



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS SÃO GABRIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BRUNA TORRES

**A CITOTOXICIDADE DO CLORETO DE COBALTO (CoCl_2) EM CÉLULAS
LEUCÊMICAS É CÉLULA DEPENDENTE: ESTUDO DOS MECANISMOS
ENVOLVIDOS NESTE PROCESSO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SÃO GABRIEL

2015

BRUNA TORRES

**A CITOTOXICIDADE DO CLORETO DE COBALTO (CoCl_2) EM CÉLULAS
LEUCÊMICAS É CÉLULA DEPENDENTE: ESTUDO DOS MECANISMOS
ENVOLVIDOS NESTE PROCESSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

SÃO GABRIEL

2015

TORRES, Bruna

A citotoxicidade do cloreto de cobalto (CoCl_2) em células leucêmicas é célula dependente: estudo dos mecanismos envolvidos neste processo. / Bruna Torres.

55 pág. 11 ilustrações

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pampa, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo.

1. CoCl_2 . 2. Células neoplásicas. 3. Potencial Antiproliferativo.
4. NF- κ B.

BRUNA TORRES

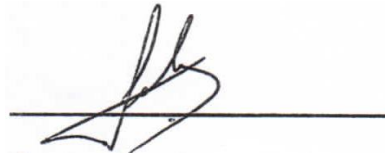
**A CITOTOXICIDADE DO CLORETO DE COBALTO (CoCl₂) EM CÉLULAS
LEUCÊMICAS É CÉLULA DEPENDENTE: ESTUDO DOS MECANISMOS
ENVOLVIDOS NESTE PROCESSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

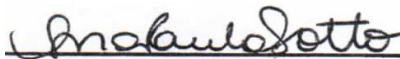
Área de concentração: Genética

Dissertação defendida e aprovada em 18 de Novembro de 2015.

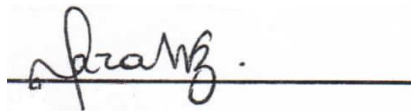
Banca examinadora:



Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo
Orientador – UNIPAMPA



Prof.ª Dr.ª Ana Paula de Souza Votto
Membro Titular - FURG



Prof. Dr.ª Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira
Membro Titular - FURG



Prof. Dr.ª Thais Posser
Membro Titular - UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais que sempre me incentivaram nas minhas aventuras em busca de conhecimento e crescimento. Quando fui fazer graduação de Biomedicina que era um curso em que muitos ao meu redor não conheciam e em uma cidade que eu nem conhecia; Quando fui fazer intercâmbio, época que não havia muita divulgação e que fomos descobrindo aos poucos como funcionava; Quando achei sozinha através de pesquisas pela internet o programa de pós-graduação da Unipampa e acabei indo para uma cidade tão longe e que nem imaginava como poderia ser. Agradeço a eles que estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins. Sempre estiveram ao meu lado.

As pessoas incríveis que conheci e que foram os “presentes do mestrado”, pois são pessoas tão humanas e maravilhosas que acredito que não são tão fáceis de encontrar e eu conheci 3 durante esse tempo do mestrado. A Mari Costa (que menina amiga!), Vivi Ulbrich (parceira!), Adriano (prestativo e atencioso!). Essas três pessoas me ajudaram MUITO na vida pessoal e acadêmica. Para sempre guardarei recordação de vocês!

Ao Dennis Costa pelos momentos em que passamos juntos, os lanches e intervalos durante as tantas horas de experimentos; os cafés e conversas no sol, os dias de loucuras em que passamos alguns dias inteiros fazendo estatística ou alguns dias inteiros direto tentando entender os artigos de engenharia genética.

Ao meu orientador, professor Andrés que aceitou orientar uma menina desconhecida e que apresentou o citômetro e sempre deu muita liberdade no laboratório para que eu e a Vivi pudéssemos reorganizar e também fazer testes experimentais. Pelo jeito amigo e compreensivo de ser e pelo conhecimento compartilhado.

A Illana Kemmerich e ao professor Jeferson Franco pelo apoio no Western Blotting, na bioquímica, no artigo e sempre que precisei.

Aos demais colegas orientados do professor Andrés, aos colegas do mestrado e dos laboratórios vizinhos pela parceria e convivência. Sinto-me bem por ter aproveitado as estruturas da universidade, por ter tido uma rotina e uma vida acadêmica compartilhada com outros pós-graduandos e o pessoal da graduação, através dos cafezinhos, dos lanches, das conversas, das risadas...

RESUMO

Cobalto é um metal de transição essencial para a saúde humana e possui papel crítico na síntese de vitamina B12. Historicamente, cobalto inorgânico foi utilizado no tratamento de pacientes anêmicos e na doença renal crônica e, após, foi usado para mimetizar hipóxia, associando seus efeitos com a ativação do fator induzível por hipóxia (HIF-1 α). Mais tarde, CoCl₂ atraiu a atenção em pesquisa com células neoplásicas por causa de seu potencial antiproliferativo, que pode envolver mecanismos independentes de HIF-1 α , ainda pouco entendidos. Neste estudo, nós avaliamos o efeito antiproliferativo do CoCl₂ em linhagens de células leucêmicas (JURKAT, U937, K562) e os mecanismos envolvidos neste processo. Para verificar o possível efeito antiproliferativo do CoCl₂ em células neoplásicas, nós analisamos a viabilidade e ciclo celular através de citometria de fluxo utilizando como sonda Iodeto de Propídio e para confirmar apoptose utilizamos também YO-PRO-1 para realizar teste pela diferença de permeabilidade de membrana/célula morta. Os níveis de ERO foram detectados através da oxidação da sonda DCFH-DA e os níveis do fator de transcrição NF-kB e a sua possível ativação foram detectados através de Western Blot nas frações nuclear e citoplasmática, sendo que os níveis de β -actina foram utilizados como controle. As três linhagens demonstraram aumento nos níveis de ERO e parada na fase G2 do ciclo celular quando submetidas ao tratamento com CoCl₂. Somente JURKAT e U937 demonstraram apoptose e tiveram diminuição significativa na expressão de NF-kB em 24 h de tratamento. Diferentemente, a linhagem K562 manteve os níveis de NF-kB. Nossos dados sugerem que a indução de morte por CoCl₂ pode ser relacionada a resposta imediata do sistema antiestressor ao CoCl₂ e a manutenção da expressão de NF-kB.

Palavras – chave: CoCl₂; células neoplásicas; potencial antiproliferativo; NF-kB.

ABSTRACT

Cobalt is a transition metal essential for human health that plays a critical role in the synthesis of vitamin B12. Historically, inorganic cobalt was used in the treatment of anemia and chronic renal failure and, afterwards, to mimic hypoxia, associating its effects with the activation of HIF-1 α . Lately, CoCl₂ attracted attention in cancer research because of its antiproliferative potential, which may involve HIF-1 α -independent mechanisms, still poorly understood. In this study, we evaluated the antiproliferative effect of CoCl₂ in leukemic cells lineages (JURKAT, U937 and K562) and the mechanisms involved in this process. To test the possible antiproliferative effect of CoCl₂ in neoplastic cells, we analyzed the viability and cell cycle by flow cytometry using as probe Propidium Iodide and to confirm apoptosis use YO-PRO-1 more Propidium Iodide to perform testing by the difference in membrane permeability/dead cell. ROS levels were detected by probe DCFH-DA oxidation and the levels of the transcription factor NF-kB and its possible activation were detected by Western Blot in nuclear and cytoplasmic fractions, the levels of β -actin was used as control. The three lineages showed increased levels of ROS and cell cycle arrest in G2 phase when subjected to treatment with CoCl₂. Only JURKAT e U937 undergone apoptosis and showed significant decreases in NF-kB expression after 24h of CoCl₂ treatment. Differentially, K562 cells maintained NF-kB levels. Our data suggest that CoCl₂ induces cell death may be related to a balance between stress responses and maintenance of NF-kB expression.

Keywords: CoCl₂; neoplastic cells; potential antiproliferative; NF-kB.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 (Introdução) Hematopoiese.....	14
Figura 2 (Introdução) Fases do ciclo celular.....	17
Figura 3 (Introdução) Características morfológicas das células apoptóticas e necróticas.....	19
Figura 4 (Introdução) Ativação de dímeros de NF- κ B	21
Figura 1 (Manuscrito) Viability.....	41
Figura 2 (Manuscrito) Percentage of Sub-G1 and G2 events.....	42
Figura 3 (Manuscrito) Effect of CoCl ₂ on apoptosis.....	43
Figura 4 (Manuscrito) Effect of CoCl ₂ on ROS level.....	44
Figura 5 (Manuscrito) Western Blotting image and densitometry analysis of NF- κ B.....	45
Figura Suplementar 1 (Manuscrito) Representative cell cycle histograms.....	46
Figura Suplementar 2 (Manuscrito) Representative density plot graphics of apoptosis.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A20	Do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Protein 3</i>
AIF	Fator indutor de apoptose, do inglês <i>Apoptosis-Inducing Factor</i>
Bax	Proteína X associada ao BCL-2, do inglês, <i>BCL-2-associated X protein</i>
Bcl-2	Do inglês, <i>B-cell lymphoma protein-2</i>
Bcl-xL	Gene relacionado ao BCL-2, isoforma longa, do inglês <i>BCL-2-related gene, long isoform</i>
CCS	Ciclo Celular Específicos, do inglês <i>Cell Cycle Specific</i>
c-IAP1/2	Do inglês, <i>cellular inhibitor of apoptosis protein 1 and 2</i>
DNA	Do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FHC	Cadeia pesada da ferritina, do inglês <i>Ferritin Heavy Chain</i>
FLICE	Enzima conversora da IL-1 β ligada ao FADD, do inglês <i>FADD-Like IL-1β-Converting Enzyme</i>
G0	Fase Gap0 do ciclo celular, do inglês <i>Gap</i> , intervalo
G1	Fase Gap1 do ciclo celular, do inglês <i>Gap</i> , intervalo
G2	Fase Gap2 do ciclo celular, do inglês <i>Gap</i> , intervalo
HIF-1	Fator de indução de hipóxia -1
HIV	Do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSCs	Do inglês, <i>Hematopoietic Stem Cells</i>
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mielocítica Aguda
LMC	Leucemia Mielocítica Crônica
M	Fase de Mitose do ciclo celular
MDR	Resistência a múltiplas drogas, do inglês <i>Multi-Drug Resistance</i>
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
NK	Do inglês, <i>Natural Killer</i>
RHD	Do inglês, <i>Rel Homology Domain</i>
S	Fase de Síntese do ciclo celular
SOD2	Superóxido dismutase tipo-2
XIAP	IAP ligada ao cromossomo X, do inglês <i>X-chromosome linked IAP</i>

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, consta uma breve revisão da literatura sobre os temas trabalhados nesta dissertação. A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, que se encontra no item **MANUSCRITO**. No mesmo, constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. O item **CONSIDERAÇÕES FINAIS**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados do manuscrito presente neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 LEUCEMIA	12
1.2 LINHAGENS DE CÉLULAS LEUCÊMICAS	12
1.2.1 Linhagem K562	13
1.2.2 Linhagem JURKAT	15
1.2.3 Linhagem U937.....	15
1.3 TRATAMENTO DA NEOPLASIA	15
1.4 ALVOS TERAPÊUTICOS	16
1.4.1 Ciclo Celular.....	16
1.4.2 Apoptose	18
1.5 COBALTO.....	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MANUSCRITO	25
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

O sangue é um dos tecidos mais regenerativos e plásticos do organismo, sendo que milhões de células sanguíneas “velhas” são reabastecidas por novas durante cada segundo da vida, através do processo de hematopoiese. A expectativa de vida das células sanguíneas maduras é relativamente baixa, sendo que a maioria dura algumas horas, mas outras podem durar dias ou até alguns anos. 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, anemia ou infecções, os tecidos hematopoiéticos são capazes de responder rapidamente aumentando a produção celular. Depois de o organismo estar recuperado, a quantidade de células declina para os níveis normais novamente (RIEGER; SCHROEDER, 2012). Em adultos, o número de novas células sanguíneas que os tecidos hematopoiéticos devem produzir está estimado em torno de 1 trilhão/dia (OGAWA, 1993).

O sistema sanguíneo consiste de diversos tipos celulares com funções especializadas e com grande dispersão pelo corpo, essenciais para a sobrevivência do organismo. São mais de nove tipos celulares diferentes, divididos em duas linhagens: linhagem linfóide (linfócitos T e B, células NK - *Natural Killer* e células dendríticas linfóides) e linhagem eritro-mielóide (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, eritrócitos). Todos esses tipos celulares são originados de células tronco hematopoiéticas (do inglês, *hematopoietic stem cells* - HSCs) que residem na medula óssea, o principal local da hematopoiese em adultos (RIEGER; SCHROEDER, 2012).

Essas considerações indicam que a regulação da hematopoiese requer a existência de um sistema de controle extremamente complexo. Entretanto, o organismo pode perder a capacidade de manutenção deste processo contínuo e homeostático e desencadear um processo neoplásico. Esse processo se caracteriza por uma proliferação exagerada de células em estágios precoces de maturação que suprimem a expansão das células tronco hematopoiéticas normais e assim começa o quadro clínico da leucemia.

1.1 LEUCEMIA

Leucemia é um tumor não-sólido derivado de transformações em células precursoras da linhagem hematopoiética, caracterizado pelo acúmulo destas células na medula óssea, interferindo, conseqüentemente, na produção de hemácias, linfócitos, neutrófilos e plaquetas (CRAMER; HALLEK, 2012). Embora originárias da medula óssea, as células tem um significativo poder metastático, sendo as metástases hepáticas, renais, linfonodais e cerebrais as mais frequentes. O quadro clínico é caracterizado por várias doenças, dentre elas, anemia, trombocitopenia, infecções resultantes da perda de leucócitos funcionais e, na ausência de um tratamento eficaz, pode levar à morte (LONGO et al., 2013).

As leucemias podem ser classificadas conforme os precursores hematopoiéticos afetados (linfóide ou mielóide) e quanto ao grau de maturidade dessas células (agudas ou crônicas), sendo que cada uma tem alterações genéticas (mutações e aberrações cromossômicas) bastante particulares (CRAMER; HALLEK, 2012; SISON; BROWN, 2011).

1.2 LINHAGENS DE CÉLULAS LEUCÊMICAS

A disponibilidade de manter em laboratório linhagens contínuas de leucemia-lymphoma como uma fonte acessível e abundante de células tem contribuído significativamente para compreender melhor a fisiopatologia de tumores hematopoiéticos. As primeiras linhagens de células hematopoiéticas malignas foram derivadas de lymphoma de Burkitt em 1963 e, desde então, muitas linhagens tem sido descritas. Estas linhagens possuem características e vantagens em comum, como: ilimitado fornecimento de material celular; disponibilidade de material celular idêntico em diferentes lugares do mundo; capacidade de armazenamento por tempo indeterminado em nitrogênio líquido e boa capacidade de recuperação; origem monoclonal; parada na diferenciação celular em um estágio de discreta maturação; proliferação sustentada em cultura; estabilidade da maior parte das características em cultura a longo prazo e algumas alterações genéticas específicas (CREE, 2011).

Há várias possibilidades para classificar as linhagens de células leucêmicas, mas a mais prática e frequentemente usada é a classificação baseada no espectro fisiológico das linhagens de células hematopoiéticas normais (**Figura 1**). Primeiramente, distinguindo células

linfóides das mielóides. Dentro da categoria linfóide e mielóide, células-B e células-T de um lado e por outro lado, células mielocíticas, monocíticas, eritróides e megacariocíticas são discernidas (DREXLER, 2001). Com essa classificação pode-se juntar o grau de maturidade dessas células (agudo ou crônico) e dividir as leucemias em: Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), Leucemia Mielocítica Aguda (LMA) e Leucemia Mielocítica Crônica (LMC).

A LLA é responsável por aproximadamente 75% das leucemias em crianças. Em contraste, os tipos mais comuns de leucemia em adultos são LMA e LMC, seguido por LLA e LLC (National Cancer Institute, 2015).

A leucemia é o câncer de sangue mais comum depois de linfoma, ocorrendo com mais frequência em adultos mais velhos e está entre os mais comuns cânceres em crianças (National Cancer Institute, 2015).

Diversas são as linhagens leucêmicas utilizadas nas pesquisas científicas, porém para uma melhor abordagem e exemplificação, serão abordadas três linhagens provenientes de diferentes precursores hematopoiéticos: a linhagem K562, modelo de Leucemia Mielocítica Crônica, proveniente de precursor eritróide; a linhagem U937, largamente utilizada em estudos da diferenciação monócito-macrófago, proveniente de precursor mielóide; e a linhagem JURKAT, como modelo de Leucemia Linfocítica Aguda derivada de células T, proveniente de precursor linfóide (**Figura 1**).

1.2.1 Linhagem K562

A linhagem de células K562 foi estabelecida por Lozzio e Lozzio (1975) através de uma efusão pleural de uma mulher de 53 anos com Leucemia Mielocítica Crônica em crise blástica terminal.

A linhagem K562, assim como as outras linhagens de Leucemia Mielocítica Crônica contêm o cromossomo Philadelphia que resulta da translocação cromossômica $t(9;22)$, carregando o gene de fusão BCR-ABL. BCR-ABL constitutivamente ativa a tirosina quinase ABL que é uma enzima relacionada a diversos processos fundamentais, como a proliferação, diferenciação, mobilidade e sobrevivência ou morte celular, contribuindo para o desenvolvimento de LMC. K562 tem sido muito utilizada como modelo de LMC para

desenvolvimento do Imatinib, uma droga que inibe BCR-ABL1. A taxa de resposta citogenética de pacientes recentemente diagnosticados em fase crônica, após o tratamento com imatinib é maior do que 80%, mostrando que esta droga tem revolucionado a terapia da LMC (DEININGER; BUCHDUNGER; DRUKER, 2005). O mesilato de imatinib é atualmente o tratamento de escolha para LMC, mas, apesar dos excelentes resultados, não é capaz de erradicar completamente a doença, podendo ocorrer resistência ao tratamento. O mecanismo mais conhecido de resistência é o desenvolvimento de mutações do BCR-ABL, que impedem a ligação adequada do imatinib à quinase (PAGNANO, 2008).

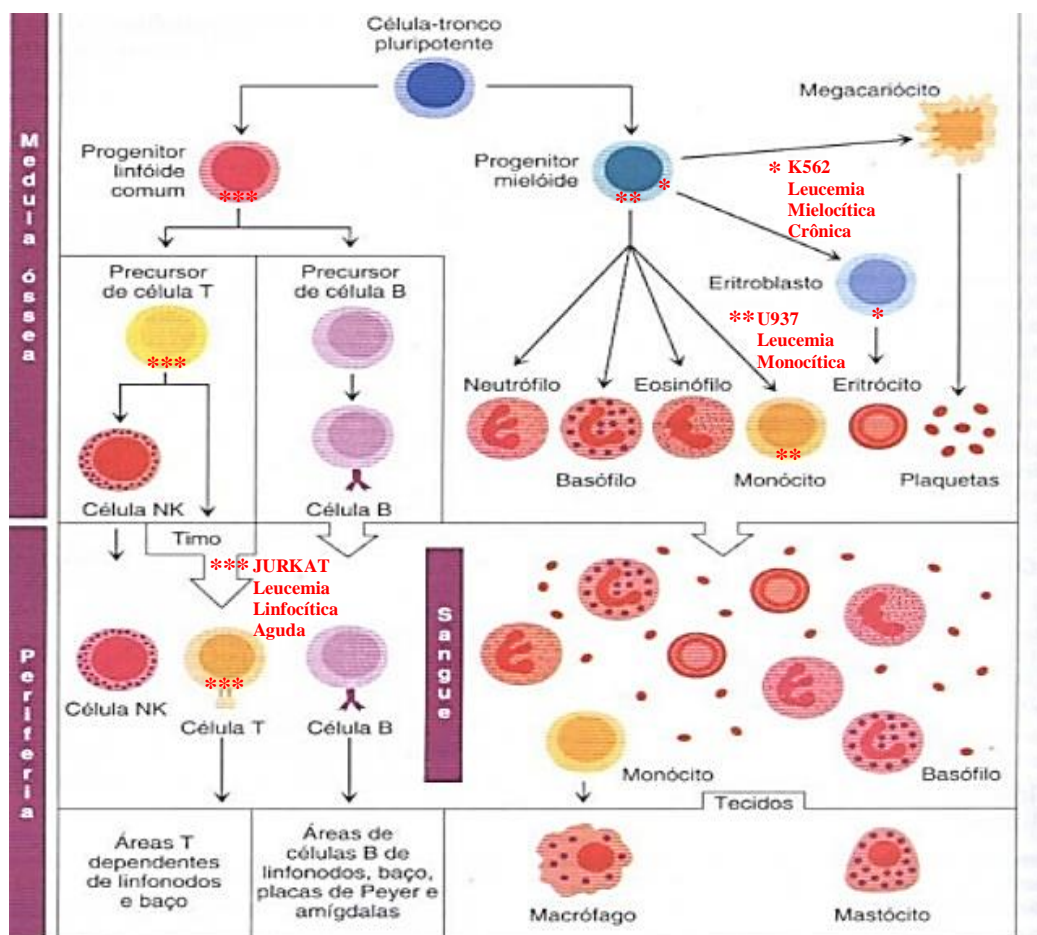


Figura 1: Espectro fisiológico das linhagens de células hematopoiéticas normais e indicação dos precursores e respectivas células hematopoiéticas que estão envolvidas nas transformações leucêmicas para a formação da linhagem K562(*), U937(**) e JURKAT(***). Fonte: Adaptado de CRISPIM, 2015.

1.2.2 Linhagem JURKAT

A linhagem JURKAT foi estabelecida por Schneider, Schwenk e Bornkamm (1977), através do sangue periférico de um menino de 14 anos. É uma linhagem imortalizada de linfócitos T que é muito utilizada para estudar leucemia aguda derivada de células T, sinalização de células T e a expressão de vários receptores de quimiocina suscetíveis à entrada viral, particularmente HIV. Células JURKAT são também utilizadas por sua habilidade em produzir grandes quantidades de interleucina 2. Tem morfologia arredondada e crescem em suspensão e em aglomerados (ATCC, 2015; CELEROMICS, 2015).

1.2.3 Linhagem U937

A linhagem U937 foi estabelecida por Sundstrom e Nilsson (1976), através da efusão pleural de um paciente caucasiano de 37 anos acometido por Linfoma Histiocítico Verdadeiro, é proveniente de tecido histiocítico, mas derivada de precursor mielóide. Dispõem de muitas características semelhantes as dos monócitos, como o lançamento de lisozimas em meio de cultura, servindo como modelo *in vitro* para a diferenciação monócito-macrófago e também para testes antitumorais em geral (ABCAM, 2015).

1.3 TRATAMENTO DA NEOPLASIA

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Mais recentemente tem-se usado a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos e a imunoterapia, sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais que um tipo de tratamento. A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase; no caso da leucemia, costuma ser necessário o uso de outros tipos conjuntos de terapia, incluindo o transplante de medula óssea (ALTMAN; SASSANO; PLATANIAS, 2011; ALMEIDA et. al, 2005).

O tratamento para pacientes com leucemia é um desafio para a comunidade científica, mesmo considerando os grandes avanços nas pesquisas básicas e clínicas. Apesar das diferentes terapias disponíveis, a terapia sistêmica com fármacos citotóxicos (quimioterapia) continua sendo o tratamento mais utilizado (ALTMAN; SASSANO; PLATANIAS, 2011; KADOWAKI; KITAWAKI, 2011).

1.4 ALVOS TERAPÊUTICOS

O câncer exibe características muito heterogêneas, porém, todos os tumores malignos adquirem a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal de uma célula transformada depende de um descontrole da sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). A busca por novos alvos terapêuticos no combate a leucemia e outras neoplasias envolve o estudo de compostos que superem os mecanismos de resistência e levem as células tumorais ao bloqueio do ciclo celular e à morte por apoptose (KADOWAKI; KITAWAKI, 2011).

1.4.1 Ciclo Celular

O ciclo celular é o período de vida de uma célula. As células passam a existir no momento em que surgem a partir da divisão de outra pré-existente, chamada célula mãe ou célula parental. O ciclo termina quando a célula se divide e deixa de existir, gerando duas células filhas. Este ciclo é dividido em 5 fases: G₀, G₁, S, G₂ e M (SALMONM, 1998).

A célula que não está em fase de replicação apresenta-se na fase G₀. Nesta fase, o DNA está superenovelado, com atividade nuclear baixa. Este estágio pode ser modificado para a interfase (G₁, S e G₂). Na fase G₁, onde há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase S. Na fase G₂ há a síntese de componentes para a mitose (divisão celular com manutenção do número de cromossomos específicos da espécie) para posteriormente ocorrer a produção do

fuso mitótico que é feita na fase M e, após a divisão do material nuclear, acontecer a citocinese (que é a separação da célula mãe, formando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares). Finalizando o ciclo de replicação celular, retorna à fase G₀ (**Figura 2**). A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna à fase G₀), assim passa da fase M para nova fase G₁ e conseqüentemente tem a proliferação acelerada (ALMEIDA et al., 2005; SALMONM, 1998).

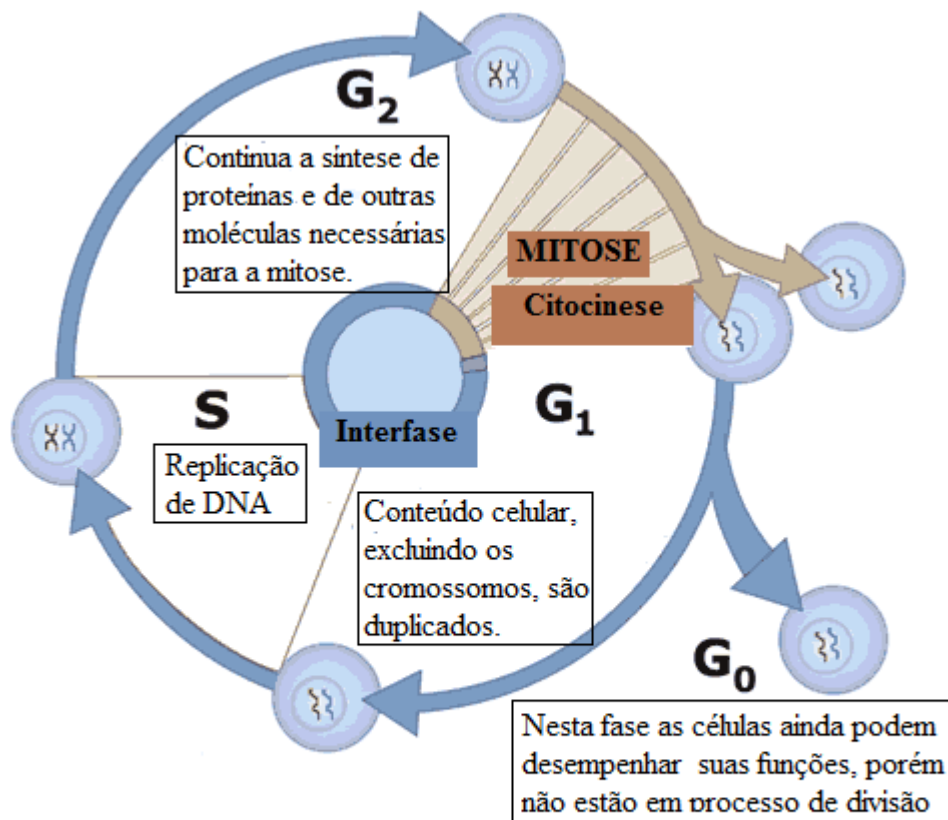


Figura 2: Fases do ciclo celular. Fonte: Adaptado de GARCÍA, 2015.

Há pontos de checagem do ciclo celular, chamados *checkpoints*, que são os mecanismos pelos quais a célula bloqueia de forma ativa o ciclo celular até que um processo como a replicação do DNA ou a mitose ocorra de forma completa e assertiva. Durante o ciclo celular são reconhecidos três pontos principais de bloqueio: em G₁, antes de a célula entrar na fase S, em G₂, antes da célula entrar em mitose e durante a metáfase, impedindo a ligação dos cromossomos aos microtúbulos. Quando uma célula sofre mutações que a fazem perder a capacidade de regular seu ciclo celular adequadamente e de acionar o programa de apoptose, pode se tornar na chamada “célula transformada”. Essas células têm que ser eliminadas pelo

sistema imunológico, pois, caso não seja, podem se multiplicar de maneira desenfreada e originar um tumor (KASTAN; BARTEK, 2004).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram em determinada fase do ciclo celular e são denominados fármacos ciclo celular específicos (CCS). Por exemplo, os alcalóides da vinca (vimblastina e vincristina) que tem ação pela inibição do fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, conseqüentemente, interrompendo a divisão celular na metáfase. O Etoposido (VP-16) e teniposido (VM-26), derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, extraída da raiz do podofilo (*Podophyllum peltatum*) possuem ação pelo bloqueio das células nas fases S e G2 e inibição da enzima topoisomerase II, o que promove lesão no DNA (ALMEIDA et al., 2005).

1.4.2 Apoptose

O termo apoptose foi sugerido por Kerr, Wyllie e Currie (1972) para descrever um modelo de morte celular com morfologia característica e com mecanismos endógenos altamente regulados, a qual está envolvida na homeostase dos tecidos e na carcinogênese.

Na apoptose acontece a formação de invaginações e pregas na membrana plasmática (*blebs*) que culmina na separação dos fragmentos celulares em corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são formados por organelas íntegras e pelo conteúdo citoplasmático envolvido pela membrana plasmática. Essas estruturas são reconhecidas como alvos fagocitários e são fagocitadas por células do sistema imune, como os macrófagos e degradadas nos fagolisossomas. Portanto, a apoptose gera pouca reação inflamatória, uma vez que as células apoptóticas não liberam o seu conteúdo celular para o tecido circundante, pois são digeridas rapidamente impedindo a necrose secundária e a liberação de citocinas inflamatórias (ELMORE, 2007; RUBIN et al., 2010). Diferente da necrose, aonde o conteúdo celular é liberado (**Figura 3**), causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007), portanto a apoptose torna-se mais atrativa na busca de compostos antineoplásicos.

Muitos agentes antineoplásicos como vinblastina, cisplatina, mitomicina c, doxorubicina, camptotecina, inostamicina e neocarzinostatina, exibem sua ação através da

ativação da morte celular por apoptose por via dependente de espécies reativas de oxigênio – ERO (BARRERA, 2012).

Alguns trabalhos demonstraram que diferentes tipos de células neoplásicas tem níveis aumentados de ERO quando comparado com seus respectivos tipos celulares saudáveis. Por exemplo, células de leucemia recentemente isoladas a partir de amostras de sangue de pacientes com leucemia linfocítica crônica ou leucemia de células pilosas mostraram aumentada produção de ERO ao comparar com linfócitos normais (KAMIGUTI et al., 2005; SZATROWSKI; NATHAN, 1991; ZHOU et al., 2003). A manipulação nos níveis de ERO pela modulação redox tem mostrado ser um caminho para selecionar as células neoplásicas para a morte sem causar significante toxicidade às células normais (BARRERA, 2012).

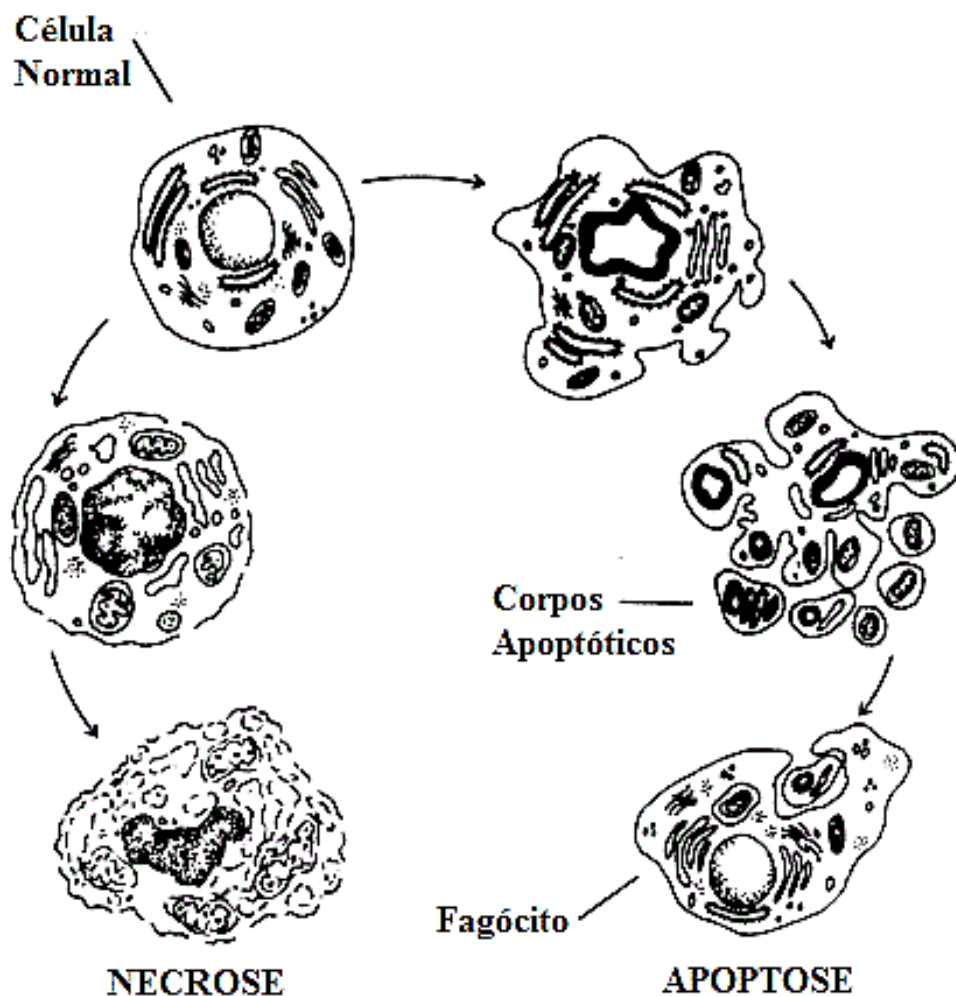


Figura 3: Características morfológicas das células que entram em necrose e das células que vão para a apoptose. Fonte: Adaptado de UEDA & SHAH, 2000.

Espécies reativas de oxigênio podem induzir um largo espectro de respostas dependendo da magnitude do nível, a duração da exposição, a localização e a natureza de ERO envolvido. Em geral, baixos níveis de ERO são mitogênico e promovem a proliferação e sobrevivência celular, enquanto que níveis intermediários causam parada do ciclo celular de forma transiente ou permanente e induz a diferenciação das células. Em altos níveis, ERO podem facilmente reagir com lípidios de membrana, causando alteração na permeabilidade da membrana; no DNA, pode causar dano e instabilidade genômica; nas proteínas, pode causar modificações oxidativas que devem resultar na perda da atividade catalítica de enzimas ou proteínas mais suscetíveis à degradação proteolítica. Neste caso, ERO são prejudiciais e induzem apoptose ou necrose celular (BARRERA, 2012; MARTINDALE; HOLBROOK, 2002).

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação na resistência a radio e quimioterapia (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A resistência a apoptose pode ocorrer devido à expressão de proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR), ao aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas (por exemplo, Bcl-2, Bcl-XL e survivina) e à diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas (por exemplo, Bax e o AIF) (LANCET; KARP, 2009).

O fator de transcrição NF- κ B pode ser outro fator relacionado a resistência a apoptose, ele é constitutivamente ativo em certos tipos de tumor (PACIFICO & LEONARDI, 2006) e tem emergido como um regulador crucial da sobrevivência celular (KARIN & LIN, 2002). Nos mamíferos, a família NF- κ B é composta por cinco fatores de transcrição relacionados: p50, p52, RelA (p65), c-Rel e RelB. Esses fatores de transcrição compartilham uma região homóloga de 300 aminoácidos, N-terminal, de ligação ao DNA/domínio de dimerização, chamada de Rel Homology Domain (RHD). A região RHD serve como uma plataforma aonde os membros da família NF- κ B podem formar homodímeros e heterodímeros, o que lhes permite se ligar à regiões promotoras e de enhancer de genes para modular a expressão desses genes (ABCAM, 2015).

Proteínas NF- κ B não são sintetizados *de novo*; portanto, a sua atividade de transcrição é silenciada por interações com proteínas inibitórias I κ B presentes no citoplasma. A ativação de dímeros de NF- κ B é devido a fosforilação de I κ B mediada por IKK (um complexo I κ B kinase que consiste de subunidades catalíticas IKK α e/ou IKK β e uma proteína que serve de arcabouço e para regulação, não-enzimática, chamada NEMO) que induz a degradação no

proteossomo, permitindo que as subunidades ativas do fator de transcrição NF- κ B se transloquem para o núcleo e assim induzam a expressão do gene alvo (ABCAM, 2015) (**Figura 4**).

NF- κ B modula genes antiapoptóticos (c-IAP1/2, XIAP, FLICE, Bcl-xL, A20, survivina) e antioxidantes (SOD2 - Superóxido dismutase mitocondrial, FHC - cadeia pesada da ferritina, glutatona S-transferase) que podem conduzir para resistência celular a oxidantes e drogas quimioterapêuticas (JI; GOMEZ-CABRERA; VINA, 2007; KININGHAM et al., 2008; MATÉS et al., 2008; PHAM et al., 2004). Alguns trabalhos associaram a superestimulação do NF- κ B com resistência celular mesmo nos agentes quimioterapêuticos clássicos, como doxorubicina, etoposido e imatinib (CILLONI et al., 2006; GARCÍA et al., 2005; MOROTTI et al., 2006).

Assim, o estudo da apoptose é imprescindível para a investigação do uso terapêutico de novos compostos antileucêmicos e para a compreensão dos mecanismos de resistência à quimioterapia.

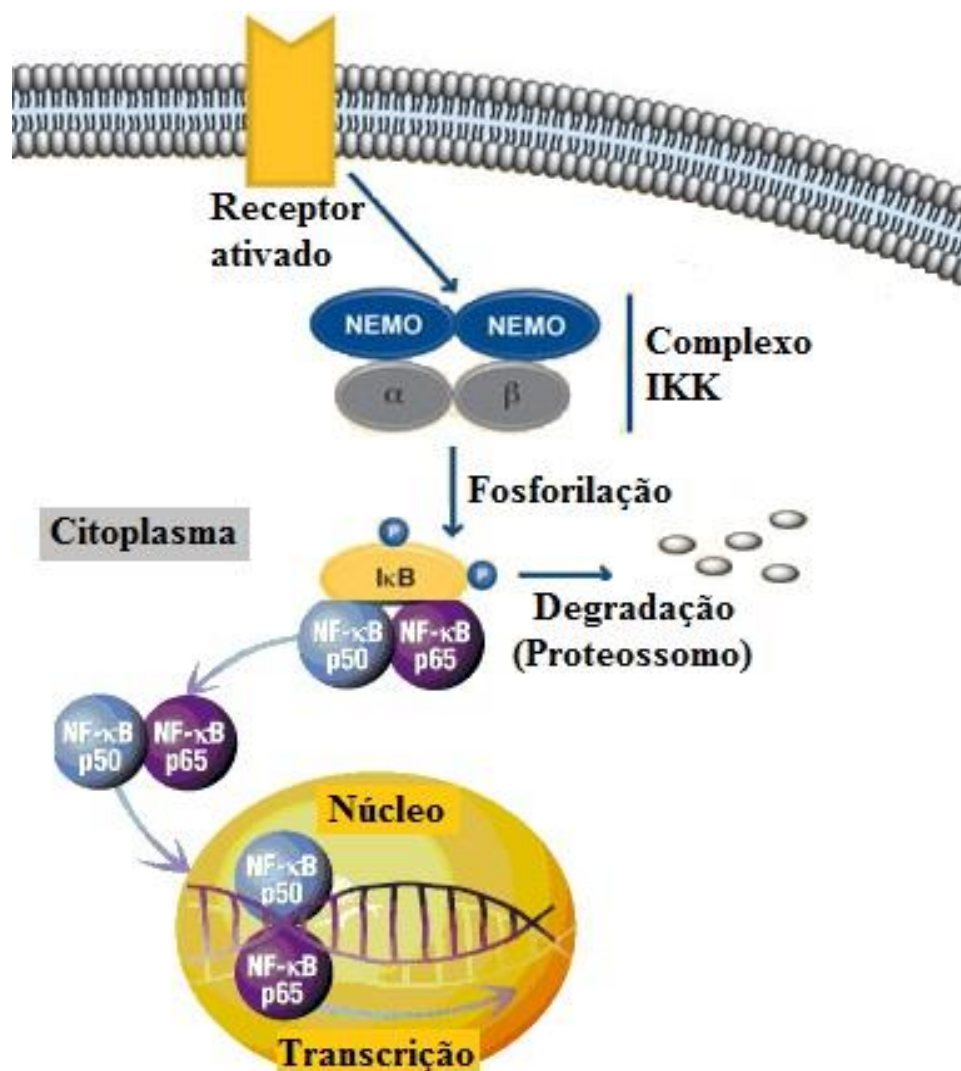


Figura 4: Ativação de dímeros de NF- κ B. Fonte: Adaptado de ABCAM, 2015.

1.5 COBALTO

O cobalto é um metal de transição que ocorre naturalmente em dois estágios de oxidação, Co^{2+} e Co^{3+} , e é um micronutriente essencial na forma de vitamina B12 (cobalamina) (JUNGWIRTH et al., 2011).

Cada molécula de vitamina B12 contém um átomo de cobalto. Esta vitamina funciona como coenzima na conversão da homocisteína em metionina (um aminoácido essencial) e da L-metilmalonil-CoA em succinil-CoA (reação importante no metabolismo dos lipídios e carboidratos). Além disto, é igualmente importante no processo de hematopoiese, sendo que a sua deficiência pode levar a anemia perniciosa (CHANARIN, 1987; VANNUCCHI; MONTEIRO, 2010).

O potencial do cobalto inorgânico de estimular a produção de eritropoietina foi descoberto no final dos anos 1950 (GOLDWASSER et al., 1958). Entre os anos de 1950 e 1980, sais de cobalto inorgânico (principalmente cloreto de cobalto) foram muito utilizados na terapia de pacientes anêmicos e no tratamento de insuficiência renal crônica, posteriormente, deixando de ser usado pelos relatos de alguns casos onde foi demonstrado efeitos adversos nos pacientes (JELKMANN, 2012). Os efeitos colaterais típicos associados com exposição crônica ao cobalto inclui náuseas, vômitos, neuropatias, disfunções na tireóide (KRISS; CARNES; GROSS, 1955; PALEY; SOBEL; YALOW, 1958) e falência cardíaca (ALEXANDER, 1972; CURTIS et al., 1976; MANIFOLD; PLATTS; KENNEDY, 1978).

O cobalto é altamente tóxico em doses maiores ou, em baixos níveis, na exposição cumulativa em longo prazo (exposição ocupacional), com efeitos adversos relacionados com vários órgãos e tecidos (SIMONSEN; HARBAK; BENNEKOU, 2012). A exposição sistêmica do cobalto (Co^{2+}) por longo prazo em animais de laboratório e em humanos tem demonstrado acumular cobalto nos tecidos, em particular no fígado e nos rins, e a concentração de cobalto é aumentada no sangue e na urina (LEGGETT, 2008). Após cessar a exposição ocupacional a concentração de cobalto no sangue e na urina diminui, ao longo de 4 semanas $51 \pm 21\%$ e $66 \pm 29\%$, respectivamente (ALEXANDERSSON, 1988).

O mecanismo de toxicidade do cobalto não está claro, mas alguns dos efeitos do cobalto podem estar relacionados com a sua elevada afinidade aos grupos sulfidril, que pode causar a inibição de enzimas importantes (NEMERY; LEWIS; DEMEDTS, 1994); com o dano ao DNA mitocondrial e no processo de reparo de DNA (WANG et al., 2000); com a capacidade antagonista do CO^{2+} sobre canais de cálcio, competindo com o cálcio (Ca^{2+}) para

a ligação a proteínas, interferindo na sinalização de Ca^{2+} (AKBAR; BREWER; GRANT, 2011).

Apesar das limitações devido aos efeitos adversos em células normais e tecidos, mas tendo em vista seu potencial citotóxico, componentes contendo cobalto tem atraído interesse para a finalidade de agente antineoplásico sistêmico (JUNGWIRTH et al., 2011). Em algumas linhagens neoplásicas, Co^{2+} demonstrou aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio, por exemplo, através de reações tipo de Fenton, causando estresse oxidativo e resultando em dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídios (MAXWELL; SALNIKOW, 2004; PETIT et al., 2005). Talvez, os efeitos mais importantes ou os mais pesquisados e lembrados, são os que o cobalto poderia causar pela indução do fator induzível por hipóxia (HIF), presente em quase todas as células animais, com a consequente transcrição de uma variedade de genes que são relacionados com o desenvolvimento e crescimento de tumor, por exemplo, genes que codificam para fatores de crescimento angiogênico, transportadores de glicose, enzimas glicolíticas e genes envolvidos na regulação da apoptose e da proliferação celular (SIMONSEN; HARBAK; BENNEKOU, 2012).

Mesmo que as células leucêmicas não formam uma “massa” bem circunscrita como em tumores sólidos, os níveis de oxigênio na medula óssea em pacientes com leucemia pode ser reduzido como resultado do rápido crescimento das células leucêmicas, que é, possivelmente, ainda mais agravado com anemia comumente desenvolvida em pacientes recém-diagnosticados (GUO et al., 2006). Jensen et al. (2000) observaram baixos níveis de oxigênio ao redor das células leucêmicas na medula óssea de ratos norueguês e que esse ambiente afeta as células normais, demonstrando que a leucemia possivelmente forma um microambiente hipóxico, mesmo sendo um tumor não sólido. Guo et al. (2006) demonstraram que o tratamento com $200 \mu\text{M}$ de CoCl_2 (agente utilizado no modelo de hipóxia química) nas linhagens U937 e NB4 induziu apoptose por via mitocondrial mas de forma independente de HIF (principal marcador de hipóxia).

O CoCl_2 tem sido muito utilizado como modelo de hipóxia nos estudos e seus efeitos são bastante relacionados a esse processo, porém o próprio cobalto mostra indícios da sua ação anti-proliferativa dependente ou não da ativação do seu marcador de hipóxia (HIF-1 α). Portanto, torna-se importante analisar os efeitos anti-proliferativos do Cloreto de Cobalto (CoCl_2) em linhagens de células leucêmicas e os mecanismos envolvidos neste processo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos anti-proliferativos do Cloreto de Cobalto (CoCl_2) em linhagens de células leucêmicas e os mecanismos envolvidos neste processo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a viabilidade celular das linhagens JURKAT, U937 e K562 submetidas a diferentes concentrações de CoCl_2 .

Avaliar o mecanismo envolvido no caso de morte durante os tratamentos com CoCl_2 .

Analisar se há alterações no ciclo celular nas linhagens submetidas ao tratamento com CoCl_2 .

Avaliar marcador de estresse oxidativo no tratamento com CoCl_2 .

Verificar os níveis do fator de transcrição NF- κ B durante os tratamentos.

3 MANUSCRITO

Effects of CoCl₂ on cell viability depend on the maintenance of NF-κB expression

Submetido à Leukemia & Lymphoma

ISSN: 1042-8194 (Print) 1029-2403 (Online)

Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ilal20>

Title: Effects of CoCl₂ on cell viability depend on the maintenance of NF-κB expression

Running title: CoCl₂ cytotoxicity depend on NF-κB level

Authors: Bruna Torres*¹, Angélica C. de Baumont*², Alfeu Zanotto-Filho², Matheus B. Freitas², Viviane U. Ferreira¹, Illana K. Martins¹, Jeferson L. Franco¹, Andrés Delgado-Cañedo^{1,2}

* Bruna Torres and Angélica C. de Baumont contributed equally to this manuscript.

¹ Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Campus São Gabriel, CIPBIOTEC, São Gabriel, RS, Brazil.

² Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/ Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Andrés Delgado Cañedo; Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Campus São Gabriel, CIPBIOTEC, Rua Alúzio Barros Macedo, Br 290, km 423 Bairro Piraí, 97300-000, São Gabriel, RS, Brazil. E-mail: andrescanedo@unipampa.edu.br. Phone:+55-55- 32370851

Keywords: CoCl₂, neoplastic cells, antiproliferative agents, NF-κB

Word Count:

Manuscript word count: 3037

Abstract word count: 144

Figures: 5

Supplementary Figures: 2

Tables: 0

References: 33

ABSTRACT

Cobalt is a transition metal essential for human health that plays a critical role in the synthesis of vitamin B12. Historically, inorganic cobalt was used in the treatment of anemia and chronic renal failure and, afterwards, to mimic hypoxia, associating its effects with the activation of HIF-1 α . Lately, CoCl₂ attracted attention in cancer research because of its antiproliferative potential, which may involve HIF-1 α -independent mechanisms, still poorly understood. In this study, we evaluated the antiproliferative effect of CoCl₂ in JURKAT, U937 and K562 cells demonstrating increased ROS level and cell cycle arrest in G2 phase in these three lineages. Only JURKAT e U937 undergone apoptosis and showed significant decreases in NF-kB expression after 24h of CoCl₂ treatment. Differentially, K562 cells maintained NF-kB levels. Our data suggest that CoCl₂ induces cell death may be related to a balance between stress responses and maintenance of NF-kB expression.

INTRODUCTION

Cobalt is a metal indispensable for human health and plays a critical role in the synthesis of vitamin B12 [1]. For the general population, the diet is the main source of cobalt exposure [2]. Historically, inorganic cobalt salts were used in the treatment of anemic patients and in chronic renal failure [3]. Later, cobalt was being studied in health research to avoid damages caused by dietary supplementation [4,5] and athletic doping [6]. Also, several studies have shown the antiproliferative potential of Co^{2+} in neoplastic cells [7–12].

Studies have shown the ability of cobalt chloride (CoCl_2) to mimic hypoxia by its potential of inducing hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) accumulation [7-13] in normoxic conditions, being that one of the possible ways can be by Fe^{2+} -substitution in prolyl hydroxylases (PHDs) and retard HIF-1 α degradation that is constantly happening in the cytoplasm [14]. HIF-1 α is recognized as the master regulator of the hypoxic response [15], regulating over 100 genes through the Hypoxia Response Element (HRE) [16]. CoCl_2 is one of the most commonly used hypoxia-mimetic molecules and consequently their biological effects was relatively well tested over the last years [12], but it was also demonstrated that the antiproliferative effect of CoCl_2 can occur by HIF-1 α -independent mechanisms [9,10].

Among the antiproliferative effect, CoCl_2 can induce cell cycle arrest and cell death [9, 10, 13]. In general, CoCl_2 decreases cell viability, inducing apoptosis, in relatively high doses (100 μM or more) [9,13]. The events that lead to CoCl_2 -induced apoptosis are controversial. Highlighting the increased of reactive oxygen species (ROS) or related signaling pathways [17–19], up-regulation of HIF-1 α [20], down-regulation of HIF-1 α [11] and HIF-1 α independent mechanisms [9].

Regarding the cell treatment with CoCl_2 , some studies reported cell cycle arrest in G2 phase [10,21,22]. Using HeLa cell line, it was shown that this cell cycle arrest could be largely prevented by the addition of iron and that it was not relate to HIF-1 α induction. In this same study, authors suggested that contradictory reports in the literature concerning the action of cobalt in different cell systems, may be due to differences in their redox state, iron load or activation status of signaling pathways thereby modulating cobalt's mode of action [10].

In order to advance in the knowledge of cellular/molecular mechanisms involved in cobalt induced antiproliferative actions, in the present study, we evaluated the effects of CoCl_2 on ROS level, cell cycle arrest, cell viability and apoptosis and NF-KB expression in U937 (human monocytic leukemia), K562 (human chronic myelocytic leukemia) and JURKAT (human T cell lymphoblast) leukemia cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Powdered CoCl_2 (>99% purity) was purchased from Labsynth (SP, Brazil). For cell culture, RPMI 1640 medium (Applichem, Germany), Fetal Bovine Serum (Gibco, Brazil), penicillin and streptomycin (Gibco, USA). YO-PRO®-1 Iodide were purchased from Invitrogen (USA) and Propidium iodide ($\geq 94.0\%$ purity) and 2,7-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). For Western Blotting, N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and nitrocellulose membranes were provided by GE Healthcare (Little Chalfont, UK). Primary antibodies anti-rabbit NF-Kb was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA) and β -Actin from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-Rabbit IgG, produced in goat, used as secondary antibody was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and enhanced chemiluminescent western blot substrate (ECL) were purchased from Promega (Madison, USA).

Cell Culture and CoCl_2 Treatment

JURKAT, U937 and K562 cell lines were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. Cells were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C in complete medium that was changed every 2-3 days. After reaching approximately 80% confluence, the cells were plated for 24 hours before treatments on plastic culture plates (6-, 24- or 96-well plates) at the initial density of 1×10^5 cells/ml for viability or cell cycle analysis. For apoptosis assay, was used 0.5×10^5 cells/ml. CoCl_2 work solutions were freshly prepared in ultrapure sterile water, filtered through membrane of 0.45 μm of pore size, and added 1 μL in final concentrations for well of 50 μM , 100 μM , 250 μM and/or 500 μM , depending on the experiment. Untreated cells were used as negative control.

Cell Viability Analysis

Cell viability was measured using the Propidium Iodide (PI) exclusion assay. Cells were plated with 1×10^5 cells/well in 24-well plates and 24 hours after treated with increased CoCl_2 concentrations. Cells were then pelleted 750g/5 min., resuspended to final volume of 200 μL and 4 ng/ml PI was added. Flow cytometry analysis was performed in a BD Accuri™ C6 cytometer. For each sample, 10000 cells gated were analyzed by FL2-H versus SSC-H parameters.

Membrane Permeability/Dead Cell Apoptosis Assay

To distinguish between apoptotic and necrotic cells, the membrane permeability/dead cell apoptosis assay was used according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA) with slight modification. The cells were seeded in 24-well plates at a density of 1×10^5 cells/well (2ml) and 24 hours after treatment were pelleted 750g/5 minutes and resuspended in 500 μ L of complete medium. YO-PRO-1 and Propidium Iodide (PI) were added to the cells for a final concentration 100 nM and 150 nM respectively, without PBS wash procedure. YO-PRO-1, a green fluorescent dye (530 nm emission wavelength), can enter the more permeant cytoplasmic membrane of apoptotic cells, whereas PI, a red fluorescent dye (610 nm emission wavelength), cannot, but enters in dead cells. Therefore, apoptotic cells show only green fluorescence, dead cells show red and green fluorescence, and live cells show no fluorescence. After incubation for 5 minutes, 30000 gated events were collected using a FL1-H (YOPRO) versus FL3-H (PI) graphic in a BD Accuri™ C6 cytometer.

Cell Cycle Analysis

The method described by [23] for the analysis of cell cycle was used with slight modification. Around 1×10^5 cells/well were distributed in 24-well plates for 24 hours. Cells were treated until 48 hours. In the analysis time the cells were collected, centrifuged at 750g for 5 minutes and suspended in a solution containing 100 μ g/ml Propidium Iodide, 10 mM Trizma base, 10 mM NaCl, 0.7 U RNase from Invitrogen Carlsbad (CA, USA) and 0.01% NP-40. After 5 minutes, 5000 FL2-A events were collected in slow mode in a BD Accuri™ C6 cytometer and analyzed with the FlowJo X v 0.7 software.

Determination of Intracellular ROS Level in Living Cells [Real-Time DCF Assay]

ROS level was detected using the cell permeant reagent 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), a fluorogenic dye that measures hydroxyl, peroxy and other ROS activity within the cell. After diffusion into the cell, DCFH-DA is deacetylated by cellular esterases to a non-fluorescent compound, which is later oxidized by ROS into 2,7-dichlorofluorescein (DCF) [24]. The method described by [25] for determination of ROS was used with slight modification. Briefly, 5×10^5 cells/well were distributed in 24-well plates for 24 hours and cells were incubated with 50 μ M DCFH-DA in PBS for 30 minutes at 37°C to allow cellular incorporation. After, cells were centrifuged, resuspended in 100 μ L of complete medium in 96-well plates and treated. ROS-dependent DCF fluorescence was monitored hour by hour during 9 hours at 37°C at 535 nm using excitation wavelength set at 485 nm in a 96-well plate fluorescence reader (Perkin Elmer, EnSpire®).

Nuclear and Cytoplasmic Protein Fractions Preparation

The method described by [26] for preparation cell protein fractions was used with slight modification. To prepare nuclear fractions, 7.7×10^5 cells/well were distributed in 6-well plates for 24 hours, treated or not, centrifugated at 750g for 5 minutes and resuspended in 200 μ L of hypotonic buffer consisting of 10mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol, 1:100 Protease Inhibitor Cocktail powder from Amresco (Solon, Ohio, USA) and incubated in ice for 15 minutes. Later, 10 μ L of 10% Nonidet P-40 was added and the swollen cells were disrupted by vortexing (15 seconds). Nuclei were isolated by centrifugation 14,000 g for 30 seconds, and pellet (intact nuclei) and supernatant (cytoplasmic) fractions were separated. Nuclear fraction was resuspended in 100 μ L of high salt buffer [10 mM HEPES (pH 7.9), 0,42M NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1:100 Protease Inhibitor Cocktail powder] and incubated for 40 minutes in ice bath releasing soluble nuclear proteins. After extraction, the nuclei debris (insoluble fraction) was removed by centrifugation 14,000 g for 15 minutes/4°C and supernatant containing soluble nuclear proteins was stored at -80°C until experiments.

Western Blotting

Western blotting was performed according to [27] with slight modification. Protein contents of the nuclear and cytoplasmic fraction of the each sample were measured following [28] and was added to samples 4% SDS stop solution (4% SDS, 50 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 6,8), 25% Glicerol sample and 8% β -mercaptoethanol. The proteins were separated by SDS-PAGE using 10% gels and then electrotransferred to nitrocellulose membranes. The membranes were washed in Tris-buffered saline with Tween containing 100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl and 0.1% Tween-20, pH7.5, and incubated overnight (4°C) with primary antibodies anti-rabbit NF-kB and β -Actin. Subsequently, membranes were washed in Tris-buffered saline with Tween and incubated for 1 hour at 25 °C with Anti-Rabbit IgG secondary antibody. The imunoblottings were visualized on the IS4000MM Pro Bruker imaging system using ECL-detection reagent and the band density was quantified using the Scion Image® software.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of, at least, three samples. Differences between two groups were evaluated by Student's t-test and between more than two groups by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *post-hoc* test when needed. Statistical differences were determined using Prism (version 5; GraphPad software) and were considered significant for p values less than 0.05.

RESULTS

CoCl₂ Decreases Cell Viability More In U937, After In JURKAT And Very Little In K562

To verify the possible antiproliferative effect of CoCl₂ in neoplastic cells, we analyzed the viability and cell cycle of three different hematopoietic cell lines (K562, U937 and JURKAT). Thus, cells were treated at different concentrations (0, 50, 100, 250 e 500 μM) and times (0, 6, 12, 24 e 48 hours). JURKAT and U937 cell lines were susceptible to CoCl₂ treatments. U937 cells presented significant decreases on cell viability at 48 hours when treated with 100 μM and at 24 hours when treated with 250 μM (Figure 1a). JURKAT cells did not present significant loss of viability when treated at 100 μM at all times tested, but presented significant loss of viability at 12 hours when treated with 500 μM; however, this effect was lower than 10%. This concentration caused a high decay of the viability at 24 hours, a phenomenon that was maintained up to 48 hours, different from the U937 which continued decaing. At concentration of 250 μM, JURKAT cells presented loss of viability at 24 hours, but this effect was lower than those observed for U937 cells (Figure 1b). On the other hand, K562 cells presented low susceptibility to the treatment with CoCl₂ presenting cytotoxicity lower than 10% when treated at 500 μM for 48 hours (Figure 1c).

CoCl₂ Inhibits Cell Proliferation In JURKAT, U937 And K562, But Only Promotes Sub G1 Events In JURKAT E U937

Taking into account the viability data, we analyzed the effect of CoCl₂ treatment on cell cycle using 100 μM or 250 μM for 6, 12 and 24 hours. Different from viability, the three cell lines had the cell cycle affected by CoCl₂ with a significant arrest at G2 phase. JURKAT and U937 cells presented significant sub G1 events from 12 hours and the arrest of cell cycle is statistically significant from 6 hours of treatment. K562 cells presented G2 arrest from 12 hours, but did not present sub-G1 events at any time (Figure 2).

CoCl₂ Induce Apoptosis in JURKAT and U937, But Not in K562 Cells

The induction of apoptosis was analyzed by the permeability alteration test using YOPRO and PI to mark apoptotic and dead cells, respectively. For these assays, we treated the cell lines with CoCl₂ 250μM and analyzed apoptosis by flow cytometry at 6, 12 and 24 hours. JURKAT and U937 cells presented apoptotic cells in 12 hours. K562 cells showed neither apoptotic nor dead cells, which was in agreement with lack of sub-G1 events (Figure 3a, 3b e 3c, respectively).

CoCl₂ Cause Augment of Reactive Oxygen Species (ROS)

Because ROS is involved in modulation of both proliferation and apoptosis events depending on stimuli and on cell type and there are some reports of augment of ROS induced by CoCl_2 , we analyzed the ROS level during 9 hours of treatment.

CoCl_2 induced ROS level augment in the three cell lines used in this work and relating to the initial time the augment was equal for the three cell lines; however, U937 cells (Figure 4a) (the most susceptible cell line to CoCl_2) presented augment of ROS level from the initial time while JURKAT and K562 cells presented a diminution of ROS level at initial time of analysis (Figure 4b and c, respectively).

NOTE: although we consider the initial time of analysis as 0 hours, there is a lag of time, lower than 5 minutes, between the treatment of all the cells and the read.

CoCl_2 Decrease the Expression NF-kB Transcription Factor in JURKAT E U937, But Not in K562 Cells

NF-kB has emerged as a crossroad of cells life and death, suppressing apoptosis and turning the cells resistance to oxidants and chemotherapeutic agents. Thus, we analyzed by western blotting the levels of cytoplasmic and nuclear NF-kB protein at the time and CoCl_2 concentration with more apoptotic events (250 μM for 24 hours) (Figure 5a). No treated U937 cells shown presence of cytoplasmic NF-kB, but in the nucleous it was lower than the detection level. When treated for 24 hours CoCl_2 , a decrease in the NF-kB expression was observed (Figure 5b). This effect was also observed in JURKAT cells; nevertheless, JURKAT shown a low nuclear content of NF-kB that could not be observed after the treatment for 24 hours (Figure 5c). On the other hand, K562 presented both cytoplasmic and nuclear in treated and non-treated cells without statistical difference in their levels (Figure 5d)

DISCUSSION

To test the possible antiproliferative effect of CoCl_2 in tumor cells, we analyzed the viability and cell cycle in three hematopoietic cell lines (K562, U937 and JURKAT). At low concentrations of CoCl_2 (equal to or less than 50 μM) no cell lines showed reduced cell viability, similar to those results shown by [9] using leukemic cells NB4 and U937. When higher concentrations were used (100 μM to 500 μM) it was observed a decrease in the viability of JURKAT and U937 cells, in a dose-dependent manner. In hepatoma CBRH -7919 cells, a gradual decrease was observed in cell viability as the CoCl_2 concentration increased from 100 μM to 800 μM [13]. However, in the present study, K562 cells showed greater resistance to the treatment, decreasing the viability only at 500 μM CoCl_2 during 48 hours; nevertheless, the viability remained higher than 90%.

CoCl₂ 200 μM for 24 hours also induced apoptosis in NB4 and U937, showing morphological features of apoptotic cells, annexin⁺/PI⁻ staining and time-dependent increase of hypoploid cells (also called sub-G1 cells) when analyzed by flow cytometry [9]. Our data were similar for JURKAT and U937 cells, which showed apoptosis from 12 hours of treatment with 250 μM CoCl₂. K562 cells did not show apoptosis, even at concentration of 500 μM for 48 hours. Therefore, K562 cells can be used as a good model to investigate the pathways altered by CoCl₂ that culminate in the cell death, in comparison with susceptible cells.

Initially, the apoptotic events caused by CoCl₂ were related with its potential to mimic hypoxia stabilizing the hypoxia-inducible factor (HIF-1α) in several cell lines [8, 7, 11]. Nevertheless, by using HIF-1α overexpression, [9] proposed that apoptosis in the leukemic cell lines studied was independent of HIF-1α, but dependent on mitochondrial pathways involving loss of mitochondrial transmembrane potential, activation Caspase-3/8 and Mcl-1 cleavage [9]. Also, it was shown the occurrence of decrease of the anti-apoptotic genes Bcl-2 and Bcl-xL and increase of p53-FAS and caspase-3/9 during the treatment with CoCl₂, but this events did not occurred when HIF-1α was overexpressed in He-La cells [10]. Thus, these works have raised the necessity to investigate other markers.

Some studies have shown that CoCl₂ is able to increase of ROS levels and lead cell to apoptosis [21, 29]. Our results showed that CoCl₂ induced apoptosis in JURKAT and U937 cells, but not K562. However, CoCl₂ have effect in the three cell lines because the cell cycle arrest in the G2 phase and increase of reactive oxygen species. PC3 cells are also resistant to CoCl₂ treatment, presenting elevated level of ROS, but without effects on cell viability [30]. Therefore, there should be a switch that allows the cells to withstand the injuries caused by the ROS increase or let them die.

Because K562 and PC3 cell lines possess constitutive activation of NF-kB [31,32] and this transcription factor is taken as a crossroad between cell life and death [33] we decided to analyze the expression of this protein in cytoplasmic and nuclear fractions after 24 hours of treatment. JURKAT and U937, cell lines that showed apoptosis, had a significant decrease in NF-kB after 24 hours of treatment, different from K562 cells that kept the NF-kB levels. This suggests that the maintenance of the viability after treatment with CoCl₂ could depend on mechanisms regulated by NF-kB.

The role of NF-kB in the viability maintenance in K562, JURKAT and U937 cells was shown by our group [25], showing that the NF-kB inhibitors BAY117082 and MG132

presented potent apoptotic effects compared to inhibitors of MAPKs, EGFR, PI3K/Akt, PKC and PKA signaling pathways.

In conclusion, CoCl₂ induces ROS formation and cell cycle arrest in G2 cells, but this is not sufficient to affect the cell viability. Cells that maintain the NF-κB expression during the treatment will maintain their viability, for at least 48 hours, otherwise they will undergo apoptosis. At the same time, the cell sensitivity to CoCl₂ will be partially depending on NF-κB pathways as an immediate response to cell stress caused by cobalt. Further studies should be done to bring out the mechanisms by which the CoCl₂ decreases the NF-κB expression in susceptible cells using the cellular model here presented.

ACKNOWLEDGMENT

We thank to Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) by help with scholarship and purchase some reagents and equipment.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing or financial interests.

REFERENCES

- [1] Vengellur A, LaPres JJ. The Role of Hypoxia Inducible Factor 1 α in Cobalt Chloride Induced Cell Death in Mouse Embryonic Fibroblasts. *Toxicological Sciences* 2004; 82: 638–46.
- [2] Barceloux DG. Cobalt. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology* 1999; 37: 201–6.
- [3] Jelkmann W. The Disparate Roles of Cobalt in Erythropoiesis, and Doping Relevance. *Open Journal of Hematology* 2012; 3.
- [4] Unice KM, Monnot AD, Gaffney SH, et al. Inorganic cobalt supplementation: Prediction of cobalt levels in whole blood and urine using a biokinetic model. *Food and Chemical Toxicology* 2012; 50: 2456–61.
- [5] Tvermoes BE, Finley BL, Unice KM, et al. Cobalt whole blood concentrations in healthy adult male volunteers following two-weeks of ingesting a cobalt supplement. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 53: 432–9.
- [6] Lippi G, Franchini M, Guidi GC. Blood doping by cobalt. Should we measure cobalt in athletes? *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)* 2006; 1: 18.

- [7] Kim HJ, Yang S-J, Kim YS, Kim TU. Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase activation in human cervical cancer HeLa cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2003; 36: 468–74.
- [8] Yang S-J, Pyen J, Lee I, et al. Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation in rat C6 glioma cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2004; 37: 480–6.
- [9] Guo M, Song L-P, Jiang Y, et al. Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 2006; 11: 67–77.
- [10] Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, et al. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free Radical Research* 2006; 40: 847–56.
- [11] Ardyanto TD, Osaki M, Nagahama Y, et al. Down-regulation of cobalt-induced HIF-1alpha expression correlates with cell proliferation and apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Oncology Reports* 2008; 19: 339–43.
- [12] Bedessem B, Montmasson MP, Hamel M, Giroud F, Stéphanou A. Effects of the Hypoxia Mimetic Agents DFO and CoCl₂. *Journal of Cell Biology and Cell Metabolism* 2015; 2: 004.
- [13] Xu L-F, Ni J-Y, Sun H-L, Chen Y-T, Wu Y-D. Effects of hypoxia-inducible factor-1 α silencing on the proliferation of CBRH-7919 hepatoma cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2013; 19: 1749–59.
- [14] Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004; 5:343-354.
- [15] Mazure NM, Brahim-Horn MC, Berta MA, et al. HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68: 971–80.
- [16] Mole DR, Blancher C, Copley RR, et al. Genome-wide Association of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA Binding with Expression Profiling of Hypoxia-inducible Transcripts. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 16767–75.
- [17] Zou W, Yan M, Xu W, et al. Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation. *Journal of Neuroscience Research* 2001; 64: 646–53.

- [18] Jung J-Y, Kim W-J. Involvement of mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism in CoCl₂-induced apoptosis of rat PC12 cells. *Neuroscience Letters* 2004; 371: 85–90.
- [19] Lee J-H, Choi S-H, Baek M-W, et al. CoCl₂ induces apoptosis through the mitochondria- and death receptor-mediated pathway in the mouse embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2013; 379: 133–40.
- [20] Dai Z-J, Gao J, Ma X-B, et al. Up-regulation of hypoxia inducible factor-1 α by cobalt chloride correlates with proliferation and apoptosis in PC-2 cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 2012; 31: 28.
- [21] Lee J-H, Choi S-H, Baek M-W, et al. CoCl₂ induces apoptosis through the mitochondria- and death receptor-mediated pathway in the mouse embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2013; 379: 133–40.
- [22] Ardyanto TD, Osaki M, Tokuyasu N, Nagahama Y, Ito H. CoCl₂-induced HIF-1 α expression correlates with proliferation and apoptosis in MKN-1 cells: a possible role for the PI3K/Akt pathway. *International Journal of Oncology* 2006; 29: 549–55.
- [23] Overton WR, McCoy JP. Reversing the effect of formalin on the binding of propidium iodide to DNA. *Cytometry* 1994; 16: 351–6.
- [24] LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology* 1992; 5: 227–31.
- [25] Zanotto-Filho A, Delgado-Cañedo A, Schröder R, et al. The pharmacological NF κ B inhibitors BAY117082 and MG132 induce cell arrest and apoptosis in leukemia cells through ROS-mitochondria pathway activation. *Cancer Letters* 2010; 288: 192–203.
- [26] Zanotto-Filho A, Gelain DP, Schröder R, et al. The NF κ B-mediated control of RS and JNK signaling in vitamin A-treated cells: duration of JNK-AP-1 pathway activation may determine cell death or proliferation. *Biochemical Pharmacology* 2009; 77: 1291–301.
- [27] Posser T, Franco JL, Bobrovskaya L, et al. Manganese induces sustained Ser40 phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 2009; 110: 848–56.
- [28] Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 1977; 83: 346–56.
- [29] Guan D, Su Y, Li Y, et al. Tetramethylpyrazine inhibits CoCl₂ -induced neurotoxicity through enhancement of Nrf2/GCLC/GSH and suppression of HIF1 α /NOX2/ROS pathways. *Journal of Neurochemistry* 2015; 134: 551–65.

- [30] Lu N, Zhou H, Lin Y, et al. Oxidative Stress Mediates CoCl₂-Induced Prostate Tumour Cell Adhesion: Role of Protein Kinase C and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2007; 101: 41–6.
- [31] Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes & Development* 1998; 12: 968–81.
- [32] Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, et al. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *Journal of Cell Science* 2002; 115: 141–51.
- [33] Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature Immunology* 2002; 3: 221–7.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of CoCl_2 on the viability of U937 **(a)**, JURKAT **(b)** and K562 **(c)** cells. Cells were treated at different concentration of CoCl_2 (0, 50, 100, 250 and 500 μM) for 0, 6, 12, 24 and 48 hours. Data are expressed as Mean \pm SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figure 2. Evaluation of percentage of Sub-G1 and G2 events in JURKAT, U937 and K562 cells treated with CoCl_2 (0, 100 e 250 μM) during 6, 12 and 24 hours. Data are expressed as Mean \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

NOTE: Representative cell cycle histograms of JURKAT, U937 and K562 cells treated with CoCl_2 (0, 100 and 250 μM) during 12 hours are presented on supplementary information (Figure S1).

Figure 3. Effect of CoCl_2 on apoptosis. **(a)** JURKAT, **(b)** U937 and **(c)** K562 cells were treated with CoCl_2 (250 μM) for 12 and 24 hours. Live cells (YO-PRO- PI-), Apoptosis (YO-PRO+ PI-), Dead Early (YO-PRO+PI+) and Dead Later (YO-PRO- PI+) were determined by flow cytometry. Data are expressed as Mean \pm SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Propidium Iodide (PI). NOTE: Representative density plot graphics of apoptosis assay of JURKAT, U937 and K562 cells treated with CoCl_2 (0 and 250 μM) during 12 hours are presented on supplementary information (Figure S2).

Figure 4. Effect of CoCl_2 (250 μM) on ROS level (DCF assay) in **(a)** JURKAT, **(b)** U937 and **(c)** K562 cells. Data are expressed as Mean \pm SEM. Data were normalized to their respective controls (1000 Fluorescence Units). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figure 5. Western blotting images **(a)** and densitometry analysis of NF- κ B in cytoplasmic (cyto) and nuclear (nucleus) protein fraction. U937 **(b)**, JURKAT **(c)**, and K562 **(d)** cells were treated with CoCl_2 (250 μM) for 24 hours. Data are expressed as Mean \pm SEM of the ratio between NF- κ B and β -actin expression. Densitometric analysis of immunoreactive bands was performed using Scion Image® software. Beta-actin was used as loading control. * $p < 0.05$.

SUPPLEMENTARY INFORMATION LEGENDS

Figure S1 – Representative cell cycle histograms of JURKAT, U937 and K562 cells treated with CoCl_2 (0, 100 and 250 μM) during 12 hours.

Figure S2 - Representative density plot graphics of apoptosis assay of JURKAT, U937 and K562 cells treated with CoCl_2 (0 and 250 μM) during 12 hours.

FIGURES

Figure 1

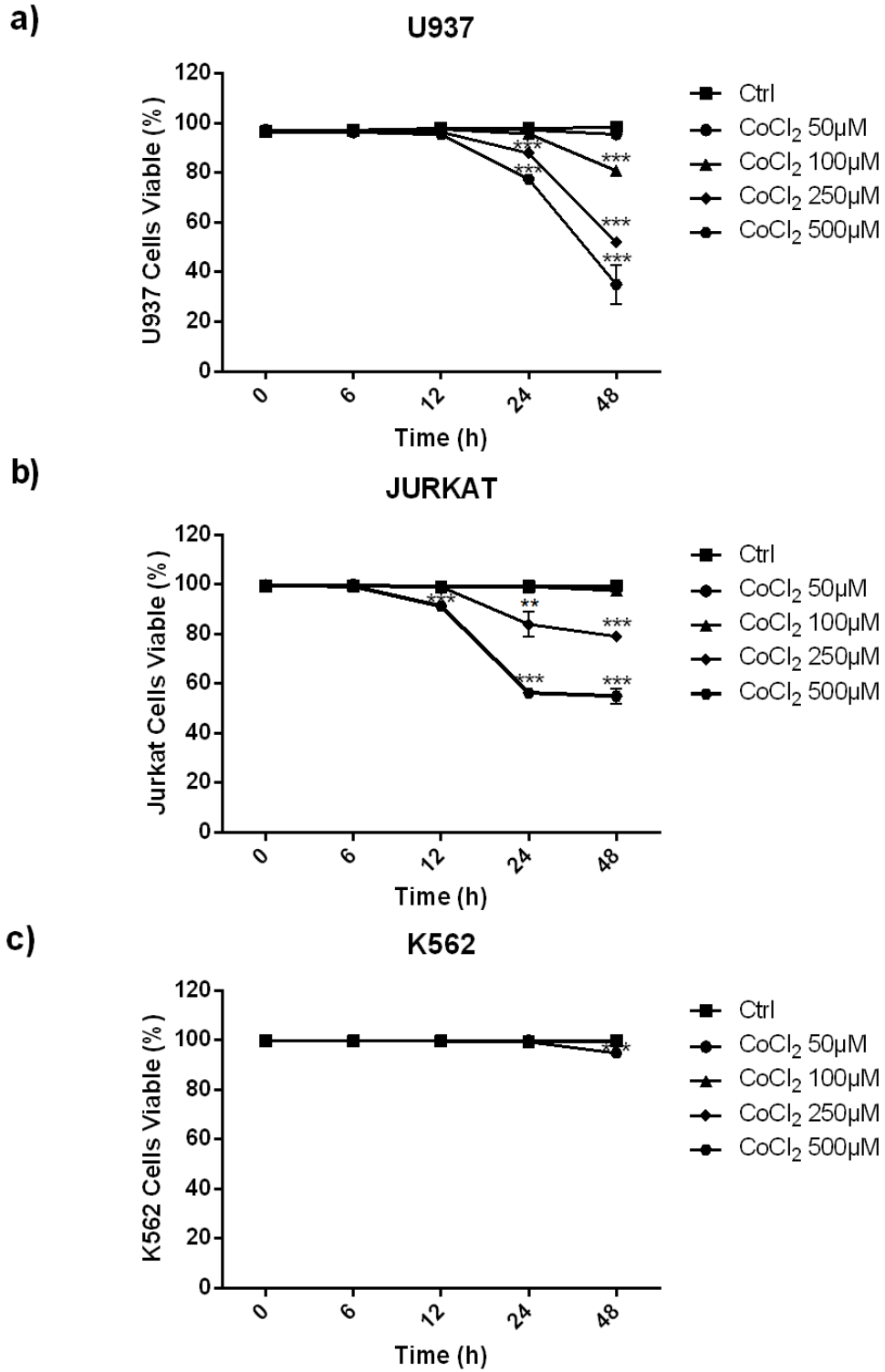


Figure 2

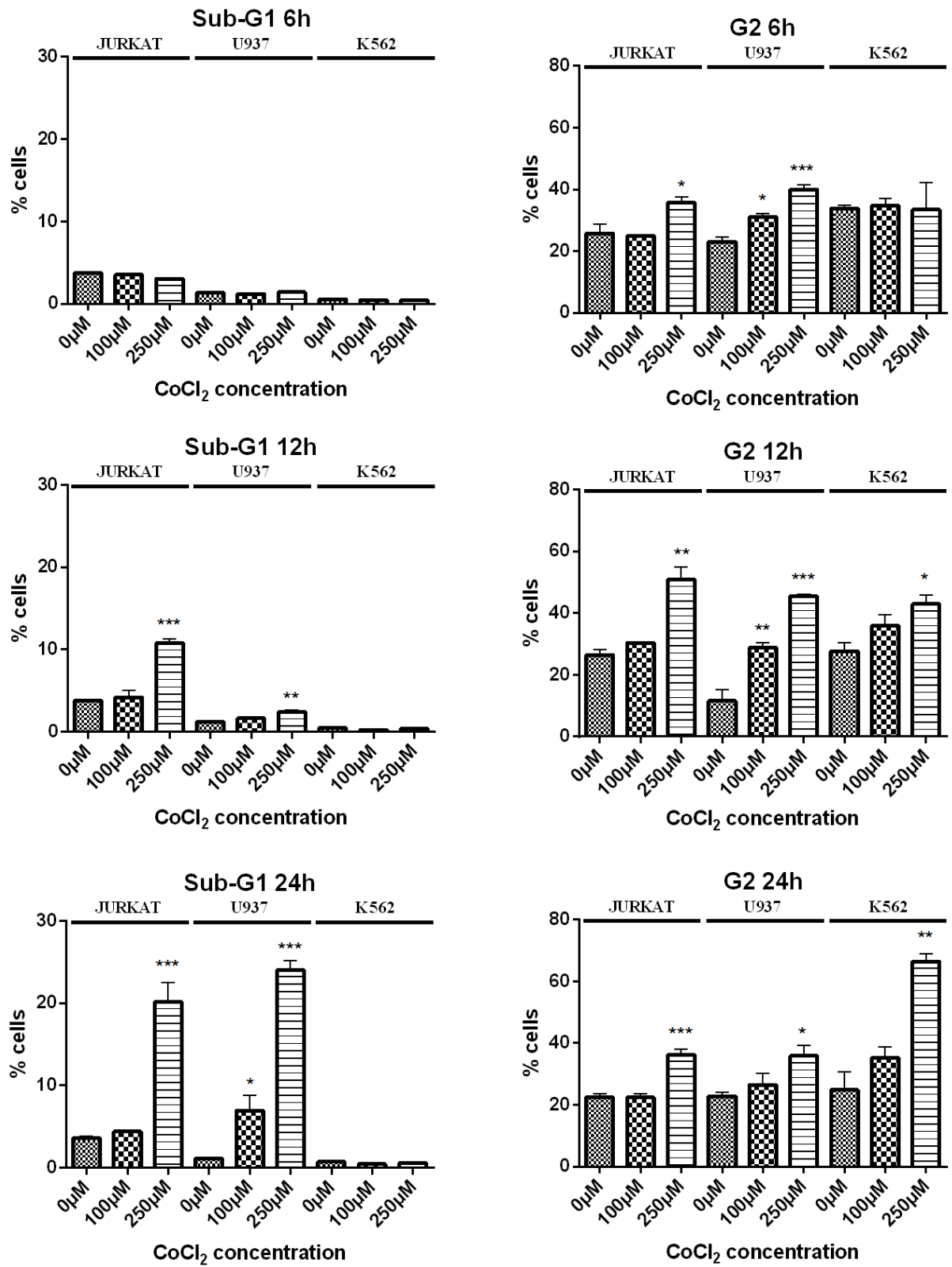


Figure 3

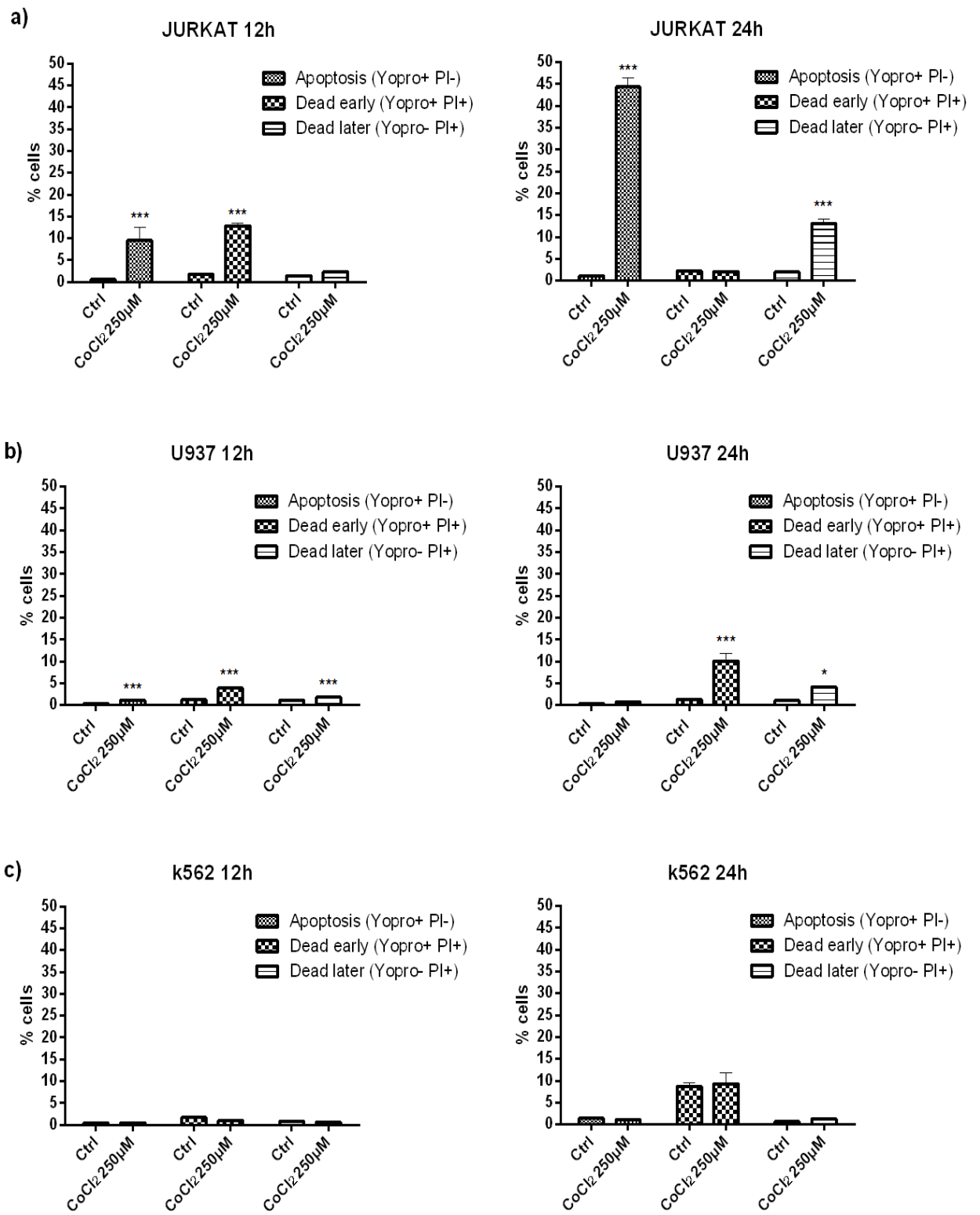


Figure 4

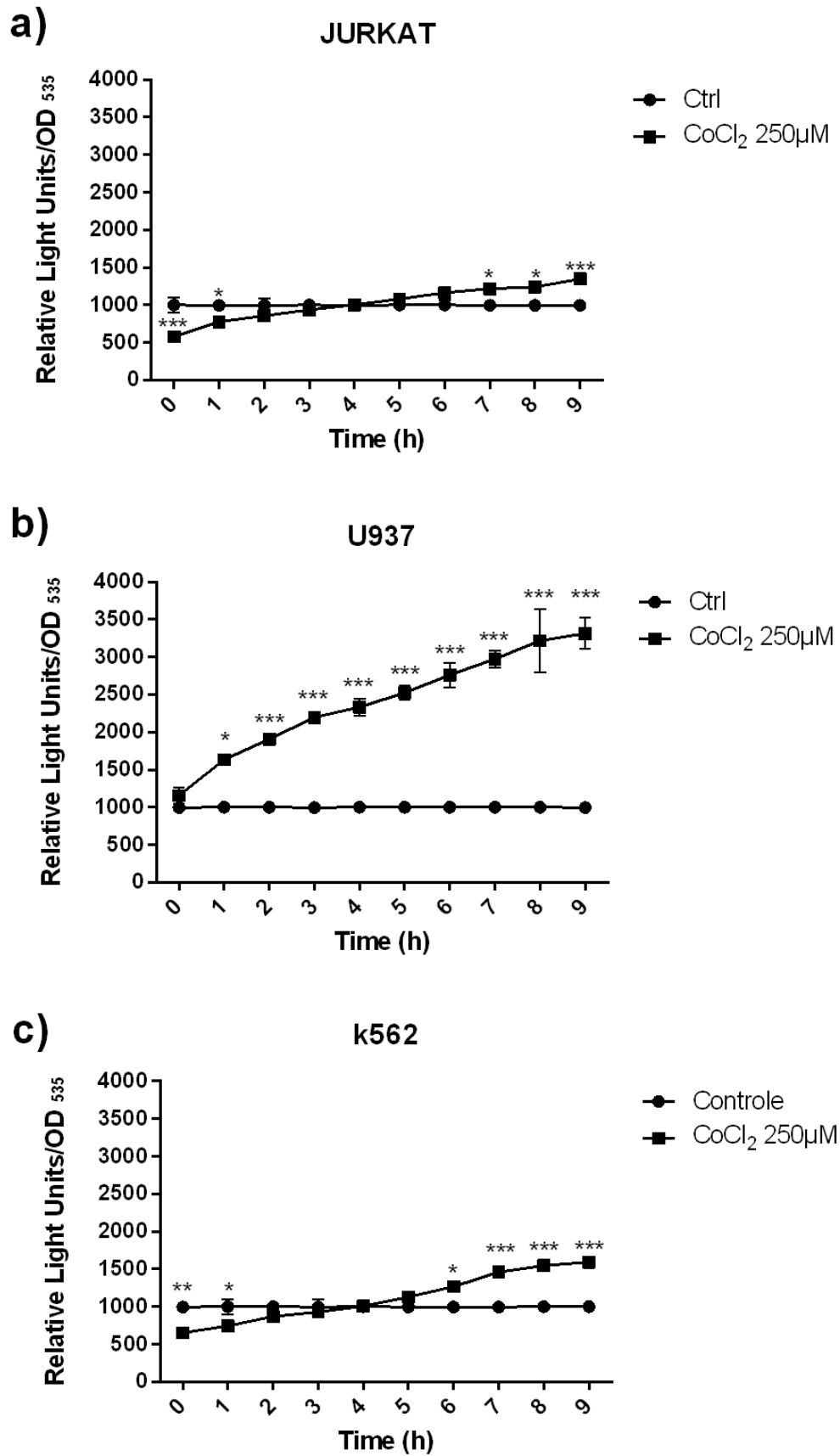
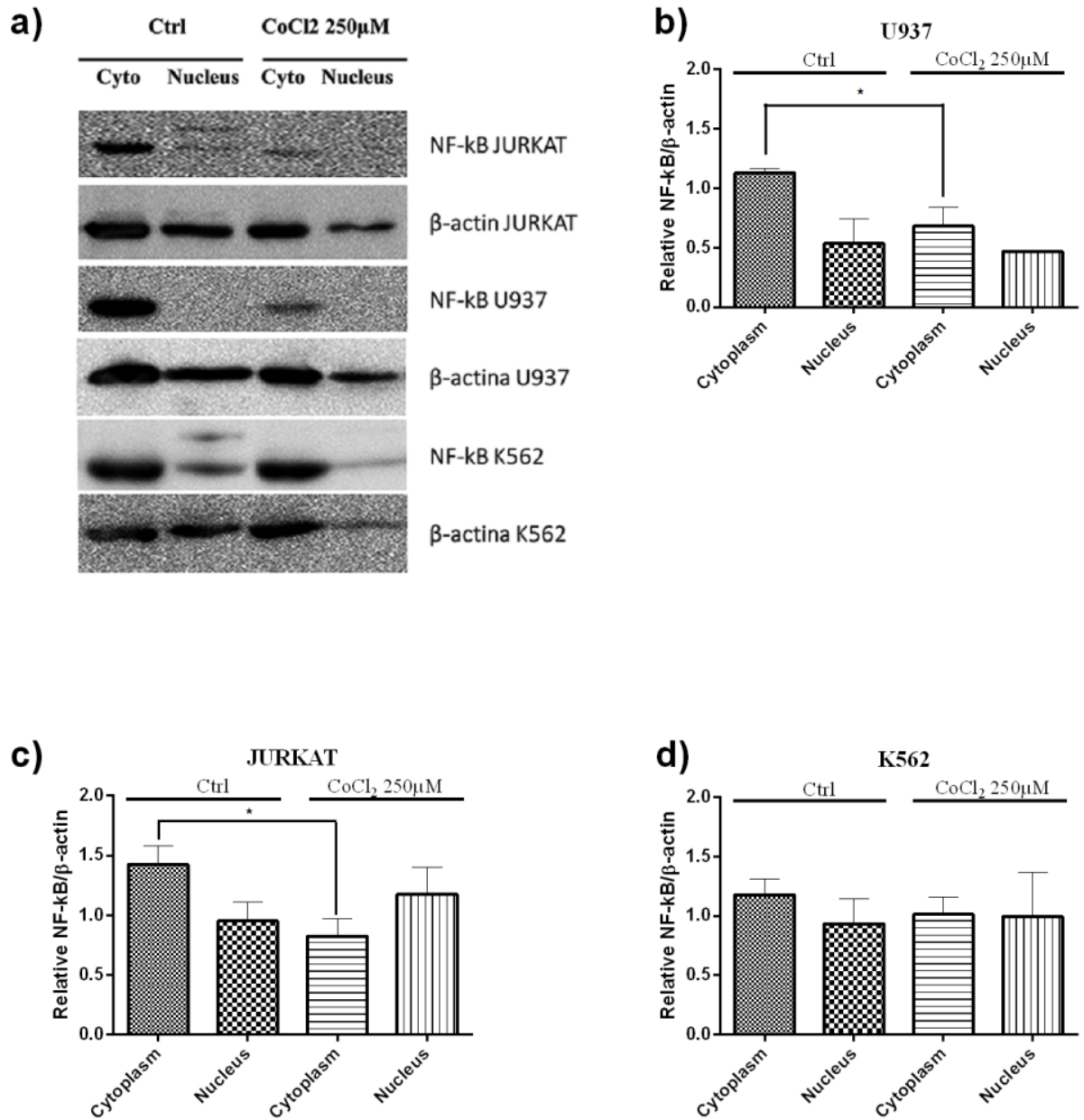


Figure 5



SUPPLEMENTARY INFORMATION

Figure S1

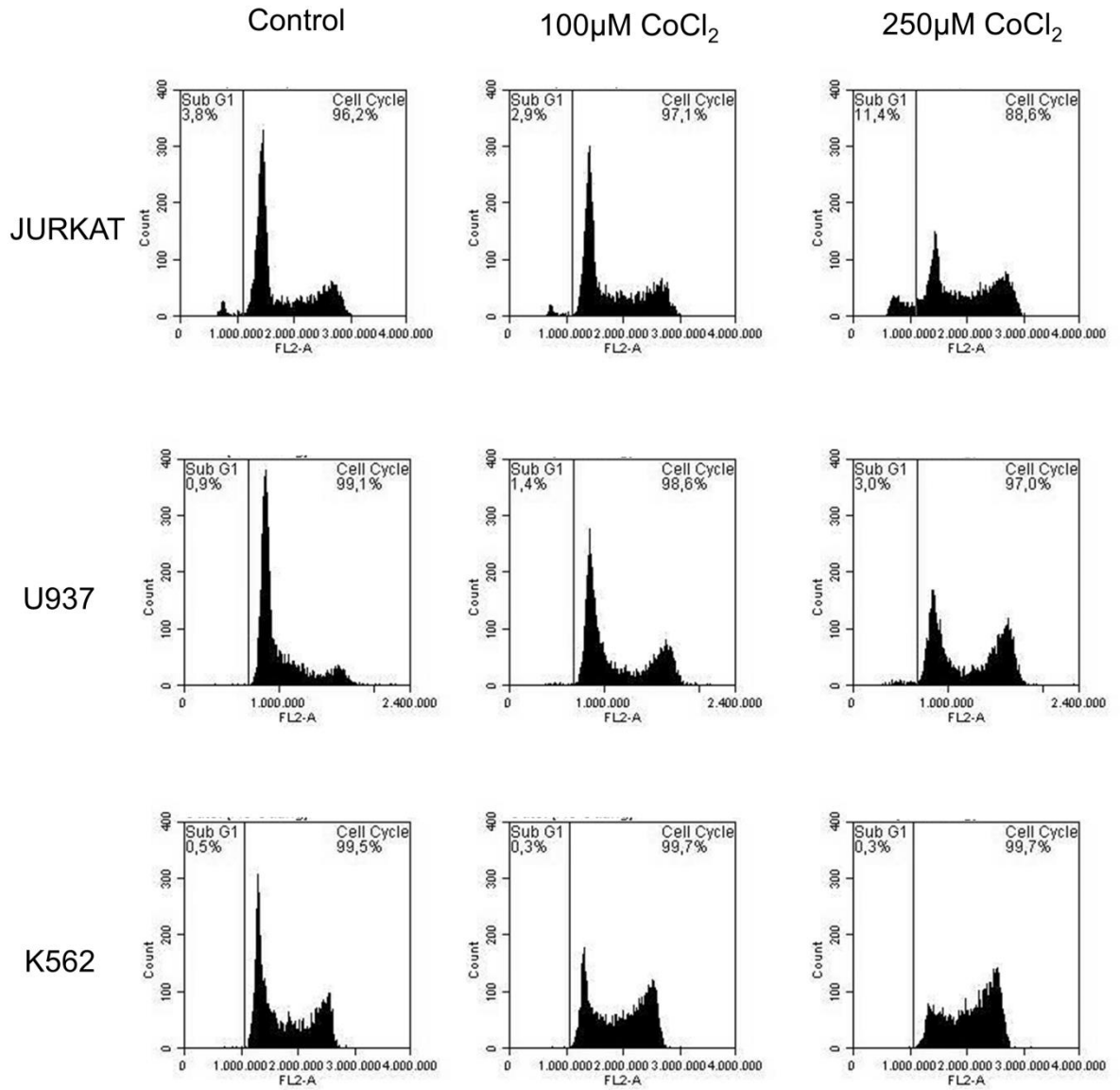
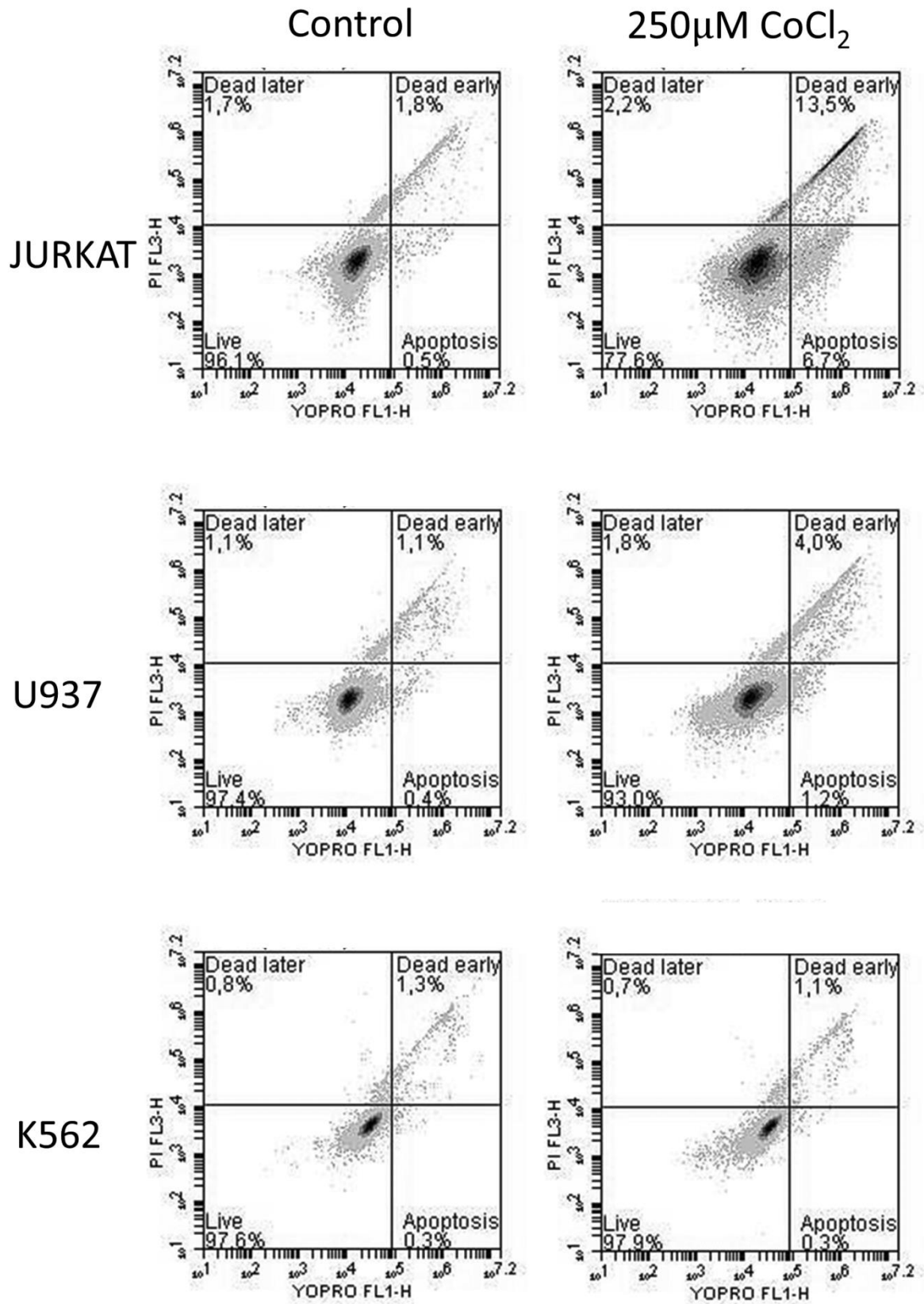


Figure S2



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O propósito principal deste trabalho foi apresentar e analisar os efeitos anti-proliferativos do Cloreto de Cobalto (CoCl_2) em três linhagens de células leucêmicas derivadas de diferentes precursores hematopoiéticos. Através da análise da linhagem JURKAT (derivada de precursor linfóide), U937 (derivada de precursor mielóide) e K562 (derivada de precursor eritróide), após tratamento com CoCl_2 no tempo de 0, 6, 12, 24 e 48 horas (nas concentrações de 0 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM) conseguimos obter um melhor acompanhamento dos eventos e observar que estas linhagens demonstraram características próprias formando três diferentes modelos para analisar.

A linhagem JURKAT demonstrou ter mais eventos apoptóticos ($\text{YOPRO}^+/\text{PI}^-$), com presença de população de eventos sub-G1 e parada na fase G2 no ciclo celular. A linhagem U937 teve mais eventos de morte ($\text{YOPRO}^+/\text{PI}^+$), possivelmente uma passagem mais rápida pelos eventos apoptóticos, e demonstrou ser mais suscetível ao CoCl_2 , sendo que foi a primeira a demonstrar diminuição da viabilidade celular e, também, demonstrou aumento no nível de ERO sem inibição inicial ao comparar com seu respectivo controle, diferente das outras duas linhagens. Esta mesma linhagem também demonstrou população de eventos sub-G1 e parada na fase G2 no ciclo celular. A linhagem K562 não demonstrou eventos apoptóticos, mas teve parada na fase G2 do ciclo celular e aumento de espécies reativas na mesma proporção que as demais linhagens porém com inibição inicial ao comparar com seu respectivo controle como na linhagem JURKAT, isto demonstra que o aumento de ERO e parada no ciclo celular não é suficiente para levar as células à apoptose e outro/s fator/es poderiam estar atuando para manter vivas estas células durante o tratamento.

A partir desses dados foi possível observar eventos em comum, a parada no ciclo celular na fase G2 e um aumento crescente na oxidação do DCF, podendo ser uma característica do CoCl_2 como mostrado em outros trabalhos. Porém, analisando três linhagens com características e comportamentos diferentes e acompanhando o tratamento em vários horários, sem intervalos muito longos conseguimos notar a inibição inicial no nível de ERO no tempo 0 e 1 hora nas linhagens JURKAT e K562 e que a parada no ciclo celular na linhagem K562 começou mais tarde e foi maior do que nas demais linhagens, dados que podemos relacionar com a capacidade de maior ou menor susceptibilidade ao tratamento. Assim, após as análises, foi possível ordenar as células numa ordem crescente de resistência ao CoCl_2 : U937 < JURKAT < K562.

Através das análises de viabilidade celular, ciclo celular, apoptose e DCF conseguimos notar o efeito antiproliferativo e outros eventos característicos do efeito do CoCl_2 . Entretanto, para cercar ainda mais o mecanismo envolvido na manutenção da viabilidade durante o tratamento com CoCl_2 , observada na linhagem K562, foi analisado o fator de transcrição NF- κ B, uma proteína que tem um importante papel de *switch* entre a manutenção ou perda da viabilidade. A linhagem K562 não teve eventos apoptóticos significativos e os níveis de expressão do fator de transcrição NF- κ B se mantiveram constantes durante o tratamento, enquanto que as linhagens apoptóticas apresentaram uma elevada diminuição na expressão deste fator de transcrição ao comparar com seus respectivos controles. Esses dados abrem caminho para a investigação das vias que resultam na expressão do NF- κ B e que mantêm mecanismos de resistência ao tratamento com CoCl_2 , podendo ser vias antiapoptóticas, antioxidantes, entre outras.

REFERÊNCIAS

ABCAM. **U937 (Human leukemic monocyte lymphoma cell line) Nuclear Lysate.**

Disponível em: <<http://www.abcam.com/u937-human-leukemic-monocyte-lymphoma-cell-line-nuclear-lysate-ab14906.html>>. Acesso em: 06 de ago de 2015.

ABCAM. **An overview of NF- κ B signaling in health and disease by Claudie Hooper.**

Disponível em: <<http://www.abcam.com/research-areas/overview-of-nf-kb-signaling>>. Acesso em: 01 de dez de 2015.

AKBAR, M.; BREWER, J. M.; GRANT, M. H. Effect of chromium and cobalt ions on primary human lymphocytes in vitro. **Journal of Immunotoxicology**, v. 8, n. 2, p. 140–149, jun. 2011.

ALEXANDER, C. S. Cobalt-beer cardiomyopathy. A clinical and pathologic study of twenty-eight cases. **The American Journal of Medicine**, v. 53, n. 4, p. 395–417, out. 1972.

ALEXANDERSSON, R. Blood and urinary concentrations as estimators of cobalt exposure. **Archives of Environmental Health**, v. 43, n. 4, p. 299–303, ago. 1988.

ALMEIDA et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALTMAN, J. K.; SASSANO, A.; PLATANIAS, L. C. Targeting mTOR for the treatment of AML. New agents and new directions. **Oncotarget**, v. 2, n. 6, p. 510–517, jun. 2011.

ATCC. **JURKAT, CLONE E6-1 (ATCC® TIB-152™).** Disponível em: <<http://www.atcc.org/Products/All/TIB-152.aspx#generalinformation>>. Acesso em: 06 de ago de 2015.

BARCELOUX, D. G. Cobalt. **Journal of Toxicology. Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 201–206, 1999.

BARRERA, G. **Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy.** International Scholarly Research Network ISRN Oncology Volume 2012, Article ID 137289, 21 pages doi:10.5402/2012/137289

CELEROMICS. **Jurkat Cells.** Disponível em: <<http://www.celeromics.com/en/Support/cell-lines/jurkat.php>>. Acesso em: 06 de ago de 2015.

CHANARIN, I. Megaloblastic anaemia, cobalamin, and folate. **Journal of Clinical Pathology**, v. 40, n. 9, p. 978–984, set. 1987.

CILLONI, D. et al. The NF-kappaB pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome imatinib resistance. **Leukemia**, v. 20, n. 1, p. 61–67, jan. 2006.

CRAMER, P.; HALLEK, M. Hematological cancer in 2011: New therapeutic targets and treatment strategies. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 9, n. 2, p. 72–74, fev. 2012.

CREE, I. A. (ED.). Establishment and Culture of Leukemia–Lymphoma Cell Lines - Springer. In: *Methods in Molecular Biology*. [s.l.] Humana Press, 2011.

CRISPIM, G. **Esquema Hematopoiese**. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/gildocrispim/celulas-do-sistema-imunolgico1>>. Acesso em: 24 nov. 2015.

CURTIS, J. R. et al. Possible cobalt toxicity in maintenance hemodialysis patients after treatment with cobaltous chloride: a study of blood and tissue cobalt concentrations in normal subjects and patients with terminal and renal failure. **Clinical Nephrology**, v. 5, n. 2, p. 61–65, fev. 1976.

DEININGER, M.; BUCHDUNGER, E.; DRUKER, B. J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2640–2653, 1 abr. 2005.

DREXLER, H. G. 2 - History and Classification of Hematopoietic Cell Lines. In:

DREXLER, H. G. (Ed.). . **The Leukemia-Lymphoma Cell Line FactsBook**. Factsbook. London: Academic Press, 2001. p. 12–21.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

GARCÍA, M. G. et al. Inhibition of NF-kappaB activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines. **Leukemia Research**, v. 29, n. 12, p. 1425–1434, dez. 2005.

GARCÍA, J. **Fases do ciclo celular**. Disponível em: <<http://cienciasdejoseleg.blogspot.com.br/2013/09/introduccion-al-ciclo-celular.html>>. Acesso em: 24 nov. 2015.

GOLDWASSER, E. et al. Studies on erythropoiesis. V. The effect of cobalt on the production of erythropoietin. **Blood**, v. 13, n. 1, p. 55–60, jan. 1958.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55, p.335-343, 2007.

GUO, M. et al. Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms. **Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death**, v. 11, n. 1, p. 67–77, jan. 2006.

JELKMANN, W. The Disparate Roles of Cobalt in Erythropoiesis, and Doping Relevance. **Open Journal of Hematology**, v. 3, p. 3-6, dec. 2012.

JENSEN, P. et al. Increased cellular hypoxia and reduced proliferation of both normal and leukaemic cells during progression of acute myeloid leukaemia in rats. **Cell Proliferation**, v. 33, n. 6, p. 381–395, 1 dez. 2000.

- Jl, L. L.; GOMEZ-CABRERA, M.-C.; VINA, J. Role of nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase signaling in exercise-induced antioxidant enzyme adaptation. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquée, Nutrition Et Métabolisme**, v. 32, n. 5, p. 930–935, out. 2007.
- JUNGWIRTH, U. et al. Anticancer Activity of Metal Complexes: Involvement of Redox Processes. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 4, p. 1085–1127, 15 ago. 2011.
- KADOWAKI, N.; KITAWAKI, T. Recent advance in antigen-specific immunotherapy for acute myeloid leukemia. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2011, p. 104926, 2011.
- KAMIGUTI, A. S. et al. Expression and Activity of NOX5 in the Circulating Malignant B Cells of Hairy Cell Leukemia. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 8424–8430, 15 dez. 2005.
- KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 18 nov. 2004.
- KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, ago. 1972.
- KININGHAM, K. K. et al. All-trans-retinoic acid induces manganese superoxide dismutase in human neuroblastoma through NF-kappaB. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1610–1616, 15 abr. 2008.
- KRISS, J. P.; CARNES, W. H.; GROSS, R. T. Hypothyroidism and thyroid hyperplasia in patients treated with cobalt. **Journal of the American Medical Association**, v. 157, n. 2, p. 117–121, 8 jan. 1955.
- LEGGETT, R. W. The biokinetics of inorganic cobalt in the human body. **The Science of the Total Environment**, v. 389, n. 2-3, p. 259–269, 25 jan. 2008.
- LONGO, D. L. et al. **Manual de Medicina de Harrison - 18ed.** [s.l.] AMGH Editora, 2013.
- LOZZIO, C. B.; LOZZIO, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**, v. 45, n. 3, p. 321–334, mar. 1975.
- MANIFOLD, I. H.; PLATTS, M. M.; KENNEDY, A. Cobalt cardiomyopathy in a patient on maintenance haemodialysis. **British Medical Journal**, v. 2, n. 6152, p. 1609, 9 dez. 1978.
- MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 1, p. 1–15, jul. 2002.
- MATÉS, J. M. et al. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 5, p. 273–299, maio 2008.

MAXWELL, P.; SALNIKOW, K. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. **Cancer Biology & Therapy**, v. 3, n. 1, p. 29–35, jan. 2004.

MOROTTI, A. et al. NF- κ B inhibition as a strategy to enhance etoposide-induced apoptosis in K562 cell line. **American Journal of Hematology**, v. 81, n. 12, p. 938–945, dez. 2006.

National Cancer Institute. A Snapshot of Leukemia. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/research/progress/snapshots/leukemia>>. Acesso em: 9 ago. 2015.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 81, n. 11, p. 2844–2853, 1 jun. 1993.

PACIFICO & LEONARDI. NF- κ B in solid tumors. **Biochemical pharmacology**, v. 72, p. 1142–1152, 31 julh. 2006.

PAGNANO. **Leucemia Mielóide Crônica – causas de falha do tratamento com mesilato de imatinibe.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 30, suppl.1, abr.2008.

PALEY, K. R.; SOBEL, E. S.; YALOW, R. S. Effect of oral and intravenous cobaltous chloride on thyroid function. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 8, p. 850–859, ago. 1958.

PETIT, A. et al. Induction of protein oxidation by cobalt and chromium ions in human U937 macrophages. **Biomaterials**, v. 26, n. 21, p. 4416–4422, jul. 2005.

PHAM, C. G. et al. Ferritin heavy chain upregulation by NF- κ B inhibits TNF α -induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. **Cell**, v. 119, n. 4, p. 529–542, 12 nov. 2004.

RIEGER, M. A.; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 12, dez. 2012.

RUBIN et al. **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina.** 4a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.

SALMONM, S.E. **Farmacología Básica & Clínica**, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 629-655, 1998.

SCHNEIDER, U.; SCHWENK, H. U.; BORNKAMM, G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 19, n. 5, p. 621–626, 15 maio 1977.

SIMONSEN, L. O.; HARBAK, H.; BENNEKOU, P. Cobalt metabolism and toxicology--a brief update. **The Science of the Total Environment**, v. 432, p. 210–215, 15 ago. 2012.

SISON, E. A. R.; BROWN, P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. **Expert Review of Hematology**, v. 4, n. 3, p. 271–283, jun. 2011.

- SUNDSTRÖM, C.; NILSSON, K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 17, n. 5, p. 565–577, 15 maio 1976.
- SZATROWSKI, T. P.; NATHAN, C. F. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. **Cancer Research**, v. 51, n. 3, p. 794–798, 2 jan. 1991.
- UEDA, N. & SHAH, V. Tubular cell damage in acute renal failure - apoptosis, necrosis, or both. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v15, n. 3, p. 318-323, 2000.
- VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Cobalamina (Vitamina B12)** Força-tarefa Alimentos Fortificados e Suplementos. Comitê de Nutrição ILSI Brasil. ILSI Brasil International Life Sciences Institute do Brasil, 2010. Disponível em: < <http://www.ilsil.org/Brasil/Documents/13%20-%20Cobalamina.pdf>>.
- WANG, G. et al. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat neuronal PC12 cells. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 10, p. 2135–2140, 15 maio 2000.
- ZHOU, Y. et al. Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4098–4104, 15 maio 2003.