

Cytotoxicity of N-nitrosoguanidines in a breast cancer cell model

Citotoxicidade de N-nitrosoguanidinas num modelo celular de cancro da mama

Nuno Almeida¹, Lara Ribeiro², João G. Costa¹, Patrícia Rijo¹, M. Eduarda Araújo², Nuno Saraiva¹, Ana S. Fernandes¹

¹CBIOS, Universidade Lusófona Research Center for Biosciences & Health Technologies, Lisboa, Portugal;

²Centro de Química e Bioquímica / Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 1749-016 Lisboa, Portugal
Email: ana.fernandes@ulusofona.pt

Abstract

Nitric oxide (NO) is a biologically important molecule with diverse functions in the human body. In recent years, there has been a growing interest in the potential use of NO donors in cancer therapy, since several studies have shown that the regulation of NO levels influences various pro or antitumor processes. The anticancer effects of NO donors have already been described in different in vitro and in vivo studies. The aim of this preliminary study was to evaluate the antitumor potential of two compounds of the N-nitrosoguanidines family, L1 (1-nitroso-1-methyl-3-benzoylguanidine) and L2 (1-nitroso-1-methyl-3-tolylsulfonylguanidine). The compounds did not show significant in vitro cytotoxicity in the human breast cancer cell model MDA-MB-231. However, further studies will be needed to duly elucidate their antitumor potential. The use of other cancer cell models and the combination of L1 and L2 with radiotherapy or with chemotherapy agents may constitute interesting approaches for future studies.

Keywords: N-nitrosoguanidines, NO donors, breast cancer, cytotoxicity

Resumo

O monóxido de nitrogénio (NO) é uma molécula biologicamente importante com diversas funções no organismo humano. Recentemente, tem havido um interesse crescente na potencial utilização de dadores de NO em terapêutica oncológica, havendo diversos estudos que demonstram que a regulação dos níveis de NO influencia diversos processos pró- ou antitumorais. Os efeitos antitumorais dos dadores de NO foram já descritos em diferentes estudos in vitro e in vivo. O objetivo deste estudo preliminar foi avaliar o potencial antitumoral de dois compostos da família das N-nitrosoguanidinas, L1 (1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina) e L2 (1-nitroso-1-metil-3-tolilsulfonilguanidina). Os compostos não apresentaram citotoxicidade significativa na linha celular humana de cancro da mama MDA-MB-231. Contudo, serão necessários estudos adicionais para elucidar mais corretamente o seu potencial antitumoral. A utilização de outros modelos celulares de cancro e a combinação destes agentes com radioterapia ou com fármacos quimioterapêuticos podem constituir abordagens interessantes para estudos futuros.

Palavras-chave: N-nitrosoguanidinas, dadores de NO, cancro da mama, citotoxicidade

Introduction

NO is a ubiquitous signaling, regulatory and effector molecule with various biological effects on the human body at the level of the vascular, neuronal and immune systems (1-3). NO is synthesized *in vivo* by three different NO synthases (NOS), including nNOS and eNOS, which are constitutively expressed in neuronal and endothelial cells, respectively, and iNOS which is transcriptionally regulated and induced by inflammatory cytokines, oxidative stress, hypoxia and some endotoxins (3). The wide range of NO-mediated functions occurs mostly through a cGMP-dependent pathway, leading to vasodilation, neurotransmission, inhibition of platelet aggregation, and relaxation of smooth muscle. A second cGMP-independent pathway is the NO reaction with molecular oxygen, reactive oxygen species (ROS), thiols, and transition metals. NO can also directly modify proteins without the intervention of enzymes by nitration or nitrosylation (2-3). *S*-nitrosylation of thiol groups of cysteine residues is a reversible modification that is involved in several cellular signaling processes, which regulate the function of several intracellular proteins (2-3).

NO donors, such as nitroglycerin, have been approved for clinical use to treat cardiovascular diseases. Recently, the potential usefulness of such compounds in cancer therapy has been suggested (4). Regarding cancer, NO is known to have a dichotomic effect, with pro- or anti-cancer effects, depending on its concentration, microenvironment and cell type (2-3). At low concentrations of NO (< 100 nM), there is an association with increased angiogenic and proliferative processes, as well as with resistance to apoptosis. On the other hand, high concentrations of NO (> 500 nM) are associated with increased cytotoxicity and apoptosis (1-3). The NO anti-tumor mechanisms include the induction of p53 protein (5), proteosomal degradation of anti-apoptotic molecules, cytochrome C release with increased mitochondrial permeability, Smac / DIABLO complex release, and direct *S*-nitrosylation of NF- κ B, SNAIL and YY1 transcription factors (3,6). The role of NO in cancer therapies is related with hypoxia and hyponitroxia. Hypoxia is one of the standard features of solid tumors, leading to hyponitroxia by inhibition of NO synthesis. Hyponitroxia increases hypoxia by the lack of NO-modulated blood flow, in a mutual cycle that can promote tumor progression (3). Therefore, both O₂ and NO levels could be therapeutic targets for cancer.

Various types of NO donors have been synthesized. Among those, *S*-nitrosothiols (general formula RSNO) have been studied for their antineoplastic properties

Introdução

O monóxido de nitrogênio (NO) é uma molécula de sinalização ubíqua, reguladora e efetora com vários efeitos biológicos no corpo humano ao nível dos sistemas vascular, neuronal e imunológico (1-3). O NO é sintetizado *in vivo* por três sintases de NO diferentes (NOS), incluindo a nNOS e eNOS, que são constitutivamente expressas em células neuronais e endoteliais, respectivamente, e a iNOS que é transcricionalmente regulada e induzida por citocinas inflamatórias, stresse oxidativo, hipoxia e algumas endotoxinas (3). A ampla gama de funções mediadas pelo NO ocorre principalmente através de uma via dependente de cGMP, levando a vasodilatação, neurotransmissão, inibição da agregação plaquetária e relaxamento do músculo liso. Uma segunda via independente de cGMP é a reação do NO com oxigênio molecular, espécies reativas de oxigênio (ROS), tióis e metais de transição. O NO também pode modificar diretamente proteínas sem intervenção de enzimas por nitração ou nitrosilação (1,3). A *S*-nitrosilação de grupos tiol de resíduos de cisteína é uma modificação reversível que está envolvida em vários processos de sinalização celular, que regulam a função de várias proteínas intracelulares (1,3).

Os doadores de NO, como a nitroglicerina, foram aprovados para uso clínico para o tratamento de doenças cardiovasculares. Recentemente, foi sugerida uma potencial aplicação destes compostos na terapêutica do cancro (4). Em relação ao cancro, o NO é conhecido por ter um efeito dicotômico, com efeitos pró ou antitumorais, dependendo da sua concentração, microambiente e tipo de célula (2,3). Com baixas concentrações de NO (< 100 nM), existe uma associação com o aumento dos processos angiogênicos e proliferativos, bem como com a resistência à apoptose. Por outro lado, altas concentrações de NO (> 500 nM) estão associadas ao aumento da citotoxicidade e da apoptose (1-3). Os mecanismos antitumorais do NO incluem a indução da proteína p53 (5), degradação proteossomal de moléculas anti-apoptóticas, libertação do citocromo C com aumento da permeabilidade mitocondrial, libertação do complexo Smac / DIABLO e nitrosilação direta dos fatores de transcrição NF- κ B, SNAIL e YY1 (3,6). O papel do NO na terapêutica de cancro está relacionado com hipoxia e hiponitroxia. A hipoxia é uma das características padrão dos tumores sólidos, levando a hiponitroxia pela inibição da síntese de NO. A hiponitroxia aumenta a hipoxia pela falta de fluxo sanguíneo modificado por NO, num ciclo mútuo que pode promover a progressão tumoral (3). Portanto, os níveis de O₂ e NO podem ser alvos terapêuticos para o cancro.

(1). This class of RSNO-like compounds is generally unstable, but some compounds such as *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) and *S*-nitrosoglutathione (GSNO) are more chemically stable and have documented antitumor activity in various cancer cell lines, such as in the HeLa line (cervical cancer), EMT-6 (murine mammary cancer) and colon cancer cells, with induction of apoptosis and cell cycle arrest, even in the presence of hypoxia (1).

The aim of this study was to evaluate the anti-tumor potential of two compounds with proven ability to donate NO to thiols, including cysteine and glutathione, by transnitrosylation reactions (7), compound **L1** (1-nitroso-1-methyl-3-benzoylguanidine) and compound **L2** (1-nitroso-1-methyl-3-tolylsulfonylguanidine), shown in Figure 1.

Vários tipos de doadores de NO foram já sintetizados. Entre eles, foram estudados os *S*-nitrosotióis (fórmula geral RSNO) pelas suas propriedades antineoplásicas (1). Esta classe de compostos do tipo RSNO é geralmente instável, mas alguns compostos como *S*-nitroso-*N*-acetilpenicilamina (SNAP) e *S*-nitrosoglutatina (GSNO) são mais quimicamente estáveis e têm atividade antitumoral documentada em várias linhas celulares de cancro, como na linha HeLa (cancro cervical), EMT-6 (cancro de mama múrinico) e células de cancro do cólon, com indução de apoptose e paragem do ciclo celular, mesmo na presença de hipoxia (1).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antitumoral de dois compostos com capacidade comprovada de doar NO para tiois, incluindo a cisteína e a glutatona, através de reações de transnitrosação (7), o composto **L1** (1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina) e o composto **L2** (1-nitroso-1-metil-3-tolilsulfonilguanidina), mostrados na Figura 1.

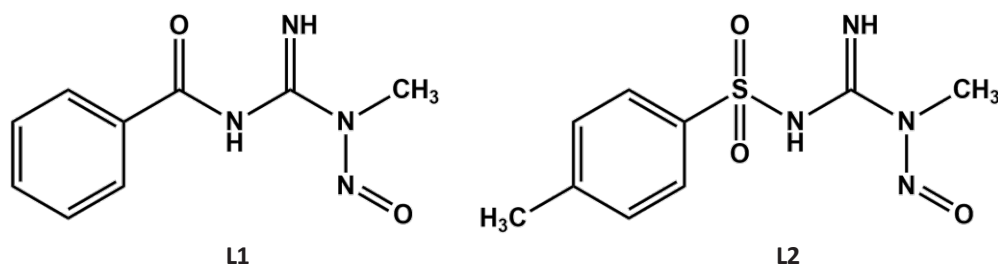


Figure 1/Figura 1 – Chemical structures of compounds **L1** (1-nitroso-1-methyl-3-benzoylguanidine) and **L2** (1-nitroso-1-methyl-3-tolylsulfonylguanidine). Estruturas químicas dos compostos **L1** (1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina) e **L2** (1-nitroso-1-metil-3-tolilsulfonilguanidina).

Materials and methods

Chemicals

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), foetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin solution, trypsin, crystal violet (CV), and doxorubicin (dox) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Dimethylsulphoxide (DMSO), ethanol, and acetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). **L1** and **L2** were synthesised as described by Ribeiro *et al.* (7).

Cell culture

The human breast cancer cell line MDA-MB-231 was obtained from ATCC (HTB- 26). Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum,

Materiais e Métodos

Materiais

Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), soro bovino fetal (FBS), solução de penicilina-estreptomicina, tripsina, violeta de cristal (CV) e doxorubicina foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Dimetilsulfóxido (DMSO), etanol e ácido acético foram comprados à Merck (Darmstadt, Germany). Os compostos **L1** e **L2** foram sintetizados de acordo com o descrito em Ribeiro *et al.* (7).

Cultura celular

A linha celular MDA-MB-231 foi obtida através da ATCC (HTB-26). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro bovino fetal a 10%, 100 U/mL de

100 U/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin (8). The cultures were maintained at 37 °C, under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air.

Crystal violet staining assay

Cell viability was evaluated by the crystal violet (CV) staining assay. Approximately 6000 cells in 190 µL of culture medium per well were plated in 96-well plates and incubated for 24 hours. Cell were then exposed to compounds L1 and L2 (10, 25 and 50 µM) for 48 hours. The CV assay was carried out according to a previously described protocol (9). DMSO 5% (v/v) and the recognized anticancer drug doxorubicin (Dox, 10 µM) were used as positive controls. Two independent experiments were performed, each comprised of four replicate cultures.

Results

The obtained results show that compounds L1 and L2 did not induce significant cytotoxicity in the breast cancer cell line MDA-MB-231, in the range of concentrations tested and for the tested 48 hour incubation period. As can be seen in Figure 2A, only minor reductions in cell viability were found in cultures treated with L1 or L2. Conversely, the positive controls exhibited significant cytotoxicity for the same incubation period. DMSO 5% (v/v) decreased the cell viability to 24% (Figure 2B). The anticancer drug Dox, at 10 µM, decreased cell viability to 29% (Figure 2B).

penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina (8). As culturas celulares foram mantidas a uma temperatura de 37 °C, sob uma atmosfera húmida contendo 5% de CO₂ no ar.

Ensaio de coloração com violeta de cristal

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de coloração com violeta de cristal. Para o efeito, aproximadamente 6000 células foram semeadas por poço, num volume de 190 µL de meio de cultura, em placas de 96 poços e foram incubadas durante 24 h. De seguida as células foram expostas aos compostos L1 e L2 (10, 25 e 50 µM) durante 48 h. O ensaio CV foi levado a cabo de acordo com um protocolo anteriormente descrito (9). Foram utilizados como controlos positivos 5% (v/v) e o reconhecido fármaco antitumoral doxorubicina (Dox, 10 µM). Para este estudo, foram realizadas duas experiências independentes, contendo cada uma quatro culturas em replicado.

Resultados

Os resultados obtidos mostram que os compostos L1 e L2 não induziram citotoxicidade significativa na linha celular de cancro de mama MDA-MB-231, na gama de concentrações testadas e por um período de incubação de 48 h. Como se pode observar na Figura 2A, apenas se registaram pequenas reduções na viabilidade celular nas culturas tratadas com L1 ou L2. Contrariamente, os controlos positivos utilizados exibiram citotoxicidade significativa no mesmo tempo de incubação. O tratamento com DMSO 5% (v/v) reduziu a viabilidade celular para 24% (Figura 2B). O fármaco antitumoral Dox, a uma concentração de 10 µM, diminuiu a viabilidade celular para 29% (Figura 2B).

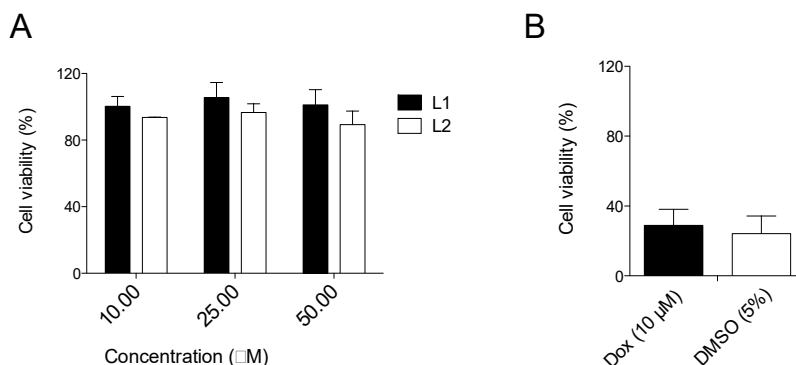


Figure 2/Figura 2 – Effect of compounds L1 and L2 (A), DMSO and doxorubicin (B) on the viability of MDA-MB-231 breast cancer cells (48 h incubation), as evaluated by the crystal violet assay. Results are expressed as mean ± SD from two independent experiments. Efeito dos compostos L1 e L2 (A), DMSO e doxorubicina (B) na viabilidade da linha celular de cancro da mama MDA-MB-231 (48 h de incubação), avaliado pelo ensaio de violeta de cristal. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de duas experiências independentes.

Discussion

The potential anticancer effect of compounds L1 and L2 was evaluated in MDA-MB-231 cells, a human cell line representative of aggressive breast cancer. The results obtained herein suggest that L1 and L2 are devoid of considerable anticancer activity against these cells. However, for a more complete screening of the anticancer properties of L1 and L2 compounds, their cytotoxicity should be studied in additional cell models, representative of other cancer types since the levels of NO present vary between different cancers. A more extensive study of the incubation times with the compounds should also be performed to allow the detection of eventual mechanisms of delayed cell death. Further *in vitro* studies for the evaluation of the type of cell death and cell cycle may also provide information on the mechanisms involved in the biological effect of this type of compounds.

There are several pre-clinical and clinical studies reporting a synergistic effect between NO-donor compounds and the conventional therapies for cancer. NO donors serve as sensitizing agents against radio or chemoresistant cells, lowering their hypoxia levels by regulating HIF-1 α expression, and consequently increasing tumor oxygenation, which allows a greater efficacy in radiotherapy and chemotherapy for ROS generation with cytotoxic effects (3). A study by Matthews et al (10), demonstrates this premise, where the relationship between tumor hypoxia, endogenous NO levels and chemosensitivity of human and murine cell lines was verified. In that study two cell lines were used, the MDA-MB-231 line of human breast cancer and the B16F10 line of murine melanoma, with exposure to different levels of O₂ and incubation with NO inhibitors in the presence of doxorubicin or 5-fluorouracil, it being observed that under conditions of hypoxia and low levels of NO, resistance to chemotherapeutic drugs increased, translating into a greater survival of tumor cell lines. However with the addition of NO donors this effect was reversed even in the presence of small doses (10). Other *in vitro* studies on prostate cancer cell lines and a three-dimensional model of breast cancer relate the effect of NO donors on the level of hypoxia and chemosensitivity (11-13). An alternative mechanism of NO donors in combination with antitumor agents was reported by Chegaev et al (14), where it was observed that NO donors prevented the activation of proteins associated with drug resistance, such as the P-glycoprotein, in the HT29 colorectal cancer cell line resistant to doxorubicin (14). Considering the possible effect of NO-donors as therapy sensitizers, the combination of

Discussão

O potencial efeito antitumoral dos compostos L1 e L2 foi avaliado em células MDA-MB-231, uma linha celular humana representativa de cancro de mama agressivo. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que L1 e L2 são desprovidos de atividade citotóxica considerável contra essas células. No entanto, para um rastreio mais completo das propriedades antitumorais dos compostos L1 e L2, a sua citotoxicidade deverá também ser estudada noutros modelos celulares, representativos de outros tipos de cancro, uma vez que os níveis de NO variam nos diferentes tipos de cancro. Um estudo mais extenso dos tempos de incubação com os compostos também deve ser realizado para permitir a detecção de eventuais mecanismos de morte celular tardia. Outros estudos *in vitro* para a avaliação do tipo de morte celular e do ciclo celular também poderão fornecer informações sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos biológicos deste tipo de compostos. Existem vários estudos pré-clínicos e clínicos que relatam um efeito sinérgico entre os compostos dadores de NO e as terapêuticas oncológicas. Os dadores de NO funcionam como agentes sensibilizantes em células rádio- ou quimiorresistentes, diminuindo os níveis de hipoxia através da regulação da expressão de HIF-1 e, conseqüentemente, aumentando a oxigenação do tumor, o que permite uma maior eficácia da radioterapia e quimioterapia pela geração de ROS associada a efeitos citotóxicos (3). Um estudo de Matthews et al (10) demonstra esta premissa, onde a relação entre hipoxia tumoral, níveis endógenos de NO e quimiossensibilidade de linhas celulares humanas e murínicas foi verificada. Nesse estudo utilizaram-se duas linhas celulares, a linha MDA-MB-231 de cancro de mama humano e a linha de melanoma murínico B16F10, com exposição a diferentes níveis de O₂ e incubação com inibidores de NO na presença de doxorubicina ou 5-fluorouracilo. Observou-se que, sob condições de hipoxia e baixos níveis de NO, a resistência a fármacos quimioterápicos aumentou, traduzindo-se numa maior sobrevivência das linhas celulares tumorais. No entanto, com a adição de dadores de NO, mesmo em pequenas doses, este efeito foi revertido (10). Outros estudos *in vitro* em linhas celulares de cancro da próstata e num modelo tridimensional de cancro de mama descrevem o efeito dos dadores de NO ao nível da hipoxia e quimiossensibilidade (11-13). Um mecanismo alternativo de dadores de NO em combinação com agentes antitumorais foi relatado por Chegaev et al (14), onde se observou que os dadores de NO impediram a ativação de proteínas associadas à resistência a fármacos, como a glicoproteína-P, na linha celular

L1 and **L2** with chemotherapy or radiotherapy should be also considered in future studies.

NO donors may also influence cell invasiveness, as can be seen in a study by Postovit et al. (15). Using the MDA-MB-231 cell line, these authors found low doses of NO donors inhibited the hypoxia-mediated increase in cell invasion (15). The same research group performed an *in vivo* study with a murine model of melanoma, demonstrating that NO donors reverse the proliferation increase in metastatic nodules, even under conditions of hypoxia (16). The study of the impact of **L1** and **L2** in cell migration and invasion may also shed light on the potential usefulness of these compounds in cancer therapy.

Despite the well-documented potential usefulness of NO donors in cancer therapy, **L1** and **L2** did not exhibit relevant cytotoxic effects under the conditions tested. Taking into account the relation between the effects of NO-donors and hypoxia, *in vitro* studies in hypoxic conditions should also be carried out. In addition, other mechanisms beyond cell viability should be explored to duly assess the therapeutic potential of these compounds.

Acknowledgments

This work was financially supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), through funding UID/DTP/04567/2016 to CBIOS. Part of the work was also supported by FCT to CQB through project UID/MULTI/00612/2013. Nuno Almeida acknowledges his research grant attributed in the scope of the project UID/DTP/04567/2016. João Costa acknowledges his research grant PADDIC 2016-2017, awarded by ALIES-COFAC.

Conflict of interests

The author declares that there is no personal or financial relationship that can be understood as presenting a potential conflict of interest.

HT29 de cancro colo-retal resistente à doxorrubicina (14). Considerando o possível efeito dos dadores de NO como sensibilizadores, a combinação de **L1** e **L2** com quimioterapia ou radioterapia também deverá ser considerada em estudos futuros.

Os dadores de NO também podem influenciar a invasão celular, como pode ser visto num estudo de Postovit et al (15). Usando a linha celular MDA-MB-231, esses autores descobriram que baixas doses de dadores de NO inibem o aumento da invasão celular mediado pela hipoxia (15). O mesmo grupo de investigação realizou um estudo *in vivo* com um modelo murínico de melanoma, demonstrando que os dadores de NO revertem o aumento da proliferação em nódulos metastáticos, mesmo sob condições de hipoxia (16). O estudo do impacto de **L1** e **L2** na migração e invasão celulares também contribuirá para elucidar a potencial utilidade desses compostos na terapêutica do cancro.

Apesar da bem documentada potencial utilidade dos dadores de NO na terapêutica do cancro, **L1** e **L2** não apresentaram efeitos citotóxicos relevantes nas condições testadas. Tendo em conta a relação entre os efeitos dos dadores de NO e a hipoxia, estudos *in vitro* em condições hipoxicas também deverão ser realizados. Além disso, outros mecanismos além da viabilidade celular deverão ser explorados para avaliar devidamente o potencial terapêutico destes compostos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto UID/DTP/04567/2016 atribuído ao CBIOS. Parte do trabalho foi ainda financiado pela FCT ao CQB através do projecto UID/MULTI/00612/2013. Nuno Almeida agradece a bolsa de investigação concedida no âmbito do projeto UID/DTP/04567/2016. João Costa agradece a bolsa de investigação PADDIC 2016-2017, conferida pela ALIES-COFAC.

Conflito de interesses

O autor declara não existir qualquer relação pessoal ou financeira que possa ser entendida como representando um potencial conflito de interesses.

References/Referências

1. Huerta S. Nitric oxide for cancer therapy. *Future Sci OA* 2015; 1: FSO44.
2. Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V P, Pantziarka P. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-nitroglycerin as an anti-cancer agent. *Ecancer-medicalscience* 2015; 9:568.
3. Huang Z, Fu J, Zhang Y. Nitric Oxide Donor-Based Cancer Therapy: Advances and Prospects. *J Med Chem* 2017; 60:7617-7635.
4. Bonavida B. Nitric oxide (NO) and cancer. 1st ed. Humana Press; 2010.
5. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolucci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD, Wink DA. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 2008; 45:18-31.
6. Bonavida B, Baritaki S. Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: Downregulation of the NF- κ B/Snail/YY1/RKIP circuitry. *Nitric Oxide* 2011; 24:1-7.
7. Ribeiro L, Garcia-Río L, Araújo ME. Evaluation of transnitrosating ability of N-nitrosoguanidines to alkyl thiols and thiol amino acids. *Tetrahedron* 2016; 72: 1177-1184.
8. Guerreiro P, Fernandes AS, Costa JG, Castro M, Miranda JP, Oliveira NG. Differential effects of methoxyamine on doxorubicin cytotoxicity and genotoxicity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Mutat Res* 2013; 757: 140-147.
9. Fernandes AS, Gaspar J, Cabral MF, Rueff J, Castro M, Batinic-Haberle I, Costa J, Oliveira NG. Protective role of ortho-substituted Mn(III) N-alkylpyridylporphyrins against the oxidative injury induced by tert-butylhydroperoxide. *Free Radic Res* 2010; 44:430-440.
10. Matthews NE, Adams MA, Maxwell LR, Gofton TE, Graham CH. Nitric oxide-mediated regulation of chemosensitivity in cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1879-1885.
11. Frederiksen LJ, Siemens DR, Heaton JP, Maxwell LR, Adams MA, Graham CH. Hypoxia induced resistance to doxorubicin in prostate cancer cells is inhibited by low concentrations of glyceryl trinitrate. *J Urol* 2003; 170:1003-1007.
12. Muir CP, Adams MA, Graham CH. Nitric oxide attenuates resistance to doxorubicin in three-dimensional aggregates of human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 96:169-176.
13. Frederiksen LJ, Sullivan R, Maxwell LR, Macdonald-Goodfellow SK, Adams MA, Bennett BM, Siemens DR, Graham CH. Chemosensitization of cancer in vitro and in vivo by nitric oxide signaling. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2199-2206.
14. Chegaev K, Riganti C, Lazzarato L, Rolando B, Guglielmo S, Campia I, Fruttero R, Bosia A, Gasco A. Nitric oxide donor doxorubicins accumulate into Doxorubicin-resistant human colon cancer cells inducing cytotoxicity. *ACS Med Chem Lett* 2011; 2:494-497.
15. Postovit LM, Adams MA, Lash GE, Heaton JP, Graham CH. Oxygen-mediated regulation of tumor cell invasiveness. Involvement of a nitric oxide signaling pathway. *J Biol Chem* 2002; 277:35730-35737.
16. Postovit LM, Adams MA, Lash GE, Heaton JP, Graham CH. Nitric oxide-mediated regulation of hypoxia-induced B16F10 melanoma metastasis. *Int J Cancer* 2004; 108:47-53.