimagrandin [26].

These considerations thus point to a link between iron availability and induction of fetal haemoglobin expression. In K562 cells, anthracyclines and other HbF-inducing drugs

would block the cell cycle by mechanisms such as inhibition of the RR enzyme or induction of *Ndrp-1* expression. Simultaneously, several proteins involved in iron uptake would be upregulated and by a similar process, in the case of K562 cells which are erythroid-committed, HbF synthesis would be stimulated. Interestingly, it is known that iron deprivation promotes clinical improvement in sickle cell disease (SCD) patients (reviewed in 27) . We previously suggested that SCD is a chronic inflammatory condition [28]. Hydroxyurea treatment in SCD could thus be beneficial both by inducing HbF expression and by blocking cell proliferation, reducing the chronic inflammatory state.

Conclusion

These observations suggest a model in which the unavailability of iron in the cells, due to iron deprivation itself or to some other mechanism which simulates this situation [e.g., transformation of aconitase into an IRP by action of anthracyclines], activates two different mechanisms. On the one hand, cell proliferation is blocked, since iron has an important role in many of the processes needed for cell survival. On the other, the synthesis of proteins involved with iron uptake and with a heme group, or which interact with iron in the non heme form, is activated, so that the incoming iron is used before becoming part of the cell reservoir of ferritin-linked iron. As K562 cells have an erythroid origin, they present proteins which regulate haemoglobin synthesis, which are stimulated by a mechanism related to the iron signalling pathway. Any drug capable of delivering to the cell an “iron deprivation” signal, for whatever mechanism, would thus stimulate HbF synthesis. We thus propose that the iron signalling pathway should be considered as a potential target by any drug used to induce fetal haemoglobin synthesis.

References

- [1] Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975;45(3):321-34.
- [2] Tsiftoglou AS, Pappas IS, Vizirianakis IS. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther*. 2003;100(3):257-90.
- [3] Morceau F, Aries A, Lahlil R, et al. Evidence for distinct regulation processes in the aclacinomycin- and doxorubicin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells. *Biochem Pharmacol*. 1996;51(6):839-45.
- [4] Weiss RB. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?. *Semin Oncol*. 1992;19(6):670-86.
- [5] Mischiati C, Sereni A, Lampronti I, et al. Rapamycin-mediated induction of gamma-globin mRNA accumulation in human erythroid cells. *Br J Haematol*. 2004;126(4):612-21.
- [6] Rodrigue CM, Arous N, Bachir D, et al. Resveratrol, a natural dietary phytoalexin, possesses similar properties to hydroxyurea towards erythroid differentiation. *Br J Haematol*. 2001;113(2):500-7.
- [7] Lampronti I, Bianchi N, Borgatti M, Fibach E, Prus E, Gambari R. Accumulation of gamma-globin mRNA in human erythroid cells treated with angelicin. *Eur J Haematol*. 2003;71(3):189-95.
- [8] Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest*. 2003;111(2):231-9.

- [9] Haynes J Jr, Baliga BS, Obiako B, Ofori-Acquah S, Pace B. Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-arginine-nitric oxide signaling pathway. *Blood*. 2004;103(10):3945-50.
- [10] Inoue A, Kuroyanagi Y, Terui K, Moi P, Ikuta T. Negative regulation of gamma-globin gene expression by cyclic AMP-dependent pathway in erythroid cells. *Exp Hematol*. 2004;32(3):244-53.
- [11] Le NT, Richardson DR. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1603(1):31-46. Review.
- [12] Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, Heiman D. Mobilferrin is an intermediate in iron transport between transferrin and hemoglobin in K562 cells. *J Clin Invest*. 1996;98(6):1449-54.
- [13] Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta. Reviews on Biomembranes* 1997;1331(1):1-40.
- [14] Hentze MW, Kuhn LC. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(16):8175-82.
- [15] Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-responsive genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem*. 1996;271(47):29659-65.
- [16] Zhou D, Salnikow K, Costa M. Cap43, a novel gene specifically induced by Ni²⁺ compounds. *Cancer Res*. 1998;58(10):2182-9.

- [17] Park H, Adams MA, Lachat P, Bosman F, Pang SC, Graham CH. Hypoxia induces the expression of a 43-kDa protein (PROXY-1) in normal and malignant cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(1):321-8.
- [18] Le NT, Richardson DR. Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood.* 2004;104(9):2967-75.
- [19] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004;56(2):185-229.
- [20] Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol.* 1998;25(4 Suppl 10):10-4.
- [21] Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Joseph J, Kalyanaraman B. Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;277(19):17179-87.
- [22] Nyholm S, Thelander L, Graslund A. Reduction and loss of the iron center in the reaction of the small subunit of mouse ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochemistry.* 1993;32(43):11569-74.
- [23] Leardi A, Caraglia M, Selleri C, et al. Desferioxamine increases iron depletion and apoptosis induced by ara-C of human myeloid leukaemic cells. *Br J Haematol.* 1998;102(3):746-52.
- [24] Zhuang H, Kim YS, Koehler RC, Dore S. Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;993:276-86.

- [25] Mandal R, Kalke R, Li XF. Interaction of oxaliplatin, cisplatin, and carboplatin with hemoglobin and the resulting release of a heme group. *Chem Res Toxicol.* 2004;17(10):1391-7.
- [26] Leu E, Krieger-Liszkay A, Goussias C, Gross EM. Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. *Plant Physiol.* 2002;130(4):2011-8.
- [27] Koduri PR. Iron in sickle cell disease: a review why less is better. *Am J Hematol.* 2003;73(1):59-63.
- [28] Chies JA, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses.* 2001;57(1):46-50.

CAPÍTULO 5

**OPTIMIZATION OF AN ELECTROPORATION PROTOCOL USING K562 CELL
LINE AS A MODEL: ROLE OF CELL CYCLE PHASE AND CYTOPLASMIC
DNASES**

Andrés Delgado-Cañedo, Daniel Garcia dos Santos, José Artur Bogo Chies, Kátia

Kvitko, Nance Beyer Nardi

Artigo submetido a Journal of Biotechnology

Optimization of an electroporation protocol using K562 cell line as
a model: role of cell cycle phase and cytoplasmic DNAses.

Andrés Delgado-Cañedo, Daniel Garcia dos Santos, José Artur Bogo Chies,
Kátia Kvitko, Nance Beyer Nardi*

Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
Brazil

*Corresponding author:

Nance Beyer Nardi

Genetics Department, UFRGS

Av Bento Goncalves 9500

91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55-51-33166740

Fax: +55-51-33167311

E-mail: nardi@ufrgs.br

Abstract

The improvement of gene therapy protocols is intimately related to the establishment of efficient gene transfer methods. Electroporation is being largely employed *in vitro* and *in vivo* and much attention has been given to increasing its transfection potential. This method is based on the application of an electric field of short duration and high voltage to the cells forming reversible pores through which molecules can enter the cell. In this work, we describe the optimization of a protocol for the electroporation of K562 cells involving the combination of electric field, resistance and capacitance values. Using RPMI 1640 as pulsing buffer and 30 μg of pEGFP-N1 plasmid, 875 V cm^{-1} , 500 μF and infinite resistance, we achieved transfection rates of $82.41 \pm 3.03\%$, with $62.89 \pm 2.93\%$ cell viability, values higher than those reported in the literature. Analyzing cell cycle after electroporation, with three different electric field conditions, we demonstrated that in a heterogeneous population of cells, viability of G_1 cells is less affected by electroporation than that of cells in late S and G_2/M phases. We also show that using the DNase inhibitor Zn, immediately after the pulse, the efficiency of electroporation can be improved.

Keywords: electroporation, gene transfer, K562 cells, cell cycle, DNase inhibitors

1. Introduction

The improvement of gene therapy protocols is intimately related to the establishment of efficient gene transfer methods. Viral vectors have been shown to present great efficiency. Nonviral vectors, however, are safer so that great effort is dedicated to the development of methods to improve their efficiency.

Electroporation, or electropermeabilization, is one of the techniques employed for the transfer of nonviral vectors, being also used for the introduction of other molecules (different drugs, RNA or protein) into the target cells. The method is based on the application of an electric field of short duration and high voltage to the cells; when the electric pulse surpasses the membrane capacitance, its stability is affected and transient, reversible pores are formed through which molecules can enter the cell (reviewed in Gehl, 2003).

Although the method is being largely employed *in vitro* and *in vivo*, much attention has been given to increasing its transfection potential. Different parameters are analyzed, such as the conductivity and osmolarity of the electroporation buffer (Pucihar et al., 2001), the cell cycle stage in which the target cells are in the moment of electroporation (Takahashi et al., 1991; Golzio et al., 2002), or the effects of centrifugation immediately after the electric pulse is applied (Li et al., 1999). Particular care must be taken with the viability of the transfected cells, since parameters which increase transfection efficiency generally result in higher cell death rates.

The K562 cell line was established in 1975, from a patient with chronic myeloid leukemia (CML) in acute phase (Lozzio & Lozzio, 1975). This cell line is very useful for the study of the pathways involved in CML development as well as of erithroid differentiation and the patterns of globin gene expression, due to its capacity to produce embryo and fetal hemoglobin. It has been largely employed in the investigation of alternative treatments for talassemias and sickle cell disease, as well as the pathways involved in the development of CML (Park et al., 2001; Rodrigue et al., 2001; Haynes et al., 2004).

Most of the works using electroporation for the transfection of K562 cell do not aim at the improvement of the method itself, so that the protocols employed present great variation. The highest transfection efficiency described in the literature, with conventional electroporation methods, is 40% of transfected cells with 49% cell viability (Van Tendeloo

et al., 2001). A new methodology, called nucleofection, was recently described which results in high levels of transfection and low cell death indices ($74.7\pm 8.0\%$ and $5.4\pm 0.2\%$, respectively) (Schakowski et al., 2004). These results however are not reproducible using conventional approaches, since the buffer composition and the electric pulse conditions are not informed by the company which commercializes the technology.

In this work, we describe the optimization of a protocol for the electroporation of K562 cells, with better results than those previously described. The results are even superior to those obtained with nucleoporation, although with slightly lower cell viability. Our results also show that the cells most affected by electroporation are those in advanced cell cycle phase, and that Zn^{2+} can be used as an inhibitor of intracellular nucleases, increasing the efficiency of electroporation.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid

The plasmid pEGFP-N1 (Clontech Lab., Palo Alto, CA, USA) contains the sequence coding for the EGFP protein under the control of the human cytomegalovirus (CMV) promoter. It also presents a gene for kanamycin/neomycin resistance (kan^R/neo^R), regulated by the early promoter and enhancer from SV40 virus. The plasmid was extracted by alkaline lysis from competent *Escherichia coli*, DH5- α strain, selected with kanamycin, and purified with the Plasmid Maxi-Prep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Plasmid quantification was done by spectrophotometry.

2.2. Cells

The K562 (ATTC CCL 243) cell line was maintained in logarithmic growth in RPMI 1640 medium (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) complemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Cultilab) and 60 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin (Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The cells were cultured at 37°C in a humidified chamber with 5% CO_2 in air, and passaged 1:10 biweekly. For some of the experiments, medium was complemented with 80 μM ZnSO_4 (Reagen, Rio de Janeiro, Brazil), 1 mM EDTA or EGTA (Sigma, St. Louis, MO, USA).

2.3. Electroporation

The cells were suspended in RPMI 1640 without FCS or antibiotics, at a concentration of 10^7 cells ml^{-1} . A volume of 0.3 ml was transferred to sterile electroporation cuvette (Bio-Rad Gene Pulser cuvette, 0.4 cm), and kept at room temperature for 15 min in presence of different concentrations of pEGFP-N1 to analyze the efficiency of transfection, or $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ propidium iodide (PI) (Calbiochem, La Jolla, Ca, USA) to analyze the efficiency of electroporation. Electroporation was performed with a Bio-Rad Gene Pulser® Transfection Apparatus, in different conditions. Other types of pulsing buffer were also analyzed, which presented variations in osmolarity (O1, O2 and O3, Golzio et al., 1998) and conductivity (M1, M2 e M3, Pucihar et al., 2001), as well as combinations of phosphate buffered saline (PBS) with or without HEPES (Sigma) and/or sucrose (Reagen).

After the electric pulse the cells were treated according to the protocol suggested by Li et al. (1999). Briefly, the cells were centrifuged at 13,000 g for 30 s and maintained pelleted for 20 min. The electroporation medium was then removed and the pellet was suspended in 3 ml of RPMI 1640 with 10% FCS and gentamicin, transferred to 12-well culture plates (Corning Star, Acton, MA, USA) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . After 1 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 , viability was determined by Trypan blue exclusion and viable cells were isolated by centrifugation through Ficol-Paque™ PLUS (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Switzerland). The live cells were suspended in RPMI 1640 with 10% FCS at $5 - 7 \times 10^5$ cells ml^{-1} , and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 until analysis.

2.4. Efficiency of electroporation and transfection

Fluorescence of the cells was analyzed within the viable cell fraction, 24 and 48 h after electroporation, by examination in an inverted microscope (Axiovert 25 CFL), with filter set 9 (excitation: BP 450-490, beamsplitter: Ft 510, emission: LP515) and by flow cytometry, using a FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and the CellQuest software (Becton Dickinson). For analysis of transfection efficiency (expression of the EGFP gene), data were collected with the fluorescence peak of 20,000 pulses in FL1 (FL1H), logarithmically amplified, within a gate established in a FSC x SSC plot. Electroporation efficiency (presence of membrane pores, allowing entry of PI) was

analyzed by similar procedures but using the red-orange (FL2H) fluorescence detector. Negative control was represented by non electroporated K562 cells.

2.5. Cell cycle analysis

The method described by Overton and McCoy (1994) for the analysis of cell cycle was used, with slight modification. One hour after electroporation, around 5×10^5 live cells were pelleted and suspended in a solution containing 50 μg PI, 10 mM Trizma base (Sigma), 10 mM NaCl, 0.7 U RNase (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), and 0.01% NP-40 (USB, Switzerland). After 15 - 30 min, data was collected of width (FL2W) and area (FL2A) of 20,000 FL2 (red-orange) pulses, and analyzed with the ModFit software (Verity Software House, Topsham, ME). A sample of cells submitted to all steps except electroporation was used as negative control.

2.6. Statistics

All experiments were repeated at least three times in different days, and results are expressed as average \pm standard deviation of the results obtained in independent experiments. Statistical analysis was done with the Student's t test, and results were considered significantly different when $p < 0.01$.

3. Results

3.1. Optimization of electroporation conditions

Different electroporation conditions were tested, including variations in electric field (500, 625, 750, 875, 1000 and 1125 V cm^{-1}), resistance (100, 200, 400 ohms and infinite) and capacitance (250, 500 and 960 μF). In each reaction, 37.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of the pEGFP-N1 plasmid was used. The best results, represented by $71.39 \pm 4.61\%$ EGFP-positive cells, were obtained in the combination 875 V cm^{-1} , 500 μF and infinite resistance. Cell viability under these conditions was $65.22 \pm 3.89\%$, and the time constant was between 21.0 e 22.5 ms.

Having defined these conditions, we further tested different amounts of the plasmid. Electroporation was thus performed with 875 V cm^{-1} , 500 μF , ∞ ohms, with 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of the pEGFP-N1 plasmid. As shown in Table 1,

transfection efficiency was directly proportional to plasmid concentration. Viability was not significantly different, but a tendency for a decrease in cell viability with higher plasmid concentrations was observed. This analysis showed also two positive cell subpopulations, according to the fluorescence level, more easily seen when treatment was done with $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ plasmid (Fig. 1).

The use of other types of pulsing buffer did not result in higher transfection efficiency. Cell viability was greatly reduced in media O1, O2, O3, M1, M2 or M3 (<20%), hampering the recovery of viable cells through Ficoll-Paque centrifugation and posterior analysis by flow cytometry. The use of PBS resulted in high cell viability (85.67%) but low transfection efficiency (15.78%), a result not significantly affected by the addition of HEPES and/or glycosis (data not shown).

3.2. Analysis of cell cycle after electroporation

To evaluate the effect of electroporation on cells in different phases of the cell cycle, K562 cells were electroporated in RPMI 1640 medium without FCS or antibiotics (10^7 cells/ml), with $15 \mu\text{g PI/ml}$, using three different electric field conditions (875, 1000 or 1125 V cm^{-1}). Resistance was set on infinite and capacitance on $500 \mu\text{F}$. One hour later, cell viability was assessed by Trypan blue exclusion, viable cells were isolated as previously described and analyzed for PI staining and cell cycle. As shown in Table 2, whereas the electroporation efficiency was directly proportional to the electric field, cell viability was inversely proportional. Compared to the control samples, electroporated K562 cells presented higher frequencies of cells in the G_1 phase, and lower frequencies of S/ G_2/M cells. The effect is dose-related.

3.3. Effect of DNase inhibitors in the electroporation process

To test the effect of nuclease inhibitors on the electroporation process, K562 cells (10^7 cells ml^{-1}) were electroporated with $37.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ plasmid at 875 V cm^{-1} , $500 \mu\text{F}$ and infinite resistance, in the presence of $80 \mu\text{M ZnSO}_4$, 1 mM EDTA or 1 mM EGTA . Treatment was done in four different conditions: 15 min before electroporation and until analysis of cell viability (pre), 15 min before electroporation and continued until analysis of transfection efficiency 48 h later (pre/cont), immediately after electroporation and until analysis of cell viability (post) and post with maintenance of the reagents until analysis of

transfection efficiency 48 h later (post/cont). The transfection efficiency was evaluated 48 h after electroporation, analyzing the expression of EGFP by fluorescence microscopy and flow cytometry.

The results (Table 3) show that transfection is more efficient when ZnSO_4 is added after electroporation, independently of its maintenance until the moment of analysis. This result is not apparent when ZnSO_4 is added at the moment of electroporation. The Ca^{2+} chelator EGTA, on the other hand, did not affect the electroporation process, but cell viability decreased with the treatment. Treatment with EDTA, a Ca^{2+} and Mg^{2+} chelator, resulted in lower transfection efficiency and cell viability.

4. Discussion

This work describes the optimization of an electroporation protocol for K562 cells, involving the combination of electric field, resistance and capacitance values, combining standard electroporation processes with the post-pulse manipulation described by Li et al. (1999). The *egfp* reporter gene was used, and transfection rates of $82.41 \pm 3.03\%$ were reached with $62.89 \pm 2.93\%$ cell viability. These values are higher than those reported with standard electroporation protocols, of which the most efficient was described by Van Tendeloo et al. (2001) and resulted in 40% efficiency with 49% cell viability. The main differences presented by our protocol are the culture medium employed (RPMI 1640 *versus* X-vivo 15 medium) and the electroporation conditions (which in that study were electric field of 625 V cm^{-1} and capacitance of $1500 \mu\text{F}$). The transfection efficiency obtained in the present study is even higher than that reported with the new electrotransfer technology known as nucleoporation (Schakowski et al., 2004), which resulted in $74.7 \pm 8\%$ positive cells. Cell viability in the present study is also higher than that in the report by Van Tendeloo et al. (2001), but lower than the viability resulting in the study of Schakowski et al. (2004), which resulted in $5.4 \pm 0.2\%$ dead cells. A comparison of our protocol with the nucleoporation method is however difficult because the conditions of electric field, resistance and capacitance and the pulsing buffer composition are not described in the report.

The increase in transfection efficiency, followed by a decrease in cell viability, observed in higher electric field condition, during the optimization, has already been observed in other studies. In addition, our results show that among viable cells, isolated one hour after electroporation, viability of G₁ cells is less affected by electroporation than that of cells in late S and G₂/M phases. Similar results were reported by Golzio et al. (2002), but in that study purified cell populations were analyzed in G₁, S or G₂/M. This correlation between increased mortality among cells in the late phases of the cycle can be explained by the same formula which explains the correlation between increase in the electric field intensity and electroporation efficiency. According to this formula, $\Delta V_m = fE_{\text{ext}} r \cos\Phi$, electroporation begins when ΔV_m exceeds the resting membrane potential (V_m), which has similar magnitude (around 1 V) in several cell types. In the formula, f is a factor which most authors describe as 1.5, E_{ext} is the electric field used during electroporation, r represents the cell radius and Φ is the polar angle with respect to the external electric field; for spherical cells this value is zero (Pucihar et al., 2001; Gehl, 2003). The voltage which will exceed the resting membrane potential of a spherical cell will thus be:

$$E_{\text{ext}} > 1V (1.5r \cos 0)^{-1} = 1V \times 1.5r^{-1}$$

For K562 cells, which have a 20 μm radius (Koeffler and Golde 1980), E_{ext} is thus 1 V $(1.5 \times 20 \mu\text{m})^{-1}$ or 330 V cm^{-1} . As the cell doubles its volume at late S/G₂ phases, its radius becomes 26% larger (according to the trigonometrical properties of spheres), so that for efficient electroporation the electric field must be higher than 1 V $(1.5 \times 25.2 \mu\text{m})^{-1} = 260 \text{ V cm}^{-1}$. This represents a 70 V cm^{-1} difference in the electric field necessary to exceed the membrane resting potential in G₁ or G₂ cells. In other words, submitted to the electric field necessary for generating a change in the potential of a G₁ cell, the G₂ cell would have a $\Delta V_m = 330 \text{ V cm}^{-1} \times 1.5 \times 0.00252 \text{ cm} = 1.247 \text{ V}$, which is almost 25% higher. Treatment of G₂ cells with the electroporation conditions which represent the optimum for G₁ cells would thus produce irreversible membrane lesions, and as a consequence the number of live G₁ cells after electroporation would be proportionally higher. This situation emphasizes the importance of using homogeneous populations for transfection, and suggests that the increased efficiency observed when cells are electroporated in the S (Takahashi et al., 1991) or G₂/M (Goldstein et al., 1989; Golzio et al., 2002) phases is due

to the adjustment of the electric field intensity which is applied, rather than to an intrinsic advantage of the cell cycle phase in which the cells are.

Although G₁ cells seem to have been less affected, the results suggest that they are efficiently transfected, since only 3 to 5 days after electroporation normal cell proliferation was observed (unpublished results). Although the study by Golzio et al. (2002) focused on the increased efficiency of transfection of G₂/M cells, transfection of G₁ cells was also observed. Dean (1997) showed that G₁ cells can be transfected, as long as the plasmid used presents a nuclear localization sequence (NLS). Plasmids containing the region of SV40 virus genome which includes the replication origin, early-late promoter and enhancer, were shown to be able to enter the nucleus of G₁ cells; the most potent NLS in the sequence is the 72 bp repetition which forms the enhancer (Dean *et al.*, 1999). This particular sequence is present in the plasmid used in the present work, as well as in the plasmid pEGFP-C1 used by Golzio et al. (2002). These observations suggest that the presence of this sequence is important in any vector used for gene transfer, particularly when the target cells of the transfection process are in G_{0/1} as happens in *in vivo* electroporation processes, as proposed by Blomberg et al. (2002).

The low proliferation rates observed after electroporation could be due to degradation of the plasmids by cytoplasmic nucleases. In this case, nucleotides derived from plasmid degradation would be incorporated in the cell dNTP pool (Lechardeur et al., 1999; Bureau et al., 2004). Depending on the plasmid sequence, this incorporation can cause an imbalance in the dNTP pool, which results in blockage of the cell cycle and/or cell death due to errors on DNA replication or DNA repair (Kunz and Kohalmi, 1991).

Nucleases are responsible for plasmid degradation before their entry into the nucleus (Lechardeur et al., 1999; Bureau et al., 2004). To test the impact of this phenomenon on the results of transfection, we tested the effect of three reagents able to inhibit nucleases. EDTA, a chelator of Ca²⁺ and Mg²⁺ (necessary for the enzymatic activity of DNases) decreased electroporation efficiency and resulted in lower cell viability. Neumann et al. (1996) suggested that Ca²⁺ and Mg²⁺ are important for electroporation due to their interaction with the plasmid DNA, decreasing its negative charge and facilitating its interaction with the cell membrane. The results of post-pulse treatment in the present work, similar to those of pre-pulse treatment, suggest however that in electroporation these ions are more important for intra-cellular processes such as the transport of the plasmid

through the nuclear pores. Our results with EGTA, used in a concentration able to chelate double of the Ca^{2+} present in RPMI 1640 medium, did not affect transfection efficiency. Cell viability was also not affected, showing that Ca^{2+} does not influence cell viability during electroporation as already proposed (Gehl, 2003). The use of ZnSO_4 , on the other hand, induced significant increase in transfection efficiency, so that 15 μg plasmid in the presence of ZnSO_4 had results similar to those obtained with 30 μg without the compound. These results emphasize the positive role of Zn^{2+} , which is known to directly block DNase activity (Mastrangeli et al., 1994). The effect was more visible when ZnSO_4 was used after the electric pulse, suggesting a possible interference of this reagent during the pulse.

It is possible that the use of more potent DNase inhibitors, such as the auritricarbozyllic acid or its combination with Zn^{2+} can further increase the efficiency of transfection through electroporation, similar to the effect described on the transfection of salivary glands when naked DNA was used (Niedzinski et al., 2003). Finally, it is important to stress that in the present study the possibility of gene transfer mediated by Zn^{2+} is excluded by the fact that no significant differences were observed between the post (40 min exposure) and the post/cont (48 h exposure) Zn^{2+} treatments.

This work thus show that modifications of the protocol for electroporation of K562 cells result in higher efficiency as compared to conventional methods. The cells most affected by electroporation were shown to be in advanced cell cycle phase, and the use of Zn^{2+} , inhibiting intracellular nucleases, increases the efficiency of electroporation.

Acknowledgments

The authors would like to thank M.Sc. Leonardo A. Karan Teixeira and Dr. Guido Lenz for helpful discussion and Dr. Arnaldo Zaha, Dr. Henrique B. Ferreira and their staff for gently sharing with us the Gene Pulser Transfection Apparatus. This research was funded by grants from Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul and Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico, Brazil.

References

- Blomberg, P., Eskandarpour, M., Xia, S., Sylvén, C., Islam, K.B., 2002. Electroporation in combination with a plasmid vector containing SV40 enhancer elements results in increased and persistent gene expression in mouse muscle. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 298, 505-510.
- Bureau, M.F., Naimi, S., Torero Ibad, R., Seguin, J., Georger, C., Arnould, E., Maton, L., Blanche, F., Delaere, P., Scherman, D., 2004. Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1676, 138-148.
- Dean, D.A., 1997. Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp. Cell Res.* 230, 293-302.
- Dean, D.A., Dean, B.S., Muller, S., Smith, L.C., 1999. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp. Cell Res.* 253, 713-722.
- Gehl, J., 2003. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.* 177, 437-447.
- Goldstein, S., Fordis, C.M., Howard, B.H., 1989. Enhanced transfection efficiency and improved cell survival after electroporation of G2/M-synchronized cells and treatment with sodium butyrate. *Nucleic Acids Res.* 17, 3959-3971.
- Golzio, M., Mora, M.P., Raynaud, C., Delteil, C., Teissie, J., Rols, M.P., 1998. Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* 74, 3015-3022.
- Golzio, M., Teissie, J., Rols, M.P., 2002. Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field. *Biochim. Biophys. Acta.* 1563, 23-28.
- Haynes, J. Jr, Baliga, B.S., Obiako, B., Ofori-Acquah, S., Pace, B., 2004. Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-arginine-nitric oxide signaling pathway. *Blood.* 103, 3945-3950.
- Koeffler, H.P. and Golde, D.W., 1980. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood.* 56, 344-350.
- Kunz, B.A. and Kohalmi, S.E., 1991. Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels. *Annu. Rev. Genet.* 25, 339-359.

- Lechardeur, D., Sohn, K.J., Haardt, M., Joshi, P.B., Monck, M., Graham, R.W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodovich, H., Lukacs, G.L., 1999. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* 6, 482-497.
- Li, L.H., Ross, P., Hui, S.W., 1999. Improving electrotransfection efficiency by post-pulse centrifugation. *Gene Ther.* 6, 364-372.
- Lozzio, C.B. and Lozzio, B.B., 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood.* 45, 321-334.
- Mastrangeli, A., O'Connell, B., Aladib, W., Fox, P.C., Baum, B.J., Crystal, R.G., 1994. Direct in vivo adenovirus-mediated gene transfer to salivary glands. *Am. J. Physiol.* 266, G1146-1155.
- Neumann, E., Kakorin, S., Tsoneva, I., Nikolova, B., Tomov, T., 1996. Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. *Biophys. J.* 71, 868-877.
- Niedzinski, E.J., Chen, Y.J., Olson, D.C., Parker, E.A., Park, H., Udove, J.A., Scollay, R., McMahon, B.M., Bennett, M.J., 2003. Enhanced systemic transgene expression after nonviral salivary gland transfection using a novel endonuclease inhibitor/DNA formulation. *Gene Ther.* 10, 2133-2138.
- Overton, W.R. and McCoy, J.P. Jr., 1994. Reversing the effect of formalin on the binding of propidium iodide to DNA. *Cytometry.* 16, 351-356.
- Park, J.I., Choi, H.S., Jeong, J.S., Han, J.Y., Kim, I.H., 2001. Involvement of p38 kinase in hydroxyurea-induced differentiation of K562. *Cell Growth Differ.* 12, 481-486.
- Pucihar, G., Kotnik, T., Kanduser, M., Miklavcic, D., 2001. The influence of medium conductivity on electroporation and survival of cells in vitro. *Bioelectrochemistry.* 54, 107-115.
- Rodrigue, C.M., Arous, N., Bachir, D., Smith-Ravin, J., Romeo, P.H., Galacteros, F., Garel, M.C., 2001. Resveratrol, a natural dietary phytoalexin, possesses similar properties to hydroxyurea towards erythroid differentiation. *Br. J. Haematol.* 113, 500-507.
- Schakowski, F., Buttgereit, P., Mazur, M., Marten, A., Schottker, B., Gorschluter, M., Schmidt-Wolf, I.G.H., 2004. Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines. *Genet. Vaccines Ther.* 2, 1.

- Takahashi, M., Furukawa, T., Nikkuni, K., Aoki, A., Nomoto, N., Koike, T., Moriyama, Y., Shinada, S., Shibata, A., 1991. Efficient introduction of a gene into hematopoietic cells in S-phase by electroporation. *Exp. Hematol.* 19, 343-346.
- Van Tendeloo, V.F., Ponsaerts, P., Lardon, F., Nijs, G., Lenjou, M., Van Broeckhoven, C., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., 2001. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood.* 98, 49-56.

Table 1

Efficiency of different plasmid concentrations on electroporation efficiency. Cell viability (% viable cells) was assessed by Trypan blue exclusion and transfection efficiency (% EGFP-positive cells) by flow cytometry.

Plasmid concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Cell viability (%)	Electroporation efficiency (%)
Control	>99	-
25	66.23 \pm 2.51	45.25 \pm 3.81
50	64.06 \pm 3.82	71.08 \pm 2.16
75	62.89 \pm 2.93	82.41 \pm 3.03

Table 2

Effect of electroporation on cells in different phases of the cell cycle. Cell viability (% viable cells) was assessed by Trypan blue exclusion; cell cycle phase (% cells in each stage) and transfection efficiency (% EGFP-positive cells) were assessed by flow cytometry.

Electric field	Cell viability (%)	Cell cycle phase (%)			Electroporation efficiency (%)
		G ₁	S	G ₂ /M	
Control	>99	36.4	55.5	8.0	-
875 V	65.22 \pm 1.89	42.9 \pm 0.62%	53.0 \pm 1.04	4.1 \pm 0.88	71.39 \pm 4.61
1000 V	40.51 \pm 0.83	45.0 \pm 0.89%	50.1 \pm 0.46	4.9 \pm 1.21	78.09 \pm 3.77
1125 V	27.08 \pm 1.46	48.4 \pm 1.21%	46.0 \pm 0.96	5.6 \pm 2.53	89.30 \pm 2.56

Table 3

Cell viability (% viable cells) assessed by Trypan blue exclusion 1 h after medium change, and transfection efficiency (% EGFP-positive cells) analyzed by flow cytometry after electroporation done in presence of ZnSO₄, EGTA or EDTA.

Treatment	Cell viability (%)	Transfection efficiency (%)
None	69.62±1.89	63.36±2.19
ZnSO ₄ pre	46.29±3.89	66.30±1.25
ZnSO ₄ pre/cont		66.42±1.89
ZnSO ₄ post	62.79±2.03	75.97±2.36
ZnSO ₄ post/cont		74.70±1.90
EGTA pre	41.70±2.28	60.21±1.71
EGTA pre/cont		62.45±0.86
EGTA post	59.39±1.25	62.90±3.22
EGTA post/cont		61.27±0.73
EDTA pre	21.65±3.02	16.75±3.08
EDTA pre/cont		17.29±2.44
EDTA post	27.97±2.92	38.21±2.18
EDTA post/cont		36.89±1.50

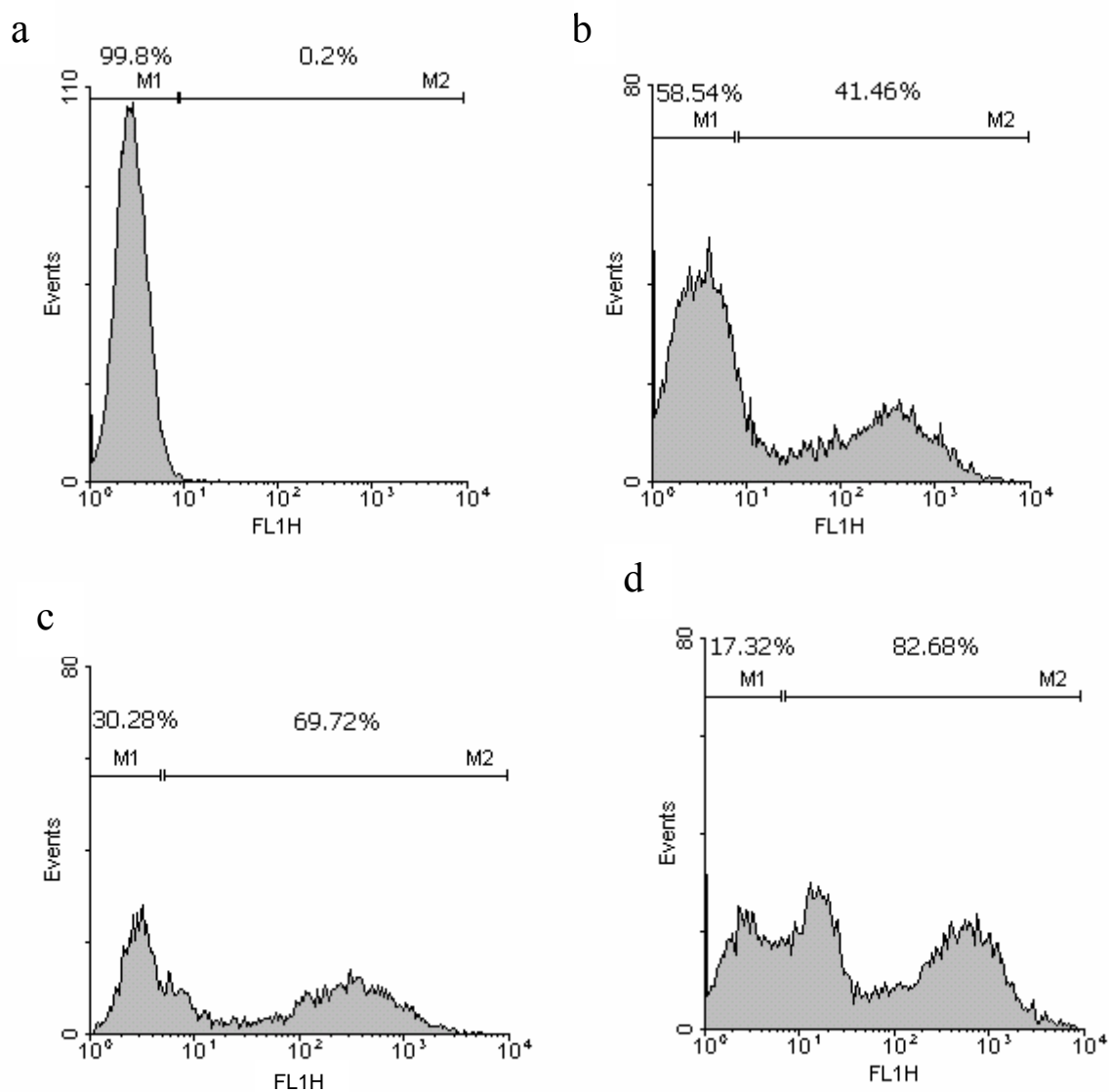


Fig. 1. Electroporation of K562 cells with increasing plasmid concentration results in an increase in the frequency of EGFP-positive cells. (a) negative control – electroporation without plasmid; (b) 25 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$; (c) 50 $\mu\text{g } \text{ml}^{-1}$; (d) 75 $\mu\text{g } \text{ml}^{-1}$ of plasmid pEGFP-N1.

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO

Segundo as estatísticas da *American Cancer Society* (http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0.asp) as leucemias compreendem atualmente 2,53% dos casos de câncer relatados, sendo que 27,95% das leucemias correspondem a leucemia mielóide crônica (LMC). Embora a principal causa da LMC seja conhecida há 45 anos. Os mecanismos celulares afetados pela translocação *bcr-abl* para transformar células hematopoiéticas normais em células leucêmicas não são conhecidos completamente, sendo propostos diferentes modelos.

Um fato importante durante a etiologia da leucemia mielóide crônica Ph⁺ é a alta frequência de células portadoras da translocação que, *in vivo*, se diferenciam em células eritróides. O mesmo foi mostrado *in vitro* pela transformação de células normais em células leucêmicas com um vetor que codificava a proteína híbrida Bcr-Abl (Chalandon *et al.*, 2002). Por outro lado, foi observado *in vivo*, em um estudo envolvendo 430 pacientes, que a anemia ocorre em 68% deles (Savage *et al.*, 1997). Isto indica uma grande influência da proteína Bcr-Abl sobre a diferenciação eritróide, estimulando as células precursoras a serem direcionadas para a linhagem eritróide, mas ao mesmo tempo dificultando as células eritróides precursoras de se diferenciarem em hemácias maduras. Portanto, a leucemia mielóide crônica pode ser utilizada como modelo para o estudo da diferenciação final das células eritróides ou para estudar características próprias desta linhagem, como por exemplo os mecanismos que levam à síntese de hemoglobina, seja ela fetal ou adulta.

Várias linhagens celulares eritroleucêmicas foram obtidas de pacientes com LMC, e outras tantas derivadas a partir destas (revisadas em Drexler *et al.*, 2004). A linhagem celular de LMC mais utilizada é a K562, obtida a partir de um paciente na fase blástica desta doença (Lozzio e Lozzio, 1975). Esta linhagem é amplamente utilizada como modelo para estudar tanto drogas com capacidade anti-proliferativa, que possam ser usadas no tratamento desta doença, quanto para estudar mecanismos que levam à indução da síntese de hemoglobina, para serem utilizadas no tratamento da anemia falciforme e talassemia. Com estes objetivos foram testadas diversas drogas (revisado por Tsiftoglou *et al.*, 2003) e algumas destas, como é o caso da hidroxiuréia (HU), são utilizadas terapêuticamente (revisado em Navarra e Preziosi, 1999).

Neste trabalho, analisamos o padrão de expressão gênica de células da linhagem K562 tratadas com as antraciclinas doxorubicina (DOX) e aclarrubicina (ACLA) através da técnica de *differential display*, a qual foi estabelecida no nosso laboratório durante o

presente trabalho. Além da expressão gênica, também foram avaliadas as mudanças morfológicas e do ciclo celular. Como foi mostrado em outras linhagens, com algumas exceções, o tratamento com DOX provocou um aumento no tamanho celular acompanhado pelo bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M, que pode ser observado a partir do primeiro dia de tratamento. Já o tratamento com ACLA não induziu grandes diferenças nas células. Entretanto, um bloqueio do ciclo celular na fase G₁ foi observado até o terceiro dia de tratamento. Durante os primeiros três dias de tratamento, também foi observada uma leve diminuição do tamanho das células, que pode estar relacionada ao alto número de células em G₁ com tamanho normal. Outra diferença observada entre os dois tratamentos foi a proliferação celular, a qual foi muito baixa nas células tratadas com DOX, mas somente um pouco reduzida durante o tratamento com ACLA como já foi mostrado por outros autores (Nyoung *et al.*, 1994). A ação das drogas também foi diferente quanto à capacidade de induzir a síntese de hemoglobina e ao poder citotóxico. No sexto dia de tratamento, DOX induziu a síntese de hemoglobina em quase o dobro de células quando comparada com a indução por ACLA. Quanto ao efeito citotóxico, este começou a ser evidente a partir do terceiro dia de tratamento, sendo maior para DOX (75% de células mortas no sétimo dia de tratamento) que para ACLA (15% de células mortas no máximo).

Assim como com relação à biologia celular, diferenças e semelhanças nos padrões de expressão gênica, analisadas pela técnica de *differential display*, foram observadas nas células tratadas com estas duas antraciclinas. A execução desta técnica de genômica funcional nos permitiu obter 110 bandas, representando potenciais genes diferencialmente expressos, das quais 80 puderam ser re-amplificadas e diretamente sequenciadas, usando como primers os oligonucleotídeos poli(T) usados para sintetizar cada cDNA (HT₁₁A, HT₁₁G e HT₁₁C). Deste modo, foram obtidas 26 sequências com qualidade para serem analisadas. Estas 26 sequências pertencem às 51 bandas re-amplificadas com os primers HT₁₁G e HT₁₁C, sendo que as 26 bandas restantes não puderam ser analisadas pois o produto de sequenciamento mostrou mais de uma fita molde (em 6 destas bandas) ou a má qualidade não permitiu a análise (20 bandas), embora a análise em gel de agarose mostrasse uma banda única e com quantidades recomendadas para sequenciamento. Nestes casos, clonagem ou eletroforese em gel de agarose mais concentrado e purificação deverão ser feitas para solucionar o problema. Um fato importante foi observado com as bandas re-amplificadas e sequenciadas com o primer HT₁₁A, onde os esferogramas mostraram picos

baixos com aparente presença de várias fitas molde. Devido ao fato de que a banda mostrada no gel de agarose aparecia como única e a concentração de produto usada no sequenciamento era a recomendada, acredita-se que isto pode ter acontecido pela instabilidade 3' deste primer que, já na re-amplificação, poderia ter originado bandas com poucas bases de diferença devido ao anelamento em diferentes pontos da cauda poli(A) dos mensageiros reversamente transcritos. Este inconveniente poderá ser superado usando-se o primer randômico que as gerou, quando o sequenciamento destas amostras seja refeito.

Levando-se em conta as 110 bandas diferencialmente representadas e extraídas do gel, podem ser observadas várias diferenças na cinética de expressão dos genes diferencialmente expressos. Estas variações podem ser resumidas como segue.

- indução de expressão nas células tratadas, em nível independente ou dependente do tempo de tratamento;
- interrupção da expressão induzida pelo tratamento;
- aumento do nível de expressão nos primeiros dias de tratamento (neste estudo em 24 h, mas não temos os dados em 48 h) para depois voltar aos níveis iniciais (a partir do terceiro dia de tratamento);

Estas variações podem ocorrer em comum no tratamento com ACLA ou DOX, ou serem exclusivas de um ou de outro.

Estas diferentes cinéticas de expressão também foram descritas na análise, através de *microarray*, da indução da expressão de hemoglobina com hemina (Addya *et al.*, 2004). Das 25 sequências identificadas até agora no nosso trabalho, aquela correspondente à NADH desidrogenase (ubiquinona) 1, mostrou-se também diferencialmente expressa no trabalho realizado por Addya *et al.* (2004). Este mesmo resultado, em análise por *differential display*, foi observado quando células K562 foram tratadas com butirato de sódio, uma droga que atua como inibidor da desacetilase de histonas (Plonczynski *et al.*, 1999). Além de NADH desidrogenase (ubiquinona) 1, nossos resultados reforçam os dados de Plonczynski *et al.* com relação à expressão diferencial de *ndrg1*. Lamentavelmente, o fato de que o nome oficial dos genes não foi empregado nos dois trabalhos de genômica funcional citados acima dificultou a relação com o presente trabalho; provavelmente existam ainda outros genes com comportamento similar que não foram relacionados por terem nomenclaturas diferentes. Entretanto, mesmo com resultados parciais, podemos ver a via de sinalização que induz a expressão da NAD(P)H desidrogenase como um mecanismo

comum na indução da síntese de hemoglobina fetal nestes três tratamentos com drogas diferentes.

A coincidência da expressão diferencial do gene *ndrg1* (a primeira sequência obtida no nosso trabalho) nas células K562 tratadas com antraciclinas ou com butirato de sódio nos levou a buscar informações a respeito dos mecanismos que induzem a sua expressão. Entre os indutores podem ser citados a hipóxia e quelantes de ferro (Park *et al.*, 2000), níquel (Zhou *et al.*, 1998) ou homocisteína (Kokame *et al.*, 1996).

Sendo o ferro um alvo das antraciclinas (as quais podem atuar como um quelante do mesmo), procuramos na literatura dados que correlacionem o ferro com as drogas utilizadas para induzir a síntese de hemoglobina em células K562 e também com os genes diferencialmente expressos durante o presente trabalho. A informação obtida nesta relação nos permitiu propor uma hipótese na qual as drogas usadas para induzir a síntese de hemoglobina fetal afetam a via de sinalização do ferro em algum ponto. Isto indicaria à célula a falta de ferro, e seria um estímulo para ativar a maquinaria celular que aumenta a quantidade de ferro intracelular, como também outras para que a célula não seja prejudicada por uma falta transitória deste elemento. Isto pode ser o motivo pelo qual a expressão do receptor de transferrina, a principal via de incorporação do ferro extracelular, é aumentada durante a indução da síntese de hemoglobina com drogas como butirato de sódio (Kawasaki *et al.*, 1998), 5-azacitidina (Viola *et al.*, 1987) e DOX (Kotamraju *et al.*, 2002) entre outras. Assim, sendo K562 uma linhagem com características eritróides, e sendo o ferro um componente chave na síntese de hemoglobina, a maquinaria celular para a síntese de hemoglobina fetal também poderia ser ativada.

Entre os genes diferencialmente expressos durante o tratamento das células K562 com ACLA ou DOX, cinco apresentam possível interação deles com mecanismos relacionados com o ferro: *nfe2l2*, *ndufc2*, *hspc051*, *ndrg1* e *atp6ip1*. O gene *nfe2l2* foi relacionado recentemente com ferro. Ratos *knock-out* para este gene apresentam o esmalte dentário de cor branco-cinza ao invés de marrom-amarelado dos ratos normais, fato devido a um distúrbio na deposição de ferro durante a formação do esmalte (Yanagawa *et al.*, 2004). Tanto a enzima NADH desidrogenase (*ndufc2*) quanto a ubiquinol-citocromo c redutase (*hspc051*) são componentes da cadeia respiratória e, como a maioria deles, possuem 2 grupos Rieske (2Fe:2S) (Ohnishi *et al.*, 1981; Merbitz-Zahradnik *et al.*, 2003). Neste caso, a falta de ferro disponível impediria a síntese destas proteínas, interrompendo

os processos respiratórios; consequentemente, as células sofreriam uma diminuição na produção de ATP que indicaria à célula que mais destas proteínas devem ser sintetizadas. É possível que, quando os genes ainda não analisados forem sequenciados, sejam encontrados outros, envolvidos com a cadeia respiratória, apresentando expressão diferencial. Como citado anteriormente, a transcrição do gene *ndrg1* pode ser estimulada pela falta ou não disponibilidade de ferro (Park *et al.*, 2000). A ATPase lisossomal (*atp6ip1*) é uma proteína transmembrana que transporta H^+ para o interior dos endossomos acidificando o seu conteúdo (Forgac, 1999), sabendo-se que esta diminuição no pH endossomal é necessária para a dissociação entre o ferro e o seu transportador extracelular, a transferrina (revisado por Le e Richardson, 2002). Sendo assim, é provável que esta proteína seja regulada pela mesma via do receptor de transferrina.

Os genes restantes apresentam nenhuma ou pouca informação funcional por serem genes recentemente identificados ou pouco estudados e portanto não foram encontradas outras relações com ferro. Sendo o óxido nítrico (NO) uma molécula envolvida em vários processos celulares e que modifica a proteína aconitase interferindo na via de sinalização do ferro (revisado por Cooper, 1999), foi buscada uma possível relação entre esta molécula e os genes *ugcu*, *mcts-1*, *rfc1* e *hnrpa2b1*, não encontrando-se nenhuma publicação onde a relação destes genes com NO possa ser conhecida ou inferida. Entretanto, outras relações com o efeito das antraciclinas podem ser encontradas. A glicosilação de ceramida catalisada pelo produto do gene *ugcg* oferece resistência às células contra xenobióticos como a antraciclina daunorubicina (DNR) (Come *et al.*, 1999) e portanto é possível que xenobióticos como ACLA e DOX estimulem a sua expressão como um mecanismo de defesa contra eles. O gene *mcts-1*, um oncogene também conhecido como *mct1*, regula o *checkpoint* existente entre G_1 e S, e a sua expressão diminui o tempo de passagem das células durante a fase G_1 e entrada na fase S (Herbert *et al.*, 2001). Este poderia ser um dos motivos pelo qual as células tratadas não puderam ser bloqueadas estavelmente na fase G_1 . Entretanto, o seu efeito estaria indo contra o efeito anti-proliferativo de *ndrg1*. Sendo assim, a expressão de *mcts-1* teria que ser estimulada por algum efeito das antraciclinas independentemente do efeito na via de sinalização do ferro, embora a sua expressão diferencial ainda deva ser validada. O gene *rfc1* codifica uma das 5 subunidade de uma proteína acessória da DNA polimerase que está envolvida em reparo de DNA e é ativada por danos no DNA (Pennaneach *et al.*, 2001), fato que acontece durante o tratamento com

antraciclina e é um dos principais mecanismos de ação destas drogas através do mecanismo inibidor das topoisomerasas. O único caso onde não foi encontrada relação com ferro, grupo heme, NO, leucemias ou com os diferentes mecanismos de ação propostos para as antraciclina foi a proteína hnRNP A2/B1 codificada por *hnrpa2b1*, que está envolvida no processamento de transcritos primários no núcleo (Hutchison *et al.*, 2002).

Mesmo sendo dados parciais, estes mostram o poder da técnica de *differential display* na análise do padrão de expressão gênica, ressaltando suas vantagens quanto à capacidade de detectar expressão diferencial de genes pouco conhecidos, genes parciais (conhecidos como genes em potencial apenas pela existência de ESTs que os representam), genes hipotéticos e também genes desconhecidos, como pode ser o caso das bandas 1C-8, 2G-7 e 8G-3. Entre as desvantagens da metodologia, pode ser citada a dificuldade de detectar genes expressos em baixo número de cópias, mas que poderia ser suplementada pela utilização de outras técnicas de genômica funcional como *microarray* ou bibliotecas substrativas de cDNA.

Por serem resultados preliminares, uma quantidade maior de sequenciamentos deverão ser feitos para se poder visualizar melhor o perfil de expressão gênica dos dois tratamentos. Porém este trabalho é o começo de vários outros que deverão ser feitos para se entender o mecanismo de ação destas drogas na capacidade anti-proliferativa e indutora da síntese de hemoglobina fetal.

Com objetivo de validar alguns destes genes como diferencialmente expressos, foram sintetizados 7 pares de oligonucleotídeos para amplificá-los por RT-PCR e assim conhecer os seus padrões de expressão durante o tratamento com ACLA e DOX. Os genes escolhidos foram: *mapk1* devido ao fato de que vários processos celulares são dependentes da sua atividade quinase; *nfe2l1*, por estar relacionado com *nfe2* o qual foi analisado por Morceau *et al.* (1996) mostrando diferença na sua expressão durante o tratamento com DOX ou com ACLA; *atp6ip1* e *ndrg1* pelo seu comprometimento com ferro; *rcfs1* por ser indicador de dano celular; e *phf20* e *zkscan1* por serem fatores de transcrição de função desconhecida que podem ser bons modelos para futuros trabalhos.

A análise mostrou um aumento na expressão de todos os genes, entre os quais se destaca o *ndrg1* que não é expresso nas células K562 e é induzido quando do tratamento com ACLA e DOX. Uma exceção é o gene *nfe2l2*, onde diferenças no padrão de

expressão, quando comparadas com o controle, foram baixas impedindo de validar a sua expressão diferencial.

Visando a busca de um mecanismo comum para explicar a indução da síntese de hemoglobina, células K562 foram submetidas a outros dois indutores de síntese de hemoglobina, hidroxiuréia (HU) e dGTP, e a mesma abordagem experimental foi realizada (com exceção do *differential display*). HU é uma droga com poder anti-proliferativo e indutora da síntese de hemoglobina fetal amplamente usada no tratamento de pacientes com anemia falciforme e leucemias (revisados por Navarra e Preziosi, 1999). Um dos principais mecanismos de ação propostos para a droga é a inibição da enzima nucleotídeo redutase, bloqueando o ciclo celular na fase S. Este evento foi observado durante os nossos experimentos, permitindo confirmar o seu funcionamento. Outro mecanismo proposto como mecanismo de ação da HU é a função doadora de NO desta molécula, onde o NO seria um indutor da síntese de HbF (Cokic *et al.*, 2003). No entanto, outros autores propuseram anteriormente um papel inibidor do NO sobre a síntese de HbF (Chénais *et al.*, 1999).

A capacidade de indução da síntese de hemoglobina por dGTP foi demonstrado por Osti *et al.* (1997), que mostraram também o mesmo efeito durante o tratamento com outras moléculas derivadas de guanina. O mecanismo pelos quais estas moléculas atuam, entretanto, são ainda desconhecidos. Nossas análises mostraram que este indutor compartilha características com a HU, como o aumento do tamanho celular com bloqueio do ciclo celular na fase S a partir do primeiro dia de tratamento, sugerindo mecanismos comuns de ação.

A análise da expressão dos genes *mapk1*, *nfel2l*, *atp6ip1*, *ndrg1*, *rcfs1*, *phf20* e *zkscan1* por RT-PCR durante o tratamento das células K562 com HU e dGTP mostrou os mesmos comportamentos observados durante o tratamento com ACLA e DOX. Pode-se assim propor os genes *mapk1*, *atp6ip1*, *ndrg1*, *rcfs1*, *phf20* e *zkscan1* como genes cuja expressão é induzida por indutores da síntese de hemoglobina. No entanto, outros indutores deverão ser testados para confirmar estes genes dentro de um mecanismo comum durante a indução da síntese de hemoglobina.

Para estudar posteriormente o efeito destes genes, tanto no bloqueio ou diminuição da capacidade proliferativa das células da linhagem K562 e outras linhagens quanto na síntese de hemoglobina, a transferência destes genes ou de algum RNAi que iniba a sua

tradução será necessária. Anteriormente, o nosso grupo estabeleceu com sucesso a transferência gênica em células da linhagem K562 mediada por dendrímeros catiônicos obtendo altas eficiências de transfecção (Teixeira *et al.*, 2001). Entretanto, a repetitividade de altas frequências de transfecção é variável e os parâmetros envolvidos nesta variação ainda continuam pouco entendidos. Uma alternativa a este inconveniente seria o uso da eletroporação, uma técnica de transferência gênica onde a maioria dos parâmetros podem ser controlados e, portanto, a repetitividade das frequências de transfecção é alta. Devido à frequência de transfecção não superior a 50% obtida pelos protocolos atuais de eletroporação, com exceção do novo *nucleoporator*, foram realizados vários testes com o objetivo de otimizar estes protocolos. Para tal, testamos várias condições de campo elétrico, resistência, capacitância, tampão de eletroporação, manipulação da amostra e inibidores de DNase durante a transferência do plasmídeo pEGFP-N1 que codifica a proteína verde fluorescente (EGFP). Durante estes testes foi visto que a grande variação na eficiência de transfecção era proporcionada pelas variáveis do eletroporador (campo elétrico, resistência e capacitância) as quais dependiam por sua vez das condições do meio de eletroporação. Assim, a utilização do meio RPMI1640, como tampão de eletroporação, sem soro nem antibiótico mostrou os melhores resultados nas diferentes combinações de campo elétrico, resistência e capacitância usadas e conseguimos uma eficiência de transfecção de 81,68% quando as condições eram 875 V/cm, resistência infinita e 500 μ F respectivamente.

A utilização da centrifugação e formação de precipitado pós-eletroporação proposta por Li *et al.* (1999) permitiram uma máxima recuperação das células após a eletroporação. A contagem das células obtidas 20 minutos após a eletroporação, momento no qual o tampão de eletroporação era trocado por meio com soro e antibiótico para manter as células em cultura, foi maior quando a centrifugação foi aplicada, 70% vs. 48% do número de células iniciais pré-eletroporação (dados não apresentados no artigo de eletroporação). Embora esta diferença seja significativa, não vimos a mesma diferença entre as duas alternativas quando a mortalidade celular foi analisada por exclusão de azul tripan. Uma alternativa para explicar isto seria a existência de lise celular na amostra não centrifugada, a qual não é detectada pela técnica usada para quantificar a viabilidade. Contudo, a diferença na recuperação celular já é um ótimo motivo para o uso desta alternativa de manipulação pós-pulso.

O uso de inibidores de DNase, durante o pulso ou imediatamente posterior a este, foi baseado na observação de que células quiescentes como as musculares podem ser transformadas por sistemas não virais por possuírem um sistema que protege das DNases citoplasmáticas parte do DNA internalizado (Bureau *et al.*, 2004), mas não por células da linhagem HeLa ou COS que não possuem este sistema e nas quais portanto os plasmídeos são degradados (Lechardeur *et al.*, 1999). Assim, se a inibição das DNases pudesse ser aplicada às células eletroporadas, a eficiência da transferência gênica poderia ser aumentada. Durante o presente trabalho foram utilizados três inibidores da atividade das DNases. Dois deles são amplamente usados como quelantes de Ca^{2+} e Mg^{2+} , moléculas necessárias para a atividade destas enzimas: EDTA é um quelante das duas moléculas e EGTA somente quela a primeira delas. O terceiro inibidor usado foi sulfato de zinco. O zinco como inibidor de DNase foi utilizado para realizar a transformação de células de glândula salivar com DNA nú, alcançando-se um grande aumento na eficiência de transformação (Niedzinski *et al.*, 2003).

Entre as três moléculas utilizadas, a única que mostrou uma melhora na eficiência de eletroporação, sem afetar a viabilidade celular, foi o sulfato de zinco, o que pode ter acontecido porque o Ca^{2+} e principalmente o Mg^{2+} são moléculas necessárias para a atividade de muitas enzimas-chave na viabilidade celular. Com respeito à maior frequência de transfecção obtida no tratamento pós-pulso com sulfato de zinco, quando comparada com aquela do tratamento pré-pulso, só pode-se inferir uma interferência do zinco ou do enxofre no meio de eletroporação, pois a entrada deste na célula é igual nos dois tipos de tratamento, já que os poros formados durante o pulso ficam abertos por pelo menos 2 minutos, tempo durante o qual há uma livre difusão de sais entre o meio intra e extra-celular.

O estudo da interação entre voltagem, tamanho celular, viabilidade e eficiência de transfecção mostrou que quanto maior a voltagem do pulso usada mais células são transfectadas, mas simultaneamente, maior é a porcentagem de morte celular. A análise do ciclo celular imediatamente após o pulso mostrou que, quanto maior era a morte celular, maior ficava a porcentagem de células na fase G_1 .

Segundo a fórmula:

$$\Delta V_m = fE_{\text{ext}} r \cos\Phi$$

a eletroporação é alcançada quando ΔV_m ultrapassa o potencial da membrana em repouso (V_m), valor semelhante em vários tipos celulares e estimado em aproximadamente 1 V. Na fórmula, f é um fator que a maioria dos autores citam como sendo 1,5; E_{ext} é o campo elétrico utilizado durante a eletroporação; r representa o raio da célula e Φ é o ângulo do raio maior da célula com respeito aos eletrodos; para células com morfologia esférica este valor é 0 (Pucihar *et al.*, 2001; Gehl, 2003). Portanto, a voltagem necessária para superar o potencial da membrana em repouso de uma célula hipoteticamente esférica será:

$$E_{ext} > 1V / (1.5 \times r \times \cos 0) = 1V / 1,5r$$

Assim, quanto maior é o tamanho celular menor é o campo elétrico necessário para eletroporá-la. Desta forma, tendo em conta as diferenças de tamanho entre as células durante o ciclo celular, podemos pensar que possivelmente nas condições ótimas de eletroporação das células em G1 as células em G2 poderiam ser muito afetadas, produzindo poros irreversíveis que levariam à morte celular, resultando em maior número de células em fase G1 após eletroporação que antes da aplicação do pulso elétrico. Entretanto, todas as células seriam suscetíveis ao efeito citotóxico causado, talvez, pela eletroporação. Esta hipótese mostra também a importância de se ter uma população homogênea no momento da eletroporação e ao mesmo tempo sugere que o aumento da eficiência da eletroporação quando as células eletroporadas se encontram sincronizadas na fase S (Takahashi *et al.*, 1991) ou na fase G₂/M (Goldstein *et al.*, 1989; Golzio *et al.*, 2002) pode ser devido à intensidade do campo elétrico aplicado, em vez de vantagens, *per se*, relacionadas à fase do ciclo celular em que elas se encontram.

Portanto, podemos concluir que embora a síntese de hemoglobina, como também o efeito anti-proliferativo, em células da linhagem K562 possa ser induzida por drogas com mecanismos de ação aparentemente diferentes, deve existir uma via de sinalização comum que seja afetada, direta ou indiretamente, por todas elas. Os genes *mapk1*, *atp6ip1*, *ndrg1*, *rcfs1*, *phf20* e *zkscanl*, cuja expressão foi aumentada durante o tratamento com aclarrubina, doxorrubicin, hidroxiuréia e dGTP, mostram-se como alvos importantes para próximos estudos, envolvendo outros indutores, que visem esta meta.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addya S, Keller MA, Delgrosso K, Ponte CM, Vadigepalli R, Gonye GE and Surrey S (2004) Erythroid-induced commitment of K562 cells results in clusters of differentially expressed genes enriched for specific transcription regulatory elements. *Physiol Genomics* 19:117-130.
- Afar DEH, Goga A, McLaughlin J, Witte ON and Sawyers CL (1994) Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc. *Science* 264:424-426.
- Amarante-Mendes GP, Kim CN, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR and Bhalla K (1998) Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood* 91:1700-1705.
- Amos TAS, Lewis JL, Grand FH, Gooding RP, Goldman JM and Gordon MY (1995) Apoptosis in chronic myeloid-leukemia - normal responses by progenitor cells to growth-factor deprivation, X-irradiation and glucocorticoids. *Br J Haematol* 91:387-393.
- Barrett J (2003) Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 40:59-71.
- Bedi A, Barber JP, Bedi GC, Eldeiry WS, Sidransky D, Vala MS, Akhtar AJ, Hilton J and Jones RJ (1995) Bcr-Abl-mediated inhibition of apoptosis with delay of g2/m transition after dna-damage - a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 86:1148-1158.
- Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ and Jones RJ (1994) Inhibition of apoptosis by Bcr-Abl in chronic myeloid-leukemia. *Blood* 83:2038-2044.
- Bertheau P, Plassa F, Espie M, Turpin E, de Roquancourt A, Marty M, Lerebours F, Beuzard Y, Janin A, de The H (2002) Effect of mutated TP53 on response of advanced breast cancers to high-dose chemotherapy. *Lancet* 360:852-854.
- Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A, Rossi C, Goso C, Maggi CA, Capranico G and Animati F (2001) Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 1:113-130.
- Boguski MS and McCornick F (1993) Proteins regulating RAS and its relatives. *Nature* 366:643-646.

- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ and Lydon NB (1996) Inhibition of the abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 56:100-104.
- Bureau MF, Naimi S, Torero Ibad R, Seguin J, Georger C, Arnould E, Maton L, Blanche F, Delaere P and Scherman D (2004) Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation. *Biochim Biophys Acta* 1676:138-148.
- Carter A, Dann EJ, Katz T, Shechter Y, Oliven A, Regev R, Eytan E, Rowe JM and Eytan GD (2001) Cells from chronic myelogenous leukaemia patients at presentation exhibit multidrug resistance not mediated by either MDR1 or MRP1. *Br J Haematol* 114:581-90.
- Chalandon Y, Jiang XY, Hazlewood G, Loutet S, Conneally E, Eaves A and Eaves C (2002) Modulation of p210(BCR-ABL) activity in transduced primary human hematopoietic cells controls lineage programming. *Blood* 99:3197-3204.
- Chénais B, Molle I and Jeannesson P (1999) Inhibitory effect of nitric oxide on chemically induced differentiation of human leukemic K562 cells. *Biochem Pharmacol* 58:773-778.
- Chung SW and Wong MC (1995) The biology of abl during hematopoietic stem cell differentiation and development. *Oncogene* 10:1261-1268.
- Cline FJ (1994) The molecular basis of leukaemia. *N Engl J Med* 330: 328-335.
- Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, Schechter AN (2003) Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest* 111:231-239.
- Collins S, Coleman H and Groudine M (1987) Expression of bcr and bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol* 7:2870-2876.
- Come MG, Bettaieb A, Skladanowski A, Larsen AK and Laurent G (1999) Alteration of the daunorubicin-triggered sphingomyelin-ceramide pathway and apoptosis in MDR cells: Influence of drug transport abnormalities. *Int J Cancer* 81:580-587.
- Cooper CE (1999) Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics* 1411:290-309.
- Cordero EA, Da Rocha Silla LM, Canedo AD, Allebrandt WF, Fogliatto L and Nardi NB (2004) Interaction Between Normal and CML Hematopoietic Progenitors and Stroma Influences Abnormal Hematopoietic Development. *Stem Cells Dev* 13:225-228.

- Dabich L, Bull FE, Beltran G, Athens JW, Coltman CA, Weick JK, Vanslyck EJ and Amare M (1986) Phase-II evaluation of aclarubicin in refractory adult acute-leukemia - a southwest-oncology-group study. *Cancer Treat Rep* 70:967-969.
- Diekmann D, Brill S, Garret MD, Totty N, Hsuan J, Montefries C, Hall C, Klein L and Hall A (1991) BCR encodes a GTPase activating protein for p21^{rac}. *Nature* 351:400-402.
- Drexler HG, Matsuo Y and MacLeod RAF (2004) Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of erythroleukemia. *Leuk Res* 28:1243-1251.
- Druker BJ and Lydon NB (2000) Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 105:3-7.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J and Lydon NB (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2:561-566.
- Dunkern TR, Wedemeyer I, Baumgartner M, Fritz G and Kaina B (2003) Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA REPAIR* 2:49-60.
- Durig J, Testa NG, Lord BI, Kasper C, Chang J, Telford N, Dexter TM and Heyworth CM (1999) Characterisation of the differential response of normal and CML haemopoietic progenitor cells to macrophage inflammatory protein-1 alpha. *LEUKEMIA* 13:2012-2022.
- Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD and Sklar J (1991) TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66: 649-661.
- Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, Lai JL, Pignon JM, Loucheuxlefebvre MH, Bauters F, Berger R and Kerckaert JP (1991) P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 78:1652-1657.
- Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC and Greaves M (1993) In utero rearrangements in the tritorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* 363: 358-360.
- Forgac M (1999) Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem* 274:2951-12954.
- Ganesan TS, Rassool F and Guo AP (1986) Rearrangement of the bcr gene in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloid leukemia. *Blood* 68: 957-960.

- Gariboldi MB, Ravizza R, Riganti L, Meschini S, Calcabrini A, Marra M, Arancia G, Dolfini E and Monti E (2003) Molecular determinants of intrinsic resistance to doxorubicin in human cancer cell lines *Int J Oncol* 22:1057-1064.
- Gehl J (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 177:437-447.
- Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727-741.
- Goldstein S, Fordis CM and Howard BH (1989) Enhanced transfection efficiency and improved cell survival after electroporation of G2/M-synchronized cells and treatment with sodium butyrate. *Nucleic Acids Res* 17:3959-3971.
- Golzio M, Teissie J and Rols MP (2002) Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field. *Biochim Biophys Acta* 1563:23-28.
- Gorre ME, Ellwood-Yen K, Chiosis G, Rosen N, Sawyers CL (2002) BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. *Blood* 15;100(8):3041-4.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, Deklein A, Bartram CR and Grosveld G (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36: 93-99.
- Guano F, Pourquier P, Tinelli S, Binaschi M, Bigioni M, Animati F, Manzini S, Zunino F, Kohlhagen G, Pommier Y, Capranico G (1999) Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Mol Pharmacol* 56:77-84.
- Hariharan IK and Adams JM (1987) cDNA sequence for human bcr, the gene that translocates to the abl oncogene in chronic myeloid leukemia. *EMBO J* 6:15-119.
- Hart MJ, Eva T, Aaronson SA and Cerione RA (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the DBL oncogene product. *Nature* 354:311.
- He YP, Wertheim JA, Xu LW, Miller JP, Karnell FG, Choi JK, Ren RB and Pear WS (2002) The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl. *Blood* 99:2957-2968.

- Heim S, Billstrom R, Kristoffersson U, Mandahl N, Strombeck Band Mitelman F (1985) Variant Ph translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 18:215-227.
- Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, Klein A and Grosveld G (1985) Structural organization of the bcr gene its role in the Ph¹ translocation. *Nature* 315:758-761.
- Herbert GB, Shi B and Gartenhaus RB (2001) Expression and stabilization of the MCT-1 protein by DNA damaging agents. *Oncogene* 20:6777-6783.
- Hoover RR, Mahon FX, Melo JV and Daley GQ (2002) Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood* 100:1068-1071.
- Hutchison S, LeBel C, Blanchette M and Chabot B (2002) Distinct sets of adjacent heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1/A2 binding sites control 5' splice site selection in the hnRNP A1 mRNA precursor. *J Biol Chem* 277:29745-29752.
- Inoue A, Narumi K, Matsubara N, Sugawara S, Saijo Y, Satoh K and Nukiwa T (2000) Administration of wild-type p53 adenoviral vector synergistically enhances the cytotoxicity of anti-cancer drugs in human lung cancer cells irrespective of the status of p53 gene. *Cancer Lett* 157:105-112.
- Jonuleit T, van der Kuip H, Miething C, Michels H, Hallek M, Duyster J and Aulitzky WE (2000) Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood* 96:1933-1939.
- Kabarowski JHS, Allen PB and Wiedemann LM (1994) A temperature-sensitive P210 Bcr-Abl mutant defines the primary consequences of Bcr-Abl tyrosine kinase expression In growth-factor dependent cells. *EMBO J* 13:5887-5895.
- Kawasaki N, Morimoto K and Hayakawa T (1998) Control of hemoglobin synthesis in erythroid differentiating K562 cells - II. Studies of iron mobilization in erythroid cells by high-performance liquid chromatography electrochemical detection. *J Chromatogr B* 705:193-201.
- Kelliher M, Knott A, Mclaughlin J, Witte ON and Rosenberg N (1991) Differences in oncogene potency but not target cell specificity distinguish the forms of the BCR/ABL oncogene. *Cell Mol Biol* 11:4710-4716.

- Kokame K, Kato H and Miyata T (1996) Homocysteine-responsive genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis - GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* 271:29659-29665.
- Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Joseph J and Kalyanaraman B (2002) Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells - Role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis *J Biol Chem* 277:17179-17187.
- Lage H, Helmbach H, Dietel M and Schadendorf D (2000) Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *Br J Cancer* 82:488-491.
- Le NTV and Richardson DR (2002) The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta-reviews on cancer* 1603:31-46.
- Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, Beatty B, Squire J, O'Brodovich H and Lukacs GL (1999) Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 6:482-497.
- Levitzi A and Gazit A (1995) Tyrosine kinase inhibition - an approach to drug development. *Science* 267:1782-1788.
- Li LH, Ross P and Hui SW (1999) Improving electrotransfection efficiency by post-pulse centrifugation. *Gene Ther*. 6:364-372.
- Lothstein L, Israel M and Sweatman TW (2001) Anthracycline drug targeting: cytoplasmic versus nuclear - a fork in the road. *Drug Resist Updat* 4:169-177.
- Lozzio CB and Lozzio BB (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood* 45:321-334.
- Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ and Witte ON (1990) Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247:1079-1082.
- Marais R, Light Y, Paterson HF and Marshall CJ (1995) Ras recruits Raf-1 to the plasma-membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 14 (13): 3136-3145.
- Maru Y and Witte ON (1991) The bcr gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* 67:459-468.
- Mayer IA, Verma A, Grumbach IM, Uddin S, Lekmine F, Ravandi F, Majchrzak B, Fujita S, Fish EN and Plataniias LC (2001) The p38 MAPK pathway mediates the growth

inhibitory effects of interferon-alpha in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem* 276:28570-28577.

- McWhiter JR and Wang JYJ (1993) An actin-binding function contributes to transformation by the BCR-ABL oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemia. *EMBO Journal* 12: 1533-1546.
- Menssen A and Hermeking H (2002) Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: Identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6274-6279.
- Merbitz-Zahradnik T, Zwicker K, Nett JH, Link TA and Trumpower BL (2003) Elimination of the disulfide bridge in the Rieske iron-sulfur protein allows assembly of the [2Fe-2S] cluster into the Rieske protein but damages the ubiquinol oxidation site in the cytochrome bc(1) complex. *Biochemistry* 42:13637-13645.
- Metcalf D (1988) *The Molecular Control of Blood Cells*. Harvard University Press – England.
- Mills KI, Sproul AM, Leibowitz D and Burnett AK (1991) Mapping of breakpoints and relationship to BCR-ABL RNA expression, in Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with a breakpoint around exon 14 (b3) or BCR gene. *Leukemia* 5:937-941.
- Monica K, Lebrun P, Dederda DA, Brown R and Cleary ML (1994) Transforming properties of the E2a-Pbx1 chimeric oncoprotein: fusion with E2a is essential, but the Pbx homeodomain is dispensable. *Cell Mol Biol* 14: 8304-8314.
- Morceau F, Aries A, Lahlil R, Devy L, Jardillier JC, Jeannesson P and Trentesaux C (1996) Evidence for distinct regulation processes in the aclacinomycin- and doxorubicin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells. *Biochem Pharmacol* 51:839-45.
- Morgan GJ, Hernandez A, Chan LC, Martiat T and Wiedmann LM (1990) The role of alternative splicing patterns of BCR/ABL transcripts in the generation of blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol* 76: 33-38.
- Mow BMF, Chandra J, Svingen PA, Hallgren CG, Weisberg E, Kottke TJ, Narayanan VL, Litzow MR, Griffin JD, Sausville EA, Tefferi A and Kaufmann SH (2002) Effects of the Bcr/abl kinase inhibitors STI571 and adaphostin (NSC 680410) on chronic myelogenous leukemia cells in vitro. *Blood* 99:664-671.

- Myers CE (1998) The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Seminars Oncol* 25:10-14.
- Nakamura K, Miyashita T, Ozaki M and Iwaya M (1991) Molecular studies of chronic myelogenous leukemia using the polymerase chain reaction. *Cancer* 68: 2426-2430.
- Natale RB, Cody RL, Simon MS and Wheeler RH (1993) An invivo and invitro trial of aclarubicin in metastatic breast-cancer - a novel-approach to the study of analogs. *Cancer Chemother Pharmacol* 31:485-488.
- Navarra P and Preziosi P (1999) Hydroxyurea: new insights on an old drug. *Crit Rev Oncol Hematol* 29:249-255.
- Niedzinski EJ, Chen YJ, Olson DC, Parker EA, Park H, Udove JA, Scollay R, McMahon BM and Bennett MJ (2003) Enhanced systemic transgene expression after nonviral salivary gland transfection using a novel endonuclease inhibitor/DNA formulation. *Gene Ther* 10:2133-2138.
- Nowell PC and Hungerford DA (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132:1497 (abstract).
- Nyoung MN, Trentesaux C, Aries A, Carpentier Y, Jardillier JC, Gorisse MC and Jeannesson P (1994) Effect of aclacinomycin-doxorubicin association on differentiation and growth of human erythroleukemic K562 cells. *Anticancer Res* 14:1203-1208.
- Ogawa M (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81:2844-2853.
- Ohnishi T, Blum H, Galante YM and Hatefi Y (1981) Iron-sulfur N-1 clusters studied in NADH-ubiquinone oxidoreductase and in soluble NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* 256:9216-9220.
- Okuda K, D'Andrea A, Van Etten RA and Griffin JD (1998) The c-terminus of c-ABL is required for proliferation and viability signaling in a c-ABL erythropoietin receptor fusion protein. *Blood* 92:3848-3856.
- Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG and Griffin JD (2001) ARG tyrosine kinase activity is inhibited by ST1571. *Blood* 97:2440-2448.
- Osti F, Corradini FG, Hanau S, Matteuzzi M and Gambari R (1997) Human leukemia k562 cells: induction to erythroid differentiation by guanine, guanosine and guanine nucleotides. *Haematologica* 82:395-401.

- Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, Meloni G, Saglio G, Salvatore F and Rotoli B (1996) Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with c3/a2 junction). *Blood* 88:2410-2414.
- Park H, Adams MA, Lachat P, Bosman F, Pang SC and Graham CH (2000) Hypoxia induces the expression of a 43-kDa protein (PROXY-1) in normal and malignant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 276:321-8.
- Penault-Llorca F, Cayre A, Mishellany FB, Amat S, Feillel V, Le Bouedec G, Ferriere JP, De Latour M and Chollet P (2003) Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. *Int J Oncol* 22:1319-1325.
- Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Manu Y and Witte ON (1991) BCR sequences essential for transformation by the BCR/ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* 66: 161-171.
- Pennaneach V, Salles-Passador I, Munshi A, Brickner H, Regazzoni K, Dick F, Dyson N, Chen TT, Wang JYJ, Fotedar R and Fotedar A (2001) The large subunit of replication factor C promotes cell survival after DNA damage in an LxCxE motif- and Rb-dependent manner. *Mol Cell* 7:715-727.
- Perego P, Corna E, De Cesare M, Gatti L, Polizzi D, Pratesi G, Supino R and Zunino F (2001) Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines. *Curr Med Chem* 8:31-37.
- Plonczynski M, Hardy CL, Safaya S, Harrell A, Mccoy L, Brinson A, Agwarangbo L and Steinberg MH (1999) Induction of globin synthesis in K562 cells is associated with differential expression of transcription factor genes. *Blood Cells Mol Dis* 25:156-165.
- Pucihar G, Kotnik T, Kanduser M and Miklavcic D (2001) The influence of medium conductivity on electropermeabilization and survival of cells in vitro. *Bioelectrochemistry*. 54:107-115.
- Puil L, Liu JX, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, Arlinghaus R and Pawson T (1994) BCR-ABL oncoproteins bind directly to activators of the ras signaling pathway. *EMBO J* 13:764-773.
- Rabbitts TH (1994) Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372: 143-149.

- Rowley JD (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290-293.
- Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Cano E, Redondo JM and Lopez-Rivas A (2003) Characterization of p53-mediated up-regulation of CD95 gene expression upon genotoxic treatment in human breast tumor cells. *J Biol Chem* 278:31667-31675.
- Sánchez-García I (1997) Consequences of chromosomal abnormalities in tumor development. *Annu Rev Genet* 31:429-453.
- Sanchez-Garcia I and Martin-Zanca D (1997) Regulation of Bcl-2 gene expression by Bcr-Abl is mediated by Ras. *J Mol Biol* 267:225-228.
- Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, Gesbert F, Iwasaki H, Li SG, Van Etten RA, Gu HH, Griffin JD, Neel BG (2002) Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 1:479-492.
- Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, Xu G, Li JL, Prasad KV and Griffin JD (1996) The proto-oncogene product p120(CBL) and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190(BCR/ABL) and p210(BCR/ABL) to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* 12:839-846.
- Savage DG, Szydlo RM and Goldman JM (1997) Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol* 96:111-116.
- Sawyers CL, Mclaulhin J, Goga A, Havlik M and Witte ON (1994) The nuclear tyrosine kinase c-abl negatively regulates cell growth. *Cell* 77:121-131.
- Sawyers CL (1997) Molecular genetics of acute leukaemia. *Lancet* 349: 196-200.
- Sawyers CL (1999) Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 340:1330-1340.
- Shima EA, Lebeau MM, McKeithan TW, Minowada J, Showe LC, Mak TW, Minden MD, Rowley JD and Diaz MO (1986) Gene encoding the α chain of the T-cell receptor is moved immediately downstream of c-myc in a chromosomal 8;14 translocation in a cell line from a human T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3439-3443.
- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP and Canaani E (1985) Fused transcripts of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 315: 500-554.

- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Rae BA and Canaani E (1986) Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene. *Cell* 47:277-284.
- Smith V (2003) Chronic leukaemia – characteristics and treatment. *Hospital Pharmacist* 10:110-116.
- Stearns V, Singh B, Tsangaris T, Crawford JG, Novielli A, Ellis MJ, Isaacs C, Pennanen M, Tibery C, Farhad A, Slack R and Hayes DF (2003) A prospective randomized pilot study to evaluate predictors of response in serial core biopsies to single agent neoadjuvant doxorubicin or paclitaxel for patients with locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 9:124-133.
- Takahashi M, Furukawa T, Nikkuni K, Aoki A, Nomoto N, Koike T, Moriyama Y, Shinada S and Shibata A (1991) Efficient introduction of a gene into hematopoietic cells in S-phase by electroporation. *Exp Hematol* 19:343-346.
- Tanabe T, Kuwabara T, Warashina M, Tani K, Taira K and Asano S (2000) Oncogene inactivation in a mouse model - Tissue invasion by leukaemic cells is stalled by loading them with a designer ribozyme. *Nature* 406:473-474.
- Teixeira LAK, Fricke CH, Bonorino CB, Bogo MR and Nardi NB (2001) An efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors. *J Biotechnol* 88:159-165.
- Traxler P, Bold G, Buchdunger E, Caravatti G, Furet P, Manley P, O'Reilly T, Wood J and Zimmermann J (2001) Tyrosine kinase inhibitors: From rational design to clinical trials. *MEDICINAL RESEARCH REVIEWS* 21:499-512.
- Tsiftoglou AS, Pappas IS and Vizirianakis IS (2003) Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther* 100:257-290.
- Tsujimoto Y, Gorham I, Cossman J, Jaffe E and Croce CM (1985) The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistake in VDJ joining. *Science* 229:1390-1393.
- Uemura N, Salgia R, Ewaniuk DS, Little MT and Griffin JD (1999) Involvement of the adapter protein CRKL in integrin-mediated adhesion. *Oncogene* 18:3343-3353.
- Van Etten RA, Jackson P and Baltimore D (1989) The mouse type IV *c-abl* gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmatic localization. *Cell* 58: 669-678.

- Van Rhee F, Hochaus A, Lin F, Melo JV, Goldman JM and Cross NCP (1996) p190 BCR/ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 87: 5213-5217.
- VasquezVivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BSS, Pritchard KA and Kalyanaraman B (1997) Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin *Biochemistry* 36:11293-11297.
- Verfaillie CM, Hurley R, Lundell BI, Zhao CH and Bhatia R (1997) Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: Do BCR/ABL-induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors? *Acta Haematol* 97:40-52.
- Vigneri P and Wang JYJ (2001) Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med* 7:228-234.
- Viola L, Biagini R, Barbieri R, Gambari R. Inhibition of hemoglobin accumulation by monoclonal antibodies to the human transferrin receptor is reversed by hemin. *Exp Hematol.* 1987 Dec;15(11):1145-52.
- Voncken JW, Vanschaick H and Kaartine V (1995) Increased neutrophil respiratory burst in BCR-null mutants. *Cell* 80: 719-728.
- Weiss RB (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?. *Semin Oncol.* 19:670-686.
- Wen ST, Jackson PK and VanEtten RA (1996) The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J* 15:1583-1595.
- Wilda M, Fuchs U, Wossmann W and Borkhardt A (2002) Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 21:5716-5724.
- Xie SH, Wang Y, Liu JX, Sun T, Wilson MB, Smithgall TE and Arlinghaus RB (2001) Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene* 20:6188-6195.
- Yanagawa T, Itoh K, Uwayama J, Shibata Y, Yamaguchi A, Sano T, Ishii T, Yoshida H, Yamamoto M. (2004) Nrf2 deficiency causes tooth decolorization due to iron transport disorder in enamel organ. *Genes Cells* 9:641-51.

- Zeleznik-Le NJ, Nucifora G, Rowley JD. The molecular biology of myeloproliferative disorders as revealed by chromosomal abnormalities. *Semin Hematol.* 1995 Jul;32(3):201-19.
- Zhang W, Kornblau SM, Kobayashi T, Gambel A, Claxton D, Deisseroth AB (1995) High levels of constitutive WAF1/Cip1 protein are associated with chemoresistance in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 1:1051-1057.
- Zhou DJ, Salnikow K and Costa M (1998) Cap43, a novel gene specifically induced by Ni²⁺ compounds. *Cancer Res* 58:2182-2189.
- Zunino F, Pratesi G, Perego P (2001) Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs. *Biochem Pharmacol* 61:933-938.