

1. INTRODUÇÃO

1.1 Resistência a Múltiplas Drogas

Câncer é uma das principais causas de mortalidade no Brasil e no mundo e, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima-se mais de 570 mil novos casos de câncer para o ano de 2014 (Fonte: Ministério da Saúde, Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil, 2014).

De maneira geral, o tratamento utilizado em pacientes com câncer engloba excisão cirúrgica local, radioterapia local, quimioterapia e/ou imunoterapia, dependendo da origem da doença. No entanto, a resposta à terapia varia entre os pacientes, que ou respondem de forma completa ou parcial, de forma transiente ou não respondem. Ao que se refere à quimioterapia, um dos principais fatores relacionados à falha terapêutica do câncer é o desenvolvimento da resistência molecular aos fármacos que são utilizados no tratamento, como antraciclina, taxanos, vinca alcaloides, epipodofilotoxinas, antraquinonas, inibidores tirosina quinase (GOTTESMAN 2002; LAGE 2008).

A resistência intrínseca ou adquirida pelas células neoplásicas a diferentes classes de quimioterápicos, que não estão relacionados em sua estrutura ou função, é classicamente definida como o fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR). A MDR foi inicialmente identificada entre o final da década de 60 e década de 70 quando alguns estudos verificaram que células neoplásicas apresentavam resistência cruzada a antibióticos e quimioterápicos (KESSEL *et al.*, 1998; KESSEL & WODINSKY 1968; BIEDLER & RIEHM 1970).

Embora a MDR esteja comumente associada à expressão aumentada de proteínas pertencentes à família de transportadores ABC, do inglês *ATP binding Cassette*, atualmente sabe-se que outras alterações moleculares também contribuem para a quimiorresistência em neoplasias. Os fatores que favorecem o fenótipo de resistência incluem diminuição do influxo e aumento do metabolismo de drogas, alterações da via de morte celular, aumento do reparo do DNA, alterações nos *checkpoints* que ocorrem durante o ciclo celular, alterações nas vias de sinalização intracelular, entre outros. Sendo assim, a MDR é considerada um fenótipo de resistência multifatorial (LAGE, 2008; GILLET & GOTTESMAN 2010).

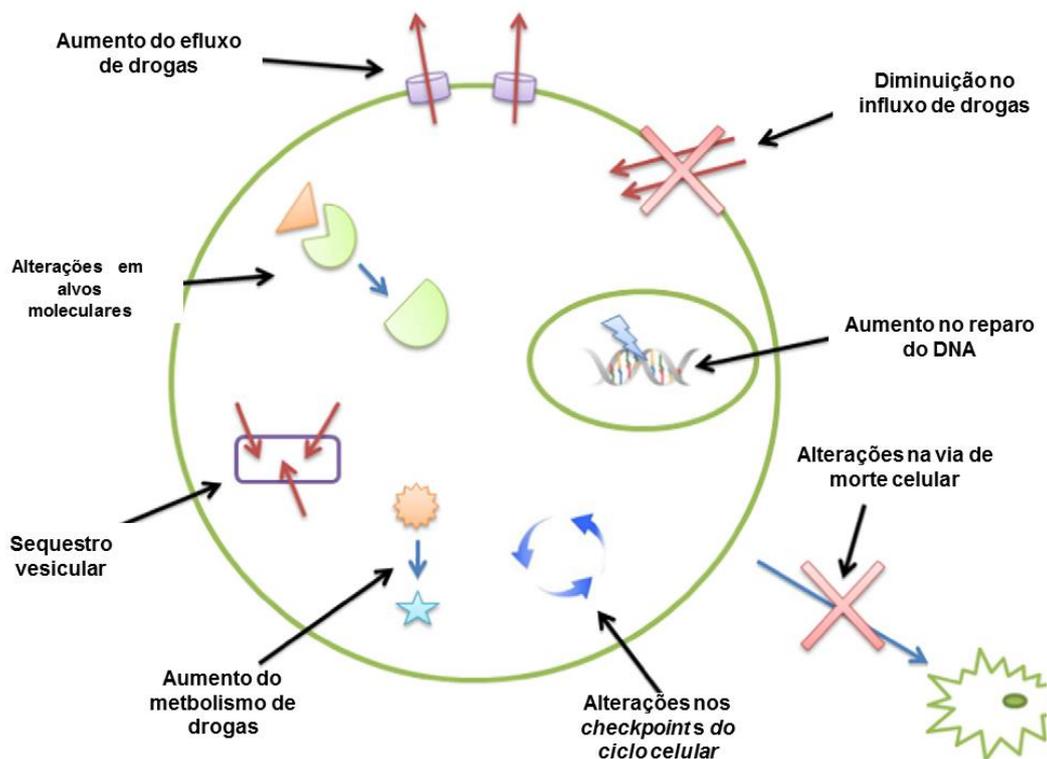


Figura 1.1. Mecanismos de resistências a drogas em células neoplásicas. Células neoplásicas podem evadir ao tratamento com quimioterápicos, através do aumento do efluxo de drogas, diminuição do influxo de drogas, aumento nos mecanismos de reparo do DNA, alterações na via de morte celular, alterações nos *checkpoints* do ciclo celular, aumento do sequestro vesicular ou aumento do metabolismo de drogas. (Adaptado de GONG *et al.*, 2012).

1.1.2 Transportadores ABC

Como mencionado anteriormente, o fenótipo MDR está majoritariamente associado à superexpressão de proteínas transmembranas pertencentes à família de transportadores ABC. Essas proteínas apresentam homologia estrutural, e sequências conservadas que permitem interação com diferentes classes de substratos. Através da energia gerada pela hidrólise do ATP, tais substratos são transportados para fora da célula. No que se referente ao câncer, alguns membros da família de transportadores ABC interagem com quimioterápicos e, conseqüentemente, a concentração intracelular ótima do fármaco não é atingida. Em humanos, foram descritos 48 membros da família ABC sendo estes, divididos em sete subfamílias, ABCA – ABCG (DEAN *et al.*, 2001; GOTTESMAN *et al.*, 2002; SZAKACS *et al.*, 2006, GILLET *et al.*, 2007).

As proteínas da família ABC transportam ativamente, ou atuam como canais de transporte, a diversos substratos como íons, açúcares, aminoácidos, lipídios, metabólitos endógenos, toxinas, antibióticos, carcinógenos e drogas antitumorais, o que as tornam

essenciais no contexto fisiológico. Assim, algumas doenças estão associadas a alterações dessas proteínas, por exemplo, fibrose cística (ABCC7), Doença de Tangier (ABCA1) e Síndrome de Dubin-Johnson (ABCC2) e adrenoleucodistrofia (ABCD1), (GOTTESMAN & AMBUDKAR, 2001). Na Figura 1.2 estão exemplificados alguns membros da família ABC que estão relacionadas ao desenvolvimento da resistência a múltiplas drogas em células neoplásicas. Dessas, destacam-se as proteínas ABCB1/Pgp/MDR1 (glicoproteína P), ABCC1/MRP1 e ABCG2/MXR/BCRP (GOTTESMAN & AMBUDKAR, 2001; GOTTESMAN, 2002).

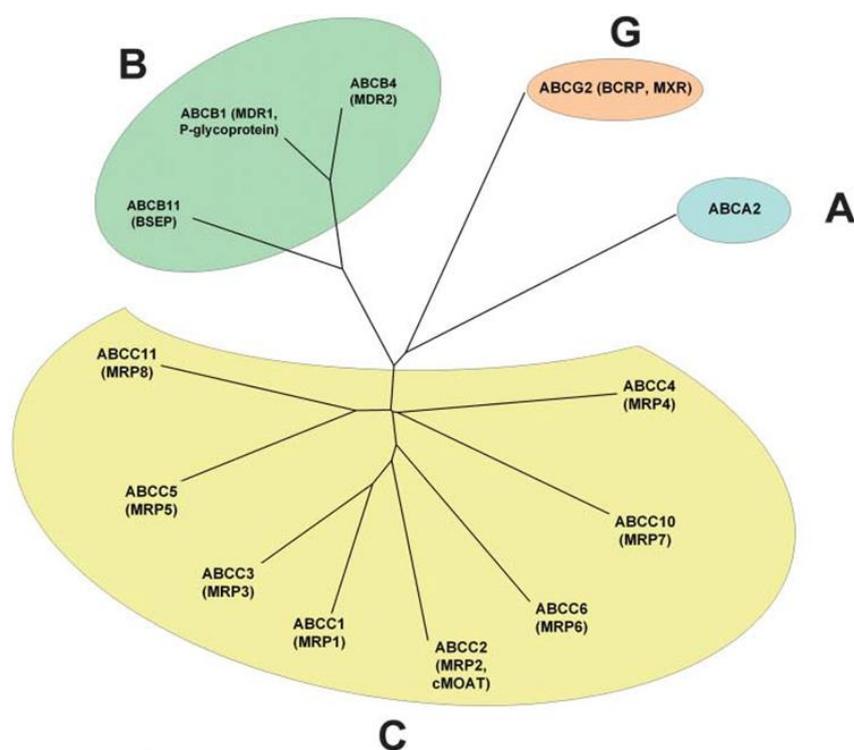


Figura 1.2. Transportadores ABC associados à resistência a múltiplas drogas em neoplasias. A Figura ilustra os membros da família de transportadores ABC que estão associados à resistência aos quimioterápicos em neoplasias. (Adaptado de ROSS & DOYLE, 2004).

1.1.2.1 Glicoproteína P

A glicoproteína P (Pgp) foi o primeiro membro da família dos transportadores ABC a ser identificado, sendo o mais estudado no que se refere à MDR em neoplasias. A Pgp foi descrita em 1976 quando Juliano & Ling identificaram a presença de uma glicoproteína, na superfície de células de camundongos resistentes que alterava a

permeabilidade a drogas. Em 1983, Kartner e colaboradores demonstraram que o aumento da expressão de Pgp em células tumorais estava fortemente correlacionado ao desenvolvimento da resistência a drogas. Além disso, Ueda e colaboradores (1987) superexpressaram o cDNA da Pgp em células sensíveis de carcinoma humano e em células de fibroblasto de camundongo. Em seus resultados foi verificado que a Pgp conferiu fenótipo de resistência a diferentes classes de quimioterápicos. A tabela 1 exemplifica algumas classes de quimioterápicos que podem ser transportados pela Pgp.

O gene da Pgp - *MDR1/ABCB1* - apresenta 28 éxons e está localizado no cromossomo 7q21. Estruturalmente esta glicoproteína consiste de 1280 aminoácidos com 170 kDa de uma estrutura duplicada, no qual cada metade contém um domínio de ligação a nucleotídeo (NBD) e seis domínios transmembrana hidrofóbicos (TDMs). São seis *loops* na região extracelular, sendo o primeiro glicosilado. Os domínios NH₂ e COOH terminais, assim como os NBDs estão localizados na parte intracelular. Cada NBD possui dois motivos consensos (*Walker A* e *Walker B*) que são responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP. A região citoplasmática de ligação entre os *Walkers* da proteína é o principal sítio de fosforilação (*C motif*) (Figuras 1.3 e 1.4) (SHILLING *et al.*, 2006).

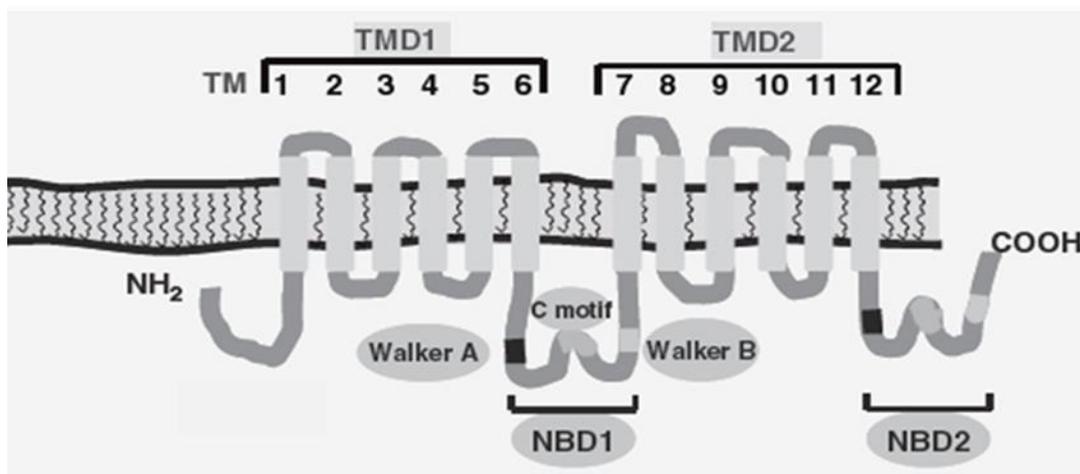


Figura 1.3. Representação esquemática da Glicoproteína P (Pgp). Estruturalmente a Pgp contém na região N-terminal seis domínios transmembrana, com três *loops* extracelular (TDM1) e na região C-terminal outros seis domínios transmembranas formando também três *loops* extracelular (TDM2). Há dois motivos consensos (*Walker A* e *Walker B*), responsáveis pela hidrólise do ATP nas regiões chamadas de NBD1 e NBD2 (*Nucleotide-Binding Domain*) e uma região citoplasmática, alvo de fosforilação chamada *C motif*. (Adaptado de ZHOW 2008).

Tabela 1: Drogas antitumorais substratos para Glicoproteína P.

Classe	Fármaco
Antraciclinas	Doxorrubicina
	Daunorrubicina
	Epirubicina
	Idarrubicina
Epipodofilotoxinas	Etoposídeo
	Teniposídeo
Vinca alcaloides	Vincristina
	Vimblastina
	Vinorelbina
Taxanos	Paclitaxel
	Docetaxel
Inibidores de Quinase	Imatinibe
	Flavoperidol
	Mitoxantrona
	Tamoxifeno
	Mitomicina

(Adaptado de STAVROVSKAYA & STROMSKAYA, 2008).

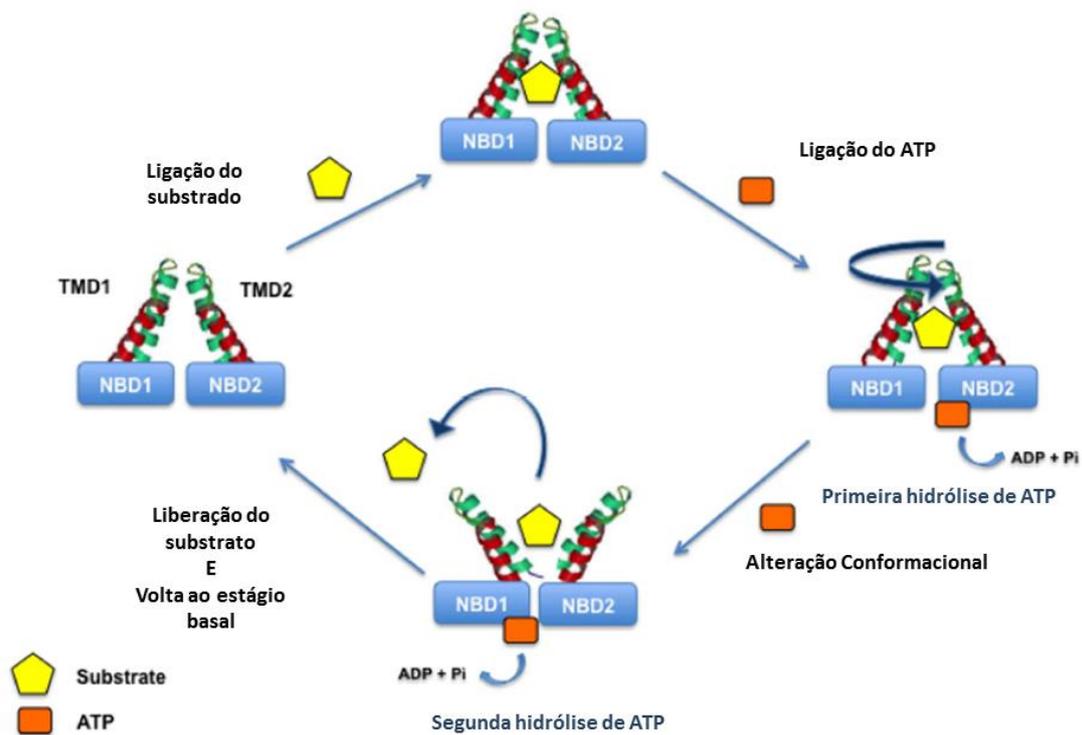


Figura 1.4. Representação esquemática da atividade Glicoproteína P (Pgp). O processo de translocação inicia-se pela ligação simultânea do fármaco e do ATP ao sítio NDB. Mediante a ligação do fármaco e do ATP, ocorre a hidrólise de duas moléculas de ATP: a primeira para a translocação do fármaco e a segunda para a reconstituição conformacional da Pgp. (Adaptado de ZINZI *et al.*, 2014).

Embora descrita em uma condição aberrante, a Pgp também se apresenta expressa em condições fisiológicas, como: membranas epiteliais de células da mucosa do trato gastrointestinal; superfície apical do túbulo proximal das células dos rins; membrana canalicular dos hepatócitos; células endoteliais dos capilares cerebrais e testiculares; placenta; córtex adrenal; e células-tronco hematopoiéticas, além de linfócitos T e B, e células *natural killer*. Em relação à função fisiológica da Pgp, sugere-se proteção contra compostos potencialmente tóxicos que são encontrados na corrente sanguínea. Estudos com camundongos *knockout* para o gene *mdr1* demonstraram que estes animais eram viáveis e férteis. Entretanto, o uso de medicamentos naturais agonistas de receptores cerebrais causa maior acúmulo do fármaco levando a morte desses camundongos. Além disso, acúmulo de substratos da Pgp no trato gastrointestinal, em camundongos *knockout* para *mdr1* sugere a importância dessa bomba de efluxo no controle da biodisponibilidade dessas substâncias. Por fim, a

hipersensibilidade a xenobióticos de camundongos *knockout* para o gene *mdr1*, confirmam a importância dessa proteína na proteção do organismo contra toxinas (LOWN *et al.*, 1997; FROMM, 2004; SARKAD *et al.*, 2006; LUURTSEMA *et al.*, 2010).

1.1.2.2 Glicoproteína P e a resistência em neoplasias

A falha na resposta ao tratamento de vários tipos de câncer está relacionada, dentre outros fatores, com a elevada expressão de Pgp, e seu papel como fator prognóstico tem sido amplamente discutido na literatura. Assim, de acordo com Gottesman e cols. (2002) a superexpressão da Pgp, e conseqüentemente, o fenótipo MDR são fatores preditivos da falência ao tratamento em diversas neoplasias, sendo ainda correlacionados a menor taxa de remissão em leucemias agudas, sarcomas, neuroblastoma e cânceres de ovário e mama.

A correlação entre a expressão e a atividade da Pgp com o desenvolvimento de células tumorais resistentes tem sido abordada em vários estudos. Em câncer de pulmão de pequenas células (SCLC), foi relatado que a expressão da Pgp correlaciona-se a uma pior resposta a quimioterapia com cisplatina e etoposídeo (YEH *et al.*, 2005). A expressão de Pgp como fator de mau prognóstico em neoplasias também foi confirmada em carcinoma de células escamosas da laringe. Nesse estudo, Shen e cols. (2011) verificaram que das 98 amostras de pacientes com câncer de laringe, 41,8% expressavam Pgp e estas ainda foram correlacionadas a uma menor taxa de apoptose sendo considerada como um fator preditivo para progressão do tumor.

Em leucemia mielóide aguda (LMA) a superexpressão e a atividade da Pgp estão associadas a um pior prognóstico na doença refratária e na recaída após o tratamento (SHAFFER *et al.*, 2012). Em um estudo com uma coorte de 72 pacientes, verificou-se que aproximadamente 35% dos pacientes abaixo de 60 anos e 71% acima de 60 anos expressavam Pgp nas células blásticas (LOURENÇO *et al.*, 2008). Além disso, em um estudo realizado por Patel e cols. (2013), 11 amostras pareadas de pacientes com LMA, que foram obtidas na ocasião do diagnóstico e na recaída, foram submetidas a um *array* com 380 genes envolvidos com a MDR. Os autores verificaram que em cinco pacientes a Pgp estava superexpressa após a recaída. Também em estudo envolvendo pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) foi demonstrado que, concomitante, a

progressão da doença ocorreu o aumento da resistência a quimioterápicos que estava relacionado à expressão da Pgp, e consequentemente, a falha do tratamento (SVOBODA-BEUSAN *et al.*, 2000). Em outro estudo realizado com 41 pacientes com linfoma difuso de grandes células B observou-se que a expressão da Pgp, em 37% dos pacientes estava correlacionada a baixa taxa de remissão completa, quando comparada aos pacientes que não expressavam esta proteína transportadora (OHSAWA *et al.*, 2005).

Um estudo randomizado avaliou a relevância da expressão de Pgp em pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC). Os autores observaram que a resposta a citarabina e daunorubicina foi significativamente correlacionada a função e a expressão da Pgp, principalmente em pacientes na fase blástica da doença (LIST *et al.*, 2002). Recentemente, nosso grupo avaliou a expressão de Pgp em células de pacientes com LMC. No estudo foi observada uma alta expressão dessa proteína, independente da fase clínica da doença (crônica ou blástica) (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

A correlação da superexpressão da Pgp com o mau prognóstico de diferentes neoplasias gera o interesse de diferentes pesquisadores por estratégias que revertam o fenótipo MDR. Uma das estratégias mais abordadas é a busca por moléculas que interajam de forma a inibir a atividade de transportador da Pgp. A primeira geração desses inibidores, como a ciclosporina A (CsA) e o verapamil (VRP), já eram utilizados para outras indicações clínicas. Os ensaios clínicos que utilizaram tais inibidores, não foram promissores por algumas razões, como a falta de confirmação da expressão da Pgp nos tumores e toxicidade. A segunda geração de inibidores, como o PSC833 e VX-710, também falharam em ensaios clínicos devido à interação farmacocinética dos inibidores com os quimioterápicos. A coadministração dos fármacos elevava a dose plasmática do quimioterápico, o que gerou a necessidade de reduzir a concentração do quimioterápico e consequentemente, o tratamento com subdoses. Por outro lado, a terceira geração de inibidores da Pgp, como tariquidar, zosuquidar, laniquidar, e ONT-093 apresenta alta especificidade para Pgp. Especificamente, o tariquidar é altamente específico a Pgp em concentrações de escala nanomolar, no entanto, pouco específico no que se refere aos outros membros da família de transportadores ABC que não estão envolvidos ao fenótipo MDR, o que desfavoreceu os resultados provenientes de ensaios clínicos (para revisão KIRTANE *et al.*, 2013; ZINZI *et al.*, 2014).

1.1.2.3 Aquisição do Fenótipo MDR via expressão da glicoproteína P

Diferentes hipóteses têm sido estabelecidas sobre o desenvolvimento do fenótipo MDR mediante superexpressão da Pgp (CALLAGHAN *et al.*, 2008). Já foi verificado, que a Pgp pode promover o fenótipo MDR intrinsecamente, quando a célula neoplásica é originada a partir de células que fisiologicamente expressam a Pgp. Assim, o tumor apresenta o fenótipo de resistência desde o início de seu desenvolvimento (Figura 1.3A) (FROMM 2004; AMBUDKAR *et al.*, 2005). No entanto, a expressão de Pgp pode ser adquirida no decorrer do desenvolvimento da neoplasia, induzindo assim, a MDR de forma extrínseca (Figura 1.3B). O próprio tratamento com quimioterápicos pode induzir a expressão de Pgp promovendo a resistência a fármacos (AMBUDKAR *et al.*, 2005; HARMSEN *et al.*, 2010). Esta hipótese foi confirmada pelo nosso grupo em uma publicação na qual verificamos que modificações relacionadas ao *status* da expressão Pgp causadas por diferentes quimioterápicos podem alterar o efeito induzido por um fármaco específico durante o tratamento de pacientes com LMC (VASCONCELOS *et al.*, 2011). Além disso, estudos *in vitro* também demonstram que a Pgp pode ser induzida por quimioterápicos. Em outro estudo do nosso grupo foi verificado que o fármaco vincristina é capaz de induzir resistência em linhagem de LMC, previamente sensível, através da superexpressão de Pgp (SOUZA *et al.*, 2011).

Outro mecanismo em que células Pgp-negativas tornam-se resistentes é através do contato entre células. Levchenko e cols. (2005) demonstraram que células tumorais resistentes, que expressam Pgp, são capazes de transferir Pgp para células sensíveis que não expressam. A aquisição de Pgp ocorre através da transferência intercelular por contato direto das membranas plasmáticas. Esses autores ainda verificaram que a transferência de Pgp também ocorre através do contato entre células de origens diferentes (Figura 1.4B).

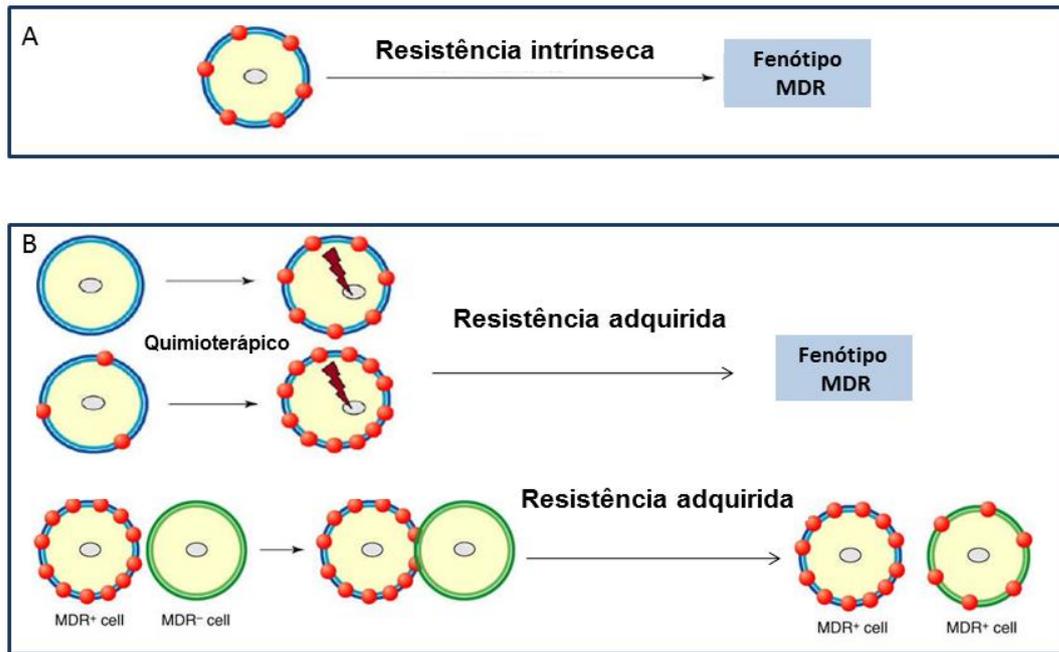


Figura 1.5. Modelos de aquisição do fenótipo MDR causado pela Glicoproteína P (Pgp). (A) Célula neoplásica é intrinsecamente resistente por originar-se de tecido que já expressa Pgp. (B) Célula neoplásica adquire resistência após tratamento com quimioterápicos devido à superexpressão da Pgp; ou adquire o fenótipo de MDR pela transferência intercelular da Pgp de uma célula tumoral doadora que superexpressa esta proteína. (Adaptado de AMBUDKAR *et al.*, 2005).

Outro mecanismo em que células Pgp-negativas tornam-se resistentes é através do contato entre células. Recentemente, Pasquier e cols. (2012) identificaram que células tumorais resistentes, Pgp-positivas, quando em contato com células tumorais sensíveis, Pgp-negativas, são capazes de projetar pequenos filamentos denominados nanotúbulos de membrana, ou citonemas. Tais nanotúbulos medem 0,5 μm de diâmetro e transportam Pgp de uma célula para outra.

1.1.2.3.1 Transferência intercelular da glicoproteína-P por micropartículas de membranas.

Em 2009, Bebawy e cols. descreveram pela primeira vez que a expressão de Pgp pode ser adquirida por células sensíveis, através da transferência intercelular de micropartículas de membrana (MPs) liberadas por células resistentes. Nesse estudo os autores identificaram que células leucêmicas liberam espontaneamente MPs de membrana, que podem aderir a membrana de células ditas receptoras. Mediante esse contato com as MPs, as células receptoras adquirem a expressão de Pgp e

consequentemente, passam a não responder ao tratamento com quimioterápicos, mostrando assim o fenótipo MDR (Figura 1.5). Em 2012, Jaiswal identificou a presença do RNA mensageiro (RNAm) da Pgp nas MPs.

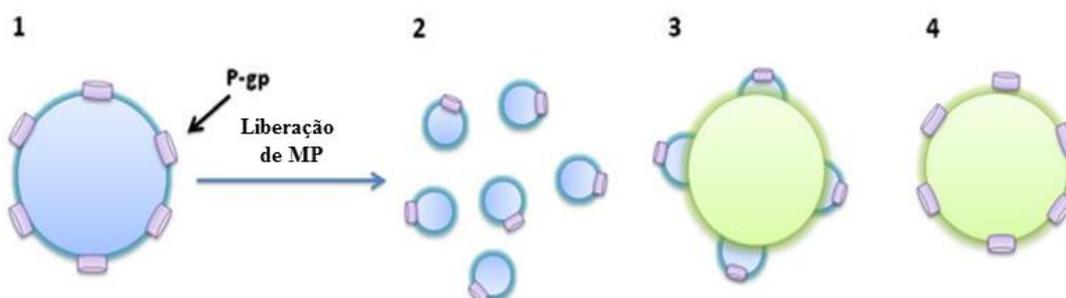


Figura 1.6. Aquisição do fenótipo MDR por transferência intercelular de micropartículas (MPs) de membrana. (1) MPs são espontaneamente liberadas de células doadoras com fenótipo de resistência, (2) carregam Pgp das células que as originaram, (3) estas MPs ligam-se a células receptoras sensíveis a drogas e (4) transferem Pgp que confere o fenótipo MDR. (Adaptado de GONG *et al.*, 2012).

As MPs são pequenas vesículas derivadas do brotamento de membrana plasmática podendo variar de 0,1 a 2 μM de diâmetro, derivadas do brotamento de membrana plasmática de diferentes tipos celulares. A liberação de MPs pode ocorrer em condições distintas como ativação, crescimento ou morte celular (apoptose), em células saudáveis ou células com alterações fisiológicas (PICCIN *et al.*, 2007; COCUCCI *et al.*, 2009; EL ANDALOUSSI *et al.*, 2013). Relacionado à biogênese das MPs ressalta-se o aumento citosólico de Ca^{+2} que promove alteração na simetria da membrana plasmática através de ativação de enzimas como escramblase e flopase e inibição da enzima flipase. A alteração mais evidente ativada neste processo é a exposição da fosfatidilserina (PS) na superfície da membrana plasmática e a liberação das MPs devido à degradação do citoesqueleto através de proteólise dependente de cálcio (Figura 1.6) (HUGEL *et al.*, 2005).

Funcionalmente, as MPs favorecem a comunicação celular e parte do seu conteúdo é dependente do tipo celular que as originou. Por exemplo, em condições fisiológicas, as MPs originadas de células ósseas favorecem a mineralização do osso; MPs originadas de células endoteliais parecem estar relacionadas à homeostase; MPs derivadas de neurônios e astrócitos contêm fatores de crescimento e promovem a resposta parácrina (HUGEL *et al.*, 2005; MURALIDHARAN-CHARI *et al.*, 2010).

Além disso, a liberação de MPs também já foi observada em células tumorais. Estudos têm demonstrado que as MPs derivadas de células tumorais carregam um conteúdo que favorece diversas etapas da progressão tumoral, como: angiogênese, escape do sistema imune, degradação da matriz extracelular e metástase (LIMA *et al.*, 2009; Van DOORMAAL *et al.*, 2009). Dentre as moléculas que as MPs derivadas de células tumorais carregam, estão proteínas solúveis, ácidos nucleicos e proteínas transmembranas (JAISWAL *et al.*, 2012).

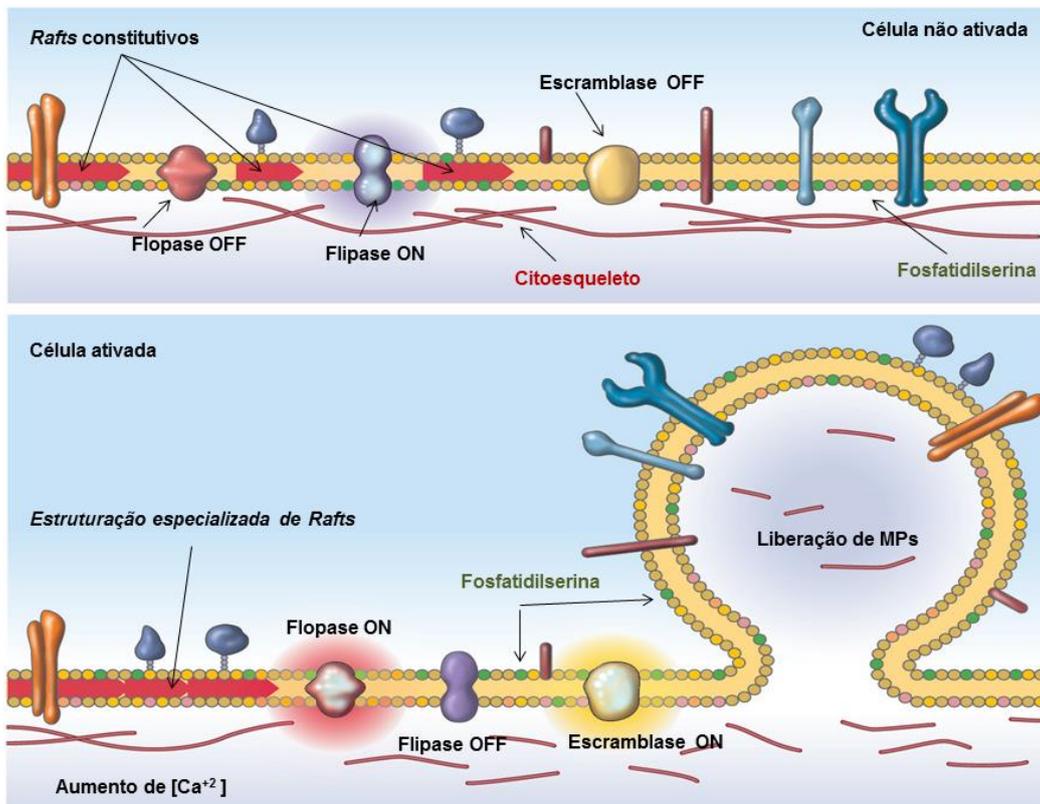


Figura 1.7. Representação esquemática da formação de micropartículas (MPs) de membrana. Para que ocorra a liberação de MPs há o aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} , que leva ativação da flipase e escramblase e inibição da flopase levando a alterações na assimetria da membrana, como a exposição de fosfatidilserina. Dessa forma, ocorre a liberação das MPs devido à degradação do citoesqueleto pela proteólise dependente de Ca^{+2} . (Adaptado de HUGEL *et al.*, 2005).

1.1.3 Apoptose

O equilíbrio entre a proliferação e a morte das células que compõe os organismos vivos é essencial para vários processos fisiológicos, incluindo as alterações morfológicas durante o desenvolvimento embrionário, a organização funcional do sistema imunológico, a renovação celular e a homeostase tecidual. Este balanço é mantido e regulado rigidamente por um sistema de fatores de crescimento e fatores de sobrevivência, e por fatores que atuam em vias de inibição do crescimento e induzem morte celular. Dentre os processos que levam a morte da célula está a apoptose, a qual é mediada por vias de sinalização cuja ativação pode ser iniciada por uma variedade de estímulos intracelulares e extracelulares. Células que estão em processo apoptótico sofrem alterações morfológicas e moleculares, como a exposição de fosfatidilserina na parte extracelular da membrana plasmática, o rearranjo do citoesqueleto, colapso da membrana nuclear, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, diminuição do volume celular, e formação de corpos apoptóticos que são eventualmente fagocitados por macrófagos e outras células vizinhas (HACKER, 2000; NORBURY & HICKSON, 2001; GRIVICICH *et al.*, 2007).

A apoptose é um evento regulado e sequencial, no qual a célula sofre um processo de auto eliminação, sem liberar conteúdos intracelulares nocivos. Diferentes vias de sinalização podem ser utilizadas nesse processo sendo a escolha, mediada de acordo com a natureza do estímulo e o microambiente celular. Alterações na regulação da apoptose podem contribuir no aparecimento de síndromes autoimunes, doenças neurodegenerativas e câncer (FADEEL *et al.*, 1999; GALLUZZI *et al.*, 2007).

No câncer, diversas vias de sinalização que controlam os processos celulares tornam-se desreguladas promovendo, assim, a expansão de clones malignos. Um dos eventos que favorece a tumorigênese é o fato das células tumorais adquirirem resistência a morte celular. Tal resistência ocorre por inúmeros fatores, dentre eles a perda da capacidade da ativação da apoptose (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

1.1.3.1 Vias da Apoptose

A maquinaria apoptótica é composta por moléculas reguladoras e efetoras, sendo que a maquinaria reguladora pode ser iniciada por duas principais vias ditas via intrínseca, que depende de sinais intracelulares para sua ativação, e via extrínseca que depende de sinais extracelulares dependentes de receptor para que haja sua ativação

(Figura 1.6). Ambas levarão a ativação de proteases específicas (caspases), as quais iniciarão uma cascata proteolítica que culminarão na morte da célula (GALLUZZI *et al.*, 2007). As caspases compreendem uma família de cisteína-proteases que clivam diferentes proteínas-alvo que apresentam uma sequência de quatro peptídeos adjacentes a um resíduo de ácido aspártico. Tais proteases são sintetizadas na forma de zimogênios inativos (prócaspases) podendo ser ativadas por clivagem autoproteolítica ou por clivagem mediada por outras caspases (DEMON *et al.*, 2009). Caspases-2, -8, -9 e -10 são chamadas de caspases iniciadoras e caspases-3, -6 e -7 são chamadas de caspases efetoras (VERMEULEN *et al.*, 2005).

A via intrínseca da apoptose (via mitocondrial) inicia a partir de estímulos que induzem estresse celular como quimioterápicos e radiação. Tais estímulos podem induzir a perda do potencial da membrana mitocondrial levando a um aumento de permeabilidade com consequente liberação de proteínas, como o citocromo c. Este evento sinaliza para formação de um oligômero - proteína Apaf-1 (fator apoptótico ativador de protease 1) – o qual é formado por domínios CARD (domínio de recrutamento de caspases) que permitem a ligação e a ativação de proteases, mais especificamente a prócaspase-9 (caspase iniciadora). Assim, a caspase-9 torna-se ativa, e consequentemente, capaz de ativar outras caspases, ditas caspases efetoras (caspases-3, -6 e -7) que irão induzir a morte celular (DEGTEREV & YUAN, 2008). A partir da permeabilização da mitocôndria também ocorre à liberação da endonuclease G que contribui para fragmentação do DNA; AIF que ao translocar para o núcleo inicia o processo de condensação da cromatina; Smac/DIABLO e Omi/HtrA2 que atuam inibindo outras proteínas capazes de inibir as caspases (LU *et al.*, 2005).

A via extrínseca da apoptose é iniciada mediante ativação de receptores proapoptóticos de membrana plasmática, através da ligação de proteínas-ligantes pertencentes à superfamília do Fator de Necrose Tumoral (TNF). Esses ligantes, tais como TNF- α , FasL e APOL2L/TRAIL, por exemplo, que são capazes de ligar-se aos receptores de morte TNFR1, Fas e TRAIL-R1, DR4/TRAIL-R2, DR5, respectivamente (SHEIKH & HUANG, 2003). Após a ligação do ligante, a transdução de sinal inicia-se com a di ou trimerização dos receptores, e posterior recrutamento da molécula FADD (domínio de morte associado à Fas) e das procaspase-8 e/ou -10, junto à região intracelular do receptor, o que forma um complexo proteico multimérico denominado DISC (complexo de sinalização que induz morte) (PETTER & KRAMMER, 2003). A ativação de procaspase-8 (e/ou -10) ocorre no complexo DISC e dependente do estímulo

pode ocorrer indução de dois tipos diferentes de sinalização intracelular. Essas diferentes sinalizações são caracterizadas pela geração de níveis altos (tipo I) ou baixos (tipo II) de complexo DISC e consequentemente, ativação de caspase-8. A sinalização do tipo I leva a rápida ativação de caspases efetoras (caspases-3, -6 e -7) e o comprometimento da célula à morte celular. A sinalização do tipo II necessita de uma amplificação de sinal para ativar a apoptose (OZÖREN & EL-DEIRY, 2002). Neste caso, a caspase-8 cliva o domínio BH3 da proteína BID que na forma truncada (tBID), transloca para a mitocôndria e ativa BAX (proteína X associada à Bcl-2) e BAK (antagonista de Bcl-2/matador-1). Uma vez ativados, BAX e BAK atuam permeabilizando a membrana externa da mitocôndria e ativando a via mitocondrial (descrita acima) a partir da liberação do citocromo c (BARNHART *et al.*, 2003; DEGTEREV & YUAN, 2008).

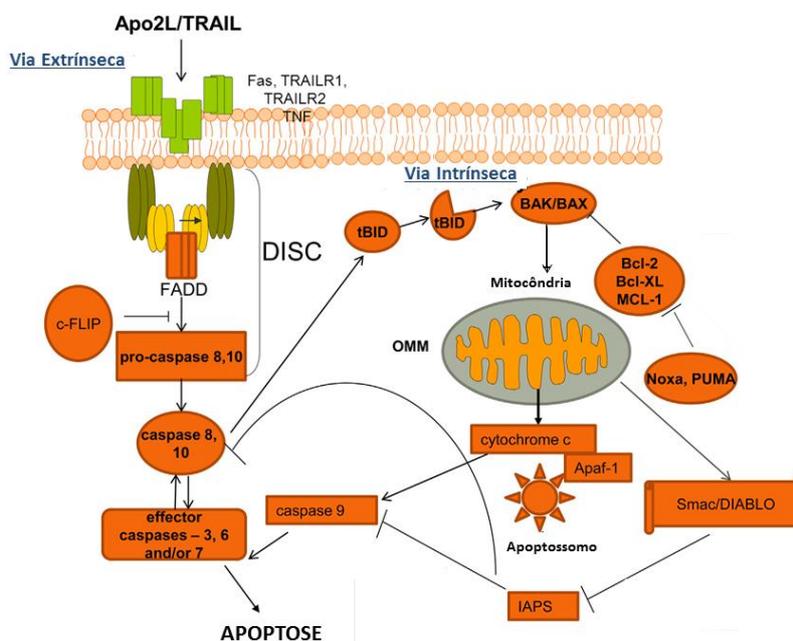


Figura 1.8. Representação esquemática das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. A ligação de TRAIL aos seus receptores leva a sua trimerização e o recrutamento do domínio de morte (DD)-contendo proteínas adaptadoras (representado por FADD), e procaspases iniciadoras. Tal complexo proteico é denominado DISC. Níveis elevados de caspase-8 leva a ativação de caspases efetoras como a caspase-3, e consequentemente a apoptose. A ativação da caspase-8 pode levar também a clivagem de BID na forma truncada tBID, o que promove a formação oligomérica de BAK-BAX e transmissão do sinal de morte da via extrínseca para a via intrínseca. Uma vez que a via está ativada, BAK e BAX homo-oligomeriza e formam poros na membrana mitocondrial (OMM) o que permite a liberação do citocromo C (citC) e outros fatores apoptóticos, o que resulta na formação do apoptossomo com ativação da caspase-9 e, consequentemente, a cascata apoptótica. O citC, APAF-1 e caspase-9 formam um complexo que desencadeará na ativação das caspases efetoras. c-FLIP, proteína antiapoptótica da via extrínseca; Bcl-2, Bcl-XL e MCL1, proteínas antiapoptóticas da via intrínseca; Noxa e PUMA, proteínas que se ligam a membros antiapoptóticos; Smac/DIABLO, proteína proapoptótica; IAPs, família de proteínas inibidoras da apoptose. (Adaptado de KHAN *et al.*, 2013).

1.1.3.2 TRAIL

TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) é uma proteína de membrana tipo II pertencente à família TNF. Mediante processamento proteolítico, TRAIL resulta em uma forma solúvel – ligante TRAIL (sTRAIL) – a qual pode ligar-se a receptores específicos e induzir a apoptose em diferentes tipos celulares. TRAIL pode ligar-se a cinco diferentes receptores, sendo quatro receptores de membrana e um receptor solúvel (Figura 1.7). Dentre os receptores de membrana, dois deles – receptor de morte 4 (DR4) e receptor de morte 5 (DR5) – são considerados receptores verdadeiros, pois atuam como receptores agonistas. DR4 e DR5 apresentam um domínio citoplasmático, o qual permite que TRAIL propague o sinal apoptótico. Os outros dois receptores de membrana são receptor do tipo *decoy* 1 (DcR1) e receptor do tipo *decoy* 2 (DcR2), os quais TRAIL pode se ligar, porém sem ativar o sinal de morte, uma vez que tais receptores não apresentam o domínio de morte intracelular (DcR1) ou o apresentam uma forma truncada (DcR2). O receptor solúvel – osteoprotegerina (OPG) – atua como um receptor antagonista devido à baixa afinidade de ligação ao TRAIL, no entanto, este receptor atua na ativação de osteoclastos no remodelamento ósseo de maneira independente a ligação ao TRAIL (WILEY *et al.*, 1995; FALSCHLEHNER *et al.*, 2007).

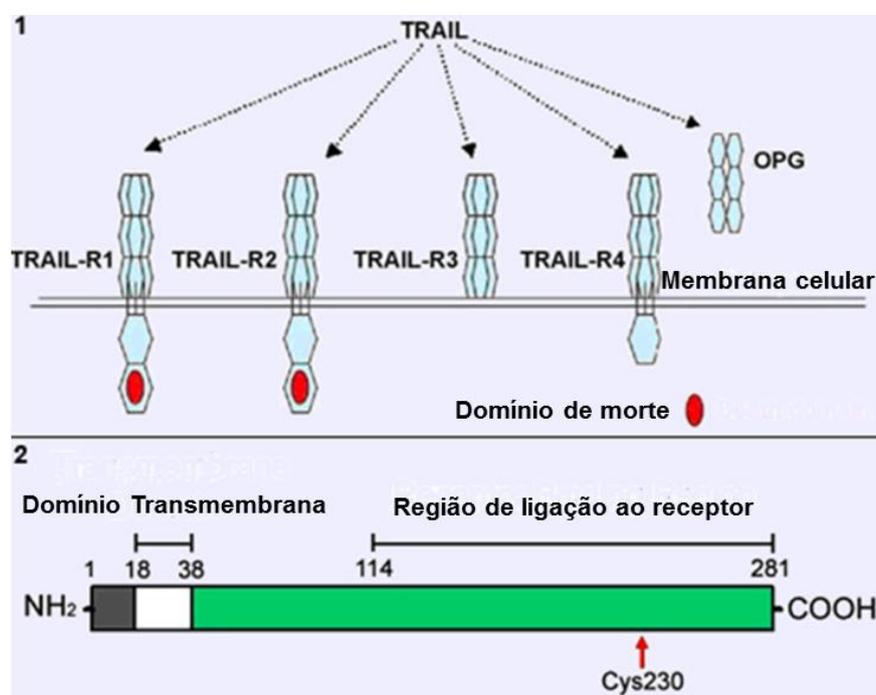


Figura 1.9. Representação esquemática dos receptores de TRAIL (1) e da estrutura da proteína TRAIL (2). A região próxima ao resíduo de cisteína 230 (cys230) contém o íon zinco que é responsável pela integridade estrutural da molécula (Adaptado de http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_TNFSF10.html).

A expressão de TRAIL ocorre principalmente em células do sistema imunológico e estudos em camundongos *knockout* TRAIL^{-/-} mostraram que os animais são viáveis e não apresentam alterações hematológicas. Embora a expressão do RNAm seja identificada em diferentes tipos celulares como pulmão, próstata e baço, a expressão proteica ocorre após estímulo das células do sistema imune, o que sugere um papel para TRAIL na resposta imunológica. Alguns estudos ainda sugerem que TRAIL contribui para a imunovigilância contra o desenvolvimento de tumores primários, pois a neutralização de TRAIL com anti-TRAIL em camundongos tratados com carcinógenos é capaz de promover o desenvolvimento tumoral (CRETNEY *et al.*, 2002; TAKEDA *et al.*, 2002; SMYTH *et al.*, 2003).

TRAIL tem sido estudado como possível agente terapêutico e ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram alta eficiência na indução da apoptose em várias células tumorais, enquanto as células normais apresentam baixas taxas de morte induzida por TRAIL (ASHKENAZI *et al.*, 1999). Referente aos ensaios clínicos, moléculas de TRAIL recombinante agonistas aos receptores DR4 e DR5, e anticorpos monoclonais humanizados anti-DR5 e anti-DR4 tem sido utilizados como monoterapia e terapia combinada em neoplasias hematológicas e tumores sólidos (DIMBERG *et al.*, 2013).

1.1.3.3 Proteínas inibidoras da apoptose (IAP)

As IAPs compreendem uma família de proteínas identificadas a partir da infecção de células do inseto *Spodoptera frugiperda* com baculovírus, cujo gene baculoviral *iap* era transcrito em uma proteína capaz de promover a inibição da apoptose. Desde sua identificação, homólogos celulares têm sido identificados em diferentes espécies. As proteínas XIAP, Survivina, c-IAP1, c-IAP2, NAIP, ML-IAP, Apollon e ILP2 pertencem a família das IAPs por compartilhar um ou mais domínios chamados Baculoviral IAP Repeat (BIR). Tal domínio permite a interação das IAPs com proteínas-alvo, que controlam sua função e a inibição da atividade proteolítica das caspases. Além do domínio BIR, em alguns membros da família, há o domínio RING, com atividade ubiquitina-ligase (E3) e, uma vez em associação com a enzima ativadora de ubiquitina (E1) e com a proteína conjugadora de ubiquitina (E2), catalisa a ubiquitinação de proteínas-alvo (resultando na degradação via proteassoma) como proteínas envolvidas na apoptose e das próprias IAPs. Outros domínios dos membros da família das IAPs estão representados na Figura 1.7. A inibição das caspases pelas IAPs

pode ocorrer de forma direta ou indireta, o que promove a interrupção da via apoptótica (SRINIVASULA & ASHWELL, 2008).

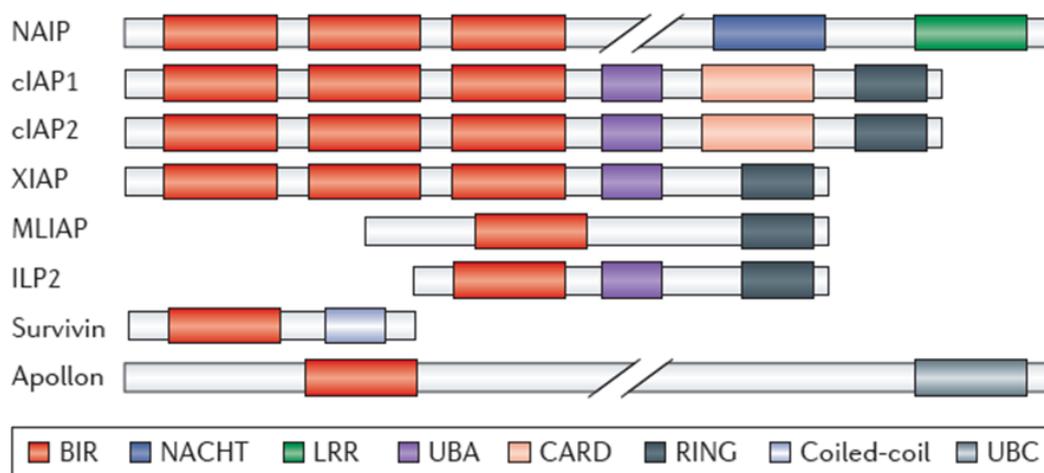


Figura 1.10 Representação esquemática da organização estrutural das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs). Oito proteínas compõem a família das IAPs em humanos: *neural apoptosis inhibitory protein* (NAIP/BIRC1); *cellular IAP1*(cIAP1/BIRC2); *cellular IAP2*(cIAP2/BIRC3); *X chromosome-linked IAP* (XIAP/BIRC4); survivina (BIRC5); Apollon (BIRC6); *melanoma IAP* (ML-IAP/Livin/BIRC7); e *IAP-like protein 2* (ILP2/BIRC8). O domínio BIR está presente em todos os membros da família das IAPs sendo este responsável pela interação das IAPs com proteínas-alvo e inibição da apoptose. O domínio RING, presente na região carboxi-terminal de alguns membros, apresenta atividade ubiquitina-ligase; e o domínio UBA pode ligar-se a monoubiquitina e a cadeias de poliubiquitinas. cIAP1/2 apresentam o domínio CARD que favorece o recrutamento das caspases e algumas IAPs apresentam domínios únicos (Adaptado de FULDA & VUCIC, 2012).

O controle entre o estímulo apoptótico e a inibição da apoptose ocorre também através da regulação das IAPs. Diferentes proteínas atuam na inibição das IAPs contribuindo para a morte da célula. As proteínas Smac/DIABLO e Omi/HtrA2 promovem a apoptose por se ligarem ao domínio BIR de alguns membros da família das IAPs através de seus domínios de ligação a IAPs (IBM), impedindo assim a inibição das caspases. Além disso, Omi/HtrA2 também favorece a apoptose através de sua atividade proteolítica contra proteínas-alvo. A proteína XAF1 (*XIAP-associated factor 1*), por exemplo, também é capaz de impedir a inibição da apoptose através da interação direta com as IAPs, exceto survivina (HUNTER *et al.*, 2007; ARORA *et al.*, 2007).

As IAPs têm sido bastante discutidas no contexto do câncer, uma vez que proteínas dessa família, principalmente survivina e XIAP encontram-se superexpressas em diferentes neoplasias estando, assim, associadas a um prognóstico desfavorável (SCOTT *et al.*, 2005; FULDA & VUCIC, 2012).

Em adultos e crianças com LMA *de novo* o aumento da expressão da XIAP está associado à diminuição da sobrevida comparado com os pacientes que expressam menor nível dessa proteína. Da mesma forma, o aumento da expressão da XIAP está associado à histologia tumoral mais agressiva e a diminuição da sobrevida em pacientes com carcinoma renal. Entretanto, em câncer cervical não há indicação que a XIAP atue como um fator prognóstico (SCHIMMER *et al.*, 2006). A superexpressão da XIAP em pacientes com linfoma difuso de grandes células B (LDGB) parece estar relacionada a uma pior resposta clínica (MURIS *et al.*, 2005). No entanto, em trabalho conduzido pelo nosso grupo não foi observada associação da expressão de XIAP com a sobrevida global de pacientes com LDGB (FACCION *et al.*, 2012). Outro estudo avaliou a expressão proteica e do RNAm de XIAP em 51 pacientes com leucemia linfoblástica aguda pediátrica (LLA). Os autores observaram alta expressão proteica de XIAP e verificaram associação com uma pior resposta a prednisona. *In vitro*, foi verificado que a inibição de XIAP com Smac mimética resultou em aumento da taxa da apoptose induzida por prednisona (HUNSDOERFER *et al.*, 2010).

Em estudo conduzido por Wang e cols. (2010a) a expressão de XIAP em amostras de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama se correlacionou com um fenótipo tumoral mais agressivo e com a diminuição da sobrevida global e sobrevida livre de doença. Em recente estudo conduzido por Xu e cols. (2014) a expressão de XIAP em pacientes com câncer de mama correlacionou-se com o risco aumentado de recaída e parece ser um fator preditivo para a reduzida sobrevida livre de recaída. Em câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), outros autores corroboraram na identificação do aumento da expressão de XIAP, porém seu papel como fator prognóstico da doença ainda não está totalmente elucidado (FERREIRA *et al.*, 2001; HOFMANN *et al.*, 2002). No entanto, Chen e cols. (2010) avaliaram amostras de 72 pacientes com NSCLC avançado e concluíram que XIAP não é fator preditivo para a sobrevida desses pacientes.

Chen e cols. (2010) também avaliaram o papel da survivina como fator prognóstico de NSCLC avançado e verificaram que a baixa expressão dessa proteína foi associada a uma melhor resposta a quimioterapia. Outro trabalho avaliou a relação da expressão da survivina com as características clínicas e prognóstico de pacientes com NSCLC. A análise de 62 amostras de pacientes por imuno-histoquímica mostrou que a survivina está relacionada ao desenvolvimento, invasão e metástase desse subtipo de

câncer de pulmão (GAO *et al.*, 2012). Além disso, dados recentes da literatura sugerem que a presença do RNAm de survivina presente em sangue circulante de pacientes com NSCLC contribui para uma pior resposta ao tratamento com inibidores de EGFR (SHI *et al.*, 2014). O RNAm de survivina circulante também foi associado a uma pior resposta a quimioterapia e uma menor sobrevida livre de progressão em pacientes com NSCLC (DU *et al.*, 2014).

O papel da survivina no câncer tem sido bastante estudado, uma vez que sua expressão não é detectável em células normais (apenas em tecido com alta taxa proliferativa). Além disso, a expressão survivina tem sido observada como aumentada em diferentes neoplasias, sendo sua expressão associada à resistência ao tratamento (ALTIERI, 2003; FUKUDA & PELUS, 2006). Em nosso laboratório foi verificado que a alta expressão de survivina, em pacientes com LMC, estava associada ao índice de Sokal intermediário/alto. Essa informação sugere que a alta expressão de survivina se correlaciona ao pior prognóstico em pacientes com LMC (REIS *et al.*, 2011). Além disso, nosso grupo avaliou 81 amostras de pacientes com linfoma de grandes células B quanto à expressão e localização de survivina. A expressão de survivina foi correlacionada a uma menor sobrevida nesses pacientes (FACCION *et al.*, 2012).

Em estudo conduzido por Conte e cols. (2005) foi verificado que o aumento da expressão do RNAm da survivina em pacientes com LMC correlaciona-se com a progressão da doença para a crise blástica. Ademais, a superexpressão de survivina em pacientes com LMC ao diagnóstico foi associada a uma baixa resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe (SPELETAS *et al.*, 2011). A expressão aumentada de survivina também foi relatada em câncer de cólon. Em um estudo utilizando 168 amostras de pacientes com câncer de cólon foi verificado que a expressão do RNAm de survivina estava aumentada tanto em pacientes com câncer primário como em metastático (HERNANDEZ *et al.*, 2011). A expressão de survivina também se encontra em níveis aumentados no câncer de mama e dados da literatura sugerem sua superexpressão à progressão da doença. Além disso, a expressão de survivina também tem sido associada a uma menor sobrevida global e livre de doença (SINGH *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2006; HINNIS *et al.*, 2007).

Embora XIAP e survivina sejam as proteínas mais estudadas no câncer, alguns estudos tem avaliado a expressão de cIAP-1/2. Akyurek e cols. (2006) avaliaram a expressão de cIAP-1, cIAP-2 e XIAP em diferentes subtipos de linfomas de Hodgkin

(HL) e não- Hodgkin (NHL) e observam expressão diferenciada dessas IAPs em todas as amostras avaliadas. Em um estudo conduzido por Che e cols. (2012) as proteínas cIAP-1 e cIAP-2 foram avaliadas em 102 amostras de pacientes com carcinoma celular de bexiga. Os autores observaram que as amostras tumorais apresentaram maior expressão de ambas as proteínas quando comparadas a amostras de epitélio de bexiga normal; e amostras apresentando cIAP-1 com marcação nuclear foram correlacionadas ao estágio mais avançado da doença e recorrência tumoral.

1.1.4 Papel da Glicoproteína P na Resistência a Apoptose

Durante muitos anos, o modelo de resistência às drogas conferida pela Pgp esteve relacionado à sua atividade como proteína transportadora de drogas para o exterior das células culminando em acúmulo intracelular reduzido. Entretanto, além da atividade de efluxo, outras funções para a Pgp têm sido observadas. Robinson e cols. (1997) verificaram que as células derivadas de fibroblastos transfectadas com o gene *ABCB1*, expressando o fenótipo MDR, quando induzidas a apoptose por privação de soro, apresentavam um atraso na ativação da cascata apoptótica quando comparadas com as células do controle, que não expressavam a Pgp. Este estudo sugere que a superexpressão da Pgp pode promover a sobrevivência celular através de um mecanismo adicional ao de transporte de drogas.

Outro estudo, realizado por Smyth e cols. (1998), verificou que células superexpressando Pgp eram mais resistentes a apoptose induzida através do receptor Fas utilizando o ligante FasL ou anticorpos anti-Fas. Em adição, a inibição da Pgp através de anticorpo monoclonal anti-Pgp foi capaz de reverter à resistência a apoptose via Fas. No entanto, a indução da morte celular utilizando-se substâncias que não ativam as caspases não foi afetada pela superexpressão da Pgp, sugerindo que essa proteína causa resistência a apoptose dependente das caspases. Em outro trabalho conduzido por Johnstone e cols. (1999), também foi demonstrado que a Pgp causa resistência a apoptose induzida por radiação ultravioleta e por TNF em células leucêmicas, ambas associadas à ativação de receptores de membrana. Mais recentemente, foi demonstrando que a resistência a apoptose, via Fas, causada pela superexpressão da Pgp, ocorre através da inibição da auto ativação da caspase-8 no complexo DISC (RUEFLI *et al.*, 2002).

Estudos *in vivo* têm contribuído na atribuição da atividade da Pgp na resistência a apoptose. Sabe-se que os blastos de LMA cultivados *in vitro* que são resistentes a apoptose, apresentam também resistência a despolarização da membrana mitocondrial. No entanto, Pallis e cols. (2003) verificaram em amostras de células de pacientes com LMA não tratados, cultivadas *in vitro*, que a expressão e a função da Pgp contribuem para resistência a apoptose espontânea. Em LMA infantil, Shman e cols. (2008) verificaram que na maioria dos casos avaliados, a subpopulação de células CD34⁺ expressavam maiores níveis da Pgp, assim como da Bcl2, quando comparadas a subpopulação de células CD34⁻. Além disso, nestes casos, as células CD34⁺ apresentaram menor taxa de apoptose espontânea que as células CD34⁻. Os autores atribuíram à resistência a apoptose somente a expressão de Bcl2. No entanto, Buda e cols. (2008) ressaltam os estudos que demonstram o papel da Pgp na resistência a apoptose e sugerem que a resistência na subpopulação de CD34⁺ seja também atribuída a superexpressão da Pgp.

Alguns estudos têm verificado que a resistência ao tratamento em algumas neoplasias pode estar associada a Pgp e também a membros antiapoptóticos da família Bcl-2 (LI *et al.*, 2011; VOGLER *et al.*, 2011). Em um estudo *in vitro* foi identificado em células de osteossarcoma, uma regulação comum entre a superexpressão de Pgp e Bcl-2, e uma diminuição da expressão de Bax (WANG *et al.*, 2010b). Maráz e cols. (2011) analisaram a expressão de Pgp e de Bcl-2 em 32 amostras de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células tratadas com paclitaxel. O estudo associou a superexpressão de ambas as proteínas a uma pior resposta ao tratamento e a uma menor sobrevida livre de progressão.

A relação entre a superexpressão da Pgp e de proteínas que inibem a apoptose se estende às IAPs. Um estudo comparativo entre a linhagem de LMA (HL60) e sua variante HL60R (resistente, que superexpressa Pgp) verificou que a resistência nestas células está associada não somente a Pgp, mas também ao aumento da expressão de algumas IAPs como a survivina e a XIAP (NOTARBARTOLO *et al.*, 2002). Um estudo envolvendo 26 pacientes com mieloma múltiplo foi observado o aumento da expressão do RNAm de *ABCBI* após quimioterapia na maioria dos pacientes. Os autores do estudo evidenciaram que concomitante ao aumento da expressão de *ABCBI* foi observado um aumento na expressão dos RNAm da survivina, XIAP, cIAP1 e cIAP2 nos pacientes que apresentaram pior resposta ao tratamento quando comparados aos

pacientes que apresentaram prognóstico mais favorável. Não houve correlação com um prognóstico desfavorável em pacientes que apresentaram aumento na expressão das IAPs, sem o aumento de *ABCB1*. Sendo assim, o estudo sugere que a survivina e a XIAP podem contribuir para um pior prognóstico em pacientes com mieloma múltiplo somente quando essas proteínas estão associadas à superexpressão de *ABCB1* (NAKAGAWA *et al.*, 2006).

Um estudo conduzido por Shi e cols. (2007), no qual foram utilizadas linhagens de câncer de mama e de carcinoma epidermóide foi verificado que a superexpressão e a inibição da survivina e da XIAP não induziram alteração na expressão da Pgp. O estudo ainda demonstrou que ambas survivina e XIAP não interagem diretamente com a Pgp, sugerindo que a contribuição dessas proteínas no fenótipo de resistência ocorre de maneira independente. No entanto, no mesmo ano outro grupo demonstrou que os níveis do RNAm da survivina diminuía de forma tempo-dependente, através da inibição química da Pgp; e que a inibição da survivina com RNAi leva a diminuição da função da Pgp verificada pela quantificação do quimioterápico adriamicina. O estudo ainda sugere que a superexpressão da Pgp poderia mediar o transporte intracelular da survivina favorecendo a função antiapoptótica desta proteína (LIU *et al.*, 2007).

Kim e cols. (2009) inibiram a expressão da Pgp com RNA de interferência e verificaram que a expressão da XIAP não se altera sugerindo que a resistência a apoptose conferida por Pgp e XIAP ocorre através de mecanismos independentes em células de condrossarcoma. No entanto, os autores constataram que a inibição simultânea da expressão de ambas as proteínas foi necessária para uma contribuição mais eficiente na inibição da sobrevivência celular.

Em nosso laboratório a relação da Pgp com as IAPs também tem sido explorada. Um estudo desenvolvido em 2011 revelou que células de LMC sem o fenótipo MDR, tornam-se menos susceptíveis ao quimioterápico vincristina quando submetidas à superexpressão de Pgp e survivina mediada por indução química (SOUZA *et al.*, 2011). Em outro estudo, utilizando células de LMC com o fenótipo MDR verificamos uma diminuição nos níveis de expressão da XIAP quando as células MDR-positivas foram tratadas com vincristina na presença de ciclosporina A – um bloqueador da atividade da Pgp. Ademais nesse mesmo estudo, verificamos que a Pgp contribuiu em conjunto com as IAPs para resistência à cisplatina, um quimioterápico que não é substrato dessa bomba de efluxo (SOUZA *et al.*, 2012). Recentemente nós verificamos que a expressão

da Pgp está diretamente correlacionada a expressão da XIAP em células de pacientes com LMC e utilizando linhagens de LMC. Utilizando células de linhagens derivadas de LMC observamos que o tratamento com imatinibe promoveu aumento na expressão da Pgp e da XIAP contribuindo para resistência a este fármaco (SILVA *et al.*, 2013). Seca e cols. (2011), também verificaram uma relação entre a expressão de Pgp e XIAP em LMC. Ao inibir simultaneamente a expressão de ambas as proteínas a linhagem resistente de LMC, se tornou sensível mediante tratamento com imatinibe.

1.1.5 Moléculas relacionadas com a glicoproteína-P e associadas à resistência em neoplasias

1.1.5.1 YB-1

A proteína YB-1 (*Y-box binding protein-1*) pertence a uma família *Y-box* de proteínas com um domínio conservado denominado CSD (*Cold Shock Domain*), que está envolvido com seu transporte nuclear e ligação ao DNA. Dessa forma, a distribuição subcelular de YB-1 dita suas funções; quando localizado no núcleo, YB-1 atua como um fator transcricional para diferentes genes alvos, incluindo *ABCB1/Pgp*. Além disso, YB-1 está associado ao processamento e transporte de RNA do núcleo para o citoplasma. No citoplasma YB-1 tem sido associado a diversas funções, dentre elas a de manter a estabilidade e favorecer a tradução de RNAm (SKABKIN *et al.*, 2001; KOHNO *et al.*, 2003; BRANDT *et al.*, 2011).

YB-1 se liga na região promotora do gene *ABCB1/Pgp* e favorece sua transcrição promovendo assim o aumento da expressão do RNAm e da proteína Pgp. Além disso, estudos têm demonstrado a correlação entre YB-1 e a expressão de Pgp, uma vez que a inibição de YB-1 levou a redução nos níveis de *ABCB1/Pgp*. Desta forma, a expressão e localização de YB-1 têm sido associadas à quimiorresistência em diferentes tumores, como câncer de mama, ovário, pulmão, próstata e osteosarcoma (JANZ *et al.*, 2002; KUWANO *et al.*, 2003; KUWANO *et al.*, 2004; KASHIHARA *et al.*, 2009). Shibahara e cols. (2001) analisaram 196 amostras de pacientes com NSCLC e verificaram que 88 apresentavam YB-1 nuclear. No estudo, os autores associaram a expressão nuclear de YB-1 a focos metastáticos em linfonodos e a um pior prognóstico.

YB-1 também regula EGFR (*epidermal growth factor receptor*) por se ligar em sua região *enhancer*. Alguns estudos sugerem que o aumento da expressão de YB-1 e sua fosforilação estão relacionados à expressão de EGFR em células de câncer de mama (BERQUIN *et al.*, 2005; STRATFORD *et al.*, 2008). Em amostras de pacientes com câncer de pulmão (NSCLC) foi verificada uma correlação positiva entre a expressão nuclear de YB-1 e a expressão de EGFR, associados a um pior prognóstico. Além disso, *in vitro* ainda foi verificado que o silenciamento de YB-1 leva a diminuição da expressão de EGFR (HYOGOTANI *et al.*, 2012).

O papel de YB-1 no câncer também está relacionado a progressão tumoral. Estudos têm sugerido um papel para YB-1 na proliferação/progressão do ciclo celular (JURCHOTT *et al.*, 2003; BASAKI *et al.*, 2010). Okamoto e cols. (2000) verificaram que YB-1 e p53 podem interagir *in vitro* e *in vivo*. Além disso, seus dados *in vitro* sugerem que YB-1 influencia na diminuição da transativação de p21 por p53. Corroborando esses dados, outro estudo demonstrou que YB-1 reprime p53 em sua função de transativação de promotores de genes pró-apoptóticos como *BAX* e *NOXA* (HOMER *et al.*, 2005). A interação de YB-1 com a região promotora de p53 também favorece a redução da expressão e a atividade de p53, e conseqüentemente sua função de transativar seus genes alvos (LASHAM *et al.*, 2003). Por fim, é importante ressaltar que a regulação de p53 por YB-1 também pode ser um fator importante para regulação da expressão da Pgp. Sabe-se que dependendo do *status* de p53 – selvagem ou mutada – a regulação do gene de *ABCBI/Pgp* é negativa ou positiva, respectivamente. A região promotora de *ABCBI/Pgp* possui sítio para ambas as formas de p53 (STRAUSS & HAAS, 1995; JOHNSON *et al.*, 2001).

1.1.5.2 NF- κ B

A família de proteínas NF- κ B compreende diferentes subunidades que interagem entre si fazendo homo e heterodímeros, e atuam como fatores transcricionais em resposta a diferentes estímulos. A interação mais estudada refere-se ao heterodímero p50-p65. NF- κ B é regulado negativamente no citoplasma, através da interação com proteínas da família I κ B – como I κ B α , por exemplo - que impedem sua translocação para o núcleo e conseqüentemente sua interação com o DNA. Para que ocorra a dissociação de NF- κ B e I κ B, a proteína I κ B é fosforilada por um complexo proteico - IKKs (I κ B quinases) – que o leva para degradação via ubiquitina proteassoma e

liberação de NF- κ B e sua translocação para o núcleo e consequente ativação da transcrição de genes alvos (Figura 1.7) (HAYDEN & GHOSH, 2004; HÄCKER & KARIN, 2006).

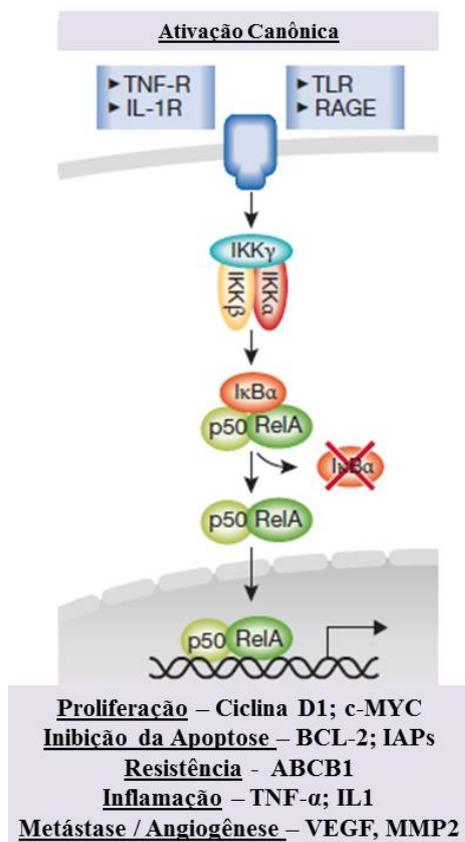


Figura 1.11. Representação esquemática da via clássica de NF- κ B. A partir da ativação por ligantes específicos, o complexo proteico formado por subunidades de *IKK* fosforila o inibidor endógeno de NF- κ B, I κ B α o induzindo a degradação via proteassoma. Em seguida NF- κ B transloca para o núcleo onde transcreve seus genes alvos. (Adaptado de BOLLRATH & GRETEN 2009).

NF- κ B regula a expressão de diversos genes, e embora seja ativado por citocinas pró-inflamatórias, este fator transcricional regula genes envolvidos com a tumorigênese. Foi verificado que NF- κ B regula positivamente genes relacionados com a proliferação celular, invasão/ metastase e angiogênese, inibição da apoptose e resistência tumoral (OKAMOTO *et al.*, 2007). Relatos na literatura sugerem o envolvimento de NF- κ B no câncer, uma vez que esse fator encontra-se ativado em tumores sólidos como carcinoma de mama, melanoma, câncer pancreático e adenocarcinoma de pulmão (BALDWIN, 2001; YAMAMOTO & GAYNOR, 2001). NF- κ B também tem sido descrito como constitutivamente ativado em neoplasias hematológicas, como mieloma múltiplo, LMC,

LMA e LLA (leucemia linfocítica aguda), sendo associado à sobrevivência e expansão clonal (BRAUN *et al.*, 2006).

Kuo e cols. (2002) demonstraram que NF- κ B, após ativação via PI3-K é capaz de se ligar na região promotora de *ABCB1/Pgp* e transcrever o gene. Desta forma, NF- κ B favorece o fenótipo de resistência em células tumorais. Além disso, tem sido demonstrando que alguns fármacos, como a metformina é capaz de inibir a transcrição do gene *ABCB1/Pgp* em células resistentes, através da regulação da via de NF- κ B (KIM *et al.*, 2011). Em outro estudo, Assef e cols. (2009) demonstraram que a resistência ao imatinibe, em uma linhagem Pgp-positiva de LMC, foi revertida pela inibição de NF- κ B.

O papel de NF- κ B na resistência tumoral se estende às proteínas anti-apoptóticas NF- κ B atua também como fator transcricional para alguns membros da família das IAPs como survivina, XIAP, cIAP-1 e cIAP-2 (KIM *et al.*, 2006; HARIKUMAR *et al.*, 2009). Kawakami e cols. (2005) demonstraram *in vitro* que NF- κ B é capaz de se ligar ao promotor do gene da survivina, e que a sua inibição favorece a apoptose. Em outro estudo conduzido em linfomas, observou-se que NF- κ B regula a expressão do gene da survivina, *in vivo* e *in vitro*; e que a inibição de NF- κ B leva a diminuição de survivina. O estudo associou a expressão de survivina a um maior *status* proliferativo com consequência na agressividade e a em um pior prognóstico em linfomas de células B (TRACEY *et al.*, 2005).

NF- κ B também está associado à ativação da transcrição dos genes da XIAP e c-IAP1. A inibição *in vitro* de NF- κ B com inibidor químico ou com siRNA induz a diminuição da expressão de XIAP e c-IAP1 em células de carcinoma de tireóide (MENG *et al.*, 2012). Em células de câncer de cólon, a inibição de NF- κ B também induziu como consequência, a diminuição da expressão de XIAP, survivina e c-IAP1 (YANG *et al.*, 2010). Por fim, é importante ressaltar que a ativação de NF- κ B pode ser modulada por XIAP e c-IAP1/2 mediante estresse celular causado por quimioterápicos. Essas IAPs interagem com proteínas que regulam positivamente a via de ativação de NF- κ B (LU *et al.*, 2007; JIN *et al.*, 2009).

1.1.5.3 MicroRNAs

Atualmente sabe-se que eventos epigenéticos podem regular a expressão do gene *ABCB1*, ativando-o ou inibindo-o, através da atuação de histonas acetilases (HATs) e deacetilases (HDACs) na cromatina, metilação de ilhas CpG na região promotora de *ABCB1* e a expressão de microRNAs (miRs) que são diferencialmente expressos em células tumorais resistentes (EL-OSTA *et al.*, 2002; BAKER & EL-OSTA, 2004; LI *et al.*, 2010). Os miRs são uma classe de pequenas moléculas endógenas de RNAs capaz de ligar-se às sequências complementares na 3' UTR (*untranslated region*) de diferentes RNAm resultando na repressão da tradução ou na degradação dessas moléculas-alvo. Como consequência, ocorre redução nos níveis proteicos dos genes-alvo, seguida ou não da diminuição dos níveis de RNAm (ZHAO & SRIVASTAVA, 2007).

Estudos têm abordado o papel dos miRs na contribuição de um fenótipo mais tumoral e de resistência ao tratamento em diferentes neoplasias. O miR-21 foi identificado como superexpresso na maioria das malignidades humanas e sua regulação é positivamente controlada por oncogenes transcricionais como NFκB. A expressão de miR-21 tem sido associada à patogênese tumoral incluindo progressão e metástase, e alguns estudos sugerem que o aumento de sua expressão pode contribuir para falha a resposta a quimioterapia com agentes citotóxicos (PAN *et al.*, 2010; HWANG *et al.*, 2010).

No que se refere a resistência mediada por Pgp, Zhu e cols. (2008) observaram que miR-27a e miR-451 estão associados de maneira indireta a ativação da expressão de Pgp e que tais miRs ainda contribuem para a resistência a agentes quimioterápicos em células tumorais. Ademais, Jaiswal e cols. (2012) verificaram que as MPs derivadas de células resistentes carregam miR-27a e miR-451 e que estes estão relacionados ao fenótipo MDR.

1.1.6 Justificativa para o estudo

A MDR em células tumorais é classicamente causada pela superexpressão da bomba de efluxo Pgp, e esse fenótipo é uma das principais causas que desfavorece o sucesso do tratamento de pacientes com câncer (GOTTESMAN, 2002). Ao longo dos anos diferentes estudos tem demonstrado que a expressão de Pgp, concomitante a alterações na expressão de outras proteínas - relacionadas a ativação da cascata apoptótica, por exemplo - favorecem ainda mais o fenótipo de resistência, tornando-o multifatorial (GOTTESMAN *et al.*, 2006; GILLET *et al.*, 2010; GILLET *et al.*, 2011).

Em estudos desenvolvidos em nosso laboratório têm-se verificado uma correlação positiva entre a expressão da Pgp e a resistência a apoptose, principalmente referente à expressão das IAPs. Em trabalhos recentes, verificamos uma possível correlação entre a expressão de Pgp e a expressão da survivina em LMC, tanto *in vitro* como *in vivo* (SOUZA *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2011). Corroborando esses achados, ainda verificamos que a XIAP favorece para uma menor taxa de apoptose induzida por fármacos, principalmente quando há expressão concomitante de Pgp (SOUZA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013). Além disso, autores têm sugerido a participação da Pgp na resistência a apoptose induzida pela via extrínseca da apoptose 2 (RUEFLI *et al.*, 2002; MIZUTANI *et al.*, 2008; SHMAN *et al.*, 2008). Assim, em conjunto, esses dados indicam que, além de mediar o fenótipo MDR, a Pgp pode interferir negativamente na ativação da cascata apoptótica favorecendo a resistência a morte celular.

Referente aos mecanismos de aquisição do fenótipo MDR, alguns modelos têm sido propostos, principalmente, no que se refere ao desenvolvimento da expressão de Pgp. Foi demonstrado que a expressão de Pgp pode ser adquirida por uma célula tumoral mediante o tratamento com fármacos, contato intercelular direto ou mediado por nanotúbulos e através de micropartículas de membrana (AMBUDKAR *et al.*, 2005; BEBAWY *et al.*, 2009; PASQUIER *et al.*, 2012). No entanto, os mecanismos relacionados a aquisição de um fenótipo multifatorial em células tumorais mediado pela expressão de Pgp e proteínas que contribuem para inibição da apoptose ainda não estão totalmente elucidados. Ademais, embora haja discussão na literatura sobre a expressão de Pgp e de outros genes e proteínas que, concomitantemente, podem contribuir para o fenótipo de resistência, não estão especificados quais genes das vias intrínseca e extrínseca da apoptose são afetados mediante a expressão de Pgp e conseqüentemente, expressão do fenótipo de resistência multifatorial. Assim e diante de todo contexto

apresentado, se faz necessário um melhor entendimento nos mecanismos que contribuem para um fenótipo multifatorial mediados pela expressão da Pgp e de proteínas relacionadas a via da apoptose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a aquisição do fenótipo multifatorial mediado por micropartículas de membranas (MPs) em células tumorais e caracterizar a relação da expressão da Pgp com genes e proteínas que participam das vias que regulam a apoptose

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Parte 1 - Avaliar a aquisição do fenótipo multifatorial mediado por MPs de membranas em células tumorais.

- Identificar e caracterizar as MPs provenientes de células Pgp-positivas;
- Caracterizar o perfil MDR nas células tumorais sensíveis a quimioterápicos após co-cultivo com MPs derivadas de células Pgp-positivas;
- Avaliar a expressão das IAPs survivina, XIAP e cIAP-1 nas células tumorais sensíveis a quimioterápicos após co-cultivo com MPs derivadas de células Pgp-positivas;
- Avaliar o papel dos fatores transcricionais YB-1 e NFκB na contribuição do fenótipo MDR nas células tumorais sensíveis a quimioterápicos após co-cultivo com MPs derivadas de células Pgp-positivas;
- Avaliar a expressão dos microRNAs (miRs) miR-27a, miR-451 e miR-21 nas células tumorais sensíveis a quimioterápicos após co-cultivo com MPs derivadas de células Pgp-positivas.

2.2.2 Parte 2 - Caracterizar a relação da expressão da Pgp com genes e proteínas que participam das vias que regulam a apoptose.

- Avaliar o perfil de expressão dos genes envolvidos na regulação da apoptose, por *PCR array*;
- Validar os resultados obtidos no *PCR array* através da avaliação dos níveis de RNAm e proteicos do gene identificado;
- Avaliar uma possível correlação entre a expressão do gene identificado com a expressão e função de efluxo da Pgp;
- Avaliar o papel do gene identificado com o fenótipo de resistência a apoptose associada à expressão de Pgp.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parte 1

3.1.1 Cultura de células e co-cultivo celular - células Pgp-negativas com células Pgp-positivas

As linhagens celulares utilizadas (Tabela 3.1) foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2mM de glutamina (Gibco), e mantidas em estufa a 37° C com 5% de CO₂. Ressalta-se que as linhagens utilizadas no estudo tiveram seus genótipos determinados através da análise de seus perfis de polimorfismos STR (*short tandem repeats*) em locus humanos por PCR.

Tabela 3.1: Linhagens celulares

Linhagem celular	Origem	Código	Observações
K562	Leucemia mielóide crônica (LMC)	ATCC, CCL-243	Pgp-negativa
Lucena (RUMJANEK et al., 2001)	LMC	Linhagem derivada a partir da K562	Pgp-positiva Cultivo na presença de vincristina (60nM)
MCF-7	Carcinoma de mama	ATCC, HTB-22	Pgp-negativa
A549	Adenocarcinoma de pulmão (não pequenas células)	ATCC, CCL-185	Pgp-negativa

ATCC=www.atcc.org; Pgp= Glicoproteína P

As linhagens Pgp-negativas MCF-7 e A549, chamadas aqui de células receptoras, foram co-cultivadas com a linhagem Pgp-positiva Lucena (célula doadora) por 24 h. Para realização do co-cultivo as células receptoras foram previamente plaqueadas em placas de seis poços (área: 0,32 cm² – 3x10⁵ células), placas de 24 poços (área: 1,88 cm² – 5,8x10⁴ células) ou em lamínulas (diâmetro: 12 mm - 5x10⁴ células).

Concomitantemente ao plaqueamento das células receptoras, as células doadoras foram cultivadas em garrafa de 75 cm² na concentração de 2x10⁵/ml na ausência quimioterápico vincristina (Tecnocris 1 mg/ml – Zodiac). Este dia de experimento foi chamado de D1. Para o co-cultivo, foram adicionados às placas, onde as células receptoras foram aderidas, insertos do tipo Transwell® de 3 µm (membrana de polietileno, de seis ou 24 well, Millicell, Millipore). Em seguida as células doadoras foram adicionadas na concentração de 4x10⁵/ml à parte superior dos insertos. Este dia de experimento foi chamado de D2. É relevante ressaltar que no co-cultivo não há contato entre as células, estas apenas compartilham o mesmo microambiente através do meio de cultura (Figura3. 1A). Após 24h de co-cultivo, os insertos foram retirados cuidadosamente, para que não houvesse contato indesejado entre as linhagens. Mediante a retirada dos insertos, as células receptoras foram lavadas com PBS, submetidas à tripsinização (Trispsina 0.125%) e processadas para os experimentos de interesse. Esse dia foi chamado de D3 (Tabela 3.2).

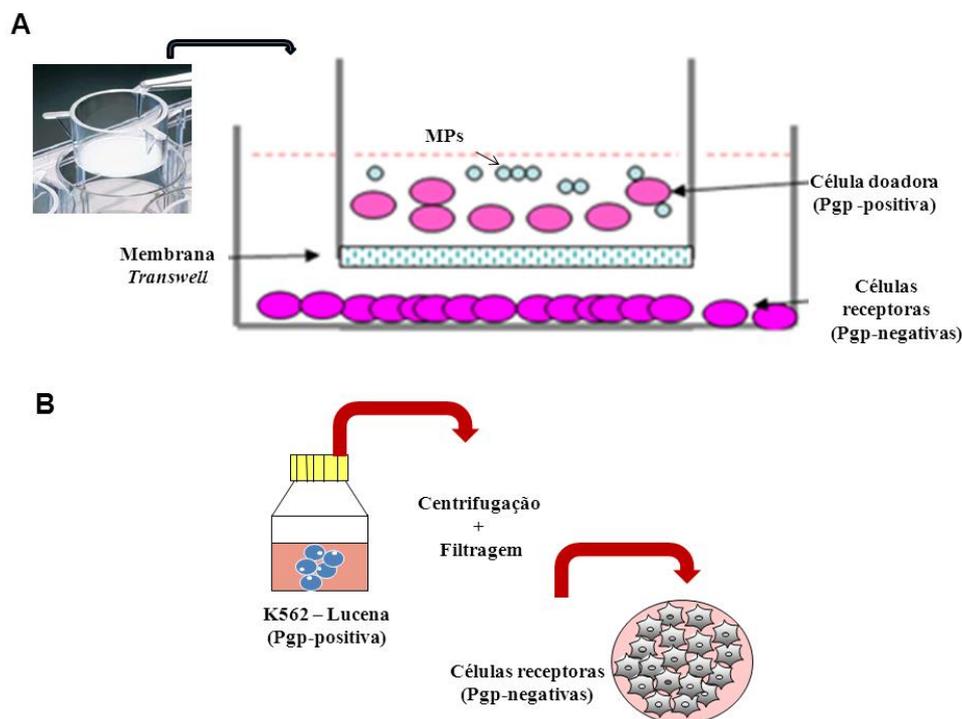


Figura 3.1 Representação esquemática do cultivo celular. (A) Células receptoras foram plaqueadas em placas e após 24h, as células doadoras foram adicionadas no mesmo microambiente, porém separadas por membrana *transwell*. (B) Células receptoras foram plaqueadas em placas e após 24h, o meio condicionado das células doadoras (centrifugado e filtrado) foi adicionado no mesmo microambiente. Pgp= glicoproteína P; MPs= micropartículas.

Tabela 3.2: Esquema experimental referente ao co-cultivo celular

Co-cultivo celular	Dia	Meio condicionado
Plaqueamento das células receptoras e, Retirada da VCR da célula doadora	D1	Plaqueamento das células receptoras e, Retirada da VCR da célula doadora
Co-cultivo das linhagens receptoras com a linhagem doadora através do inserto Transwell®	D2	Preparação do meio condicionado e, Cultivo das células receptoras com o meio condicionado
Experimentos em 24h	D3	Experimentos em 24 h

VCR= vincristina

3.1.1.1 Cultivo de células com meio condicionado

As células receptoras também foram cultivadas por 24h com meio proveniente das células Pgp-positivas, sendo este meio denominado “meio condicionado”. Para tal cultivo, após o D1, as células Lucena foram centrifugadas por 10 min a 1000g. Em seguida, o meio foi filtrado com sistema a vácuo (filtro *TTP*, com poro de 0,22µm). Todo esse procedimento foi realizado para garantir a retirada de células (centrifugação) e de micropartículas de membrana (filtração). O meio condicionado foi, então, adicionado às células receptoras (D2), e estas foram mantidas em cultivo por mais 24h para os experimentos de interesse (D3) (Figura 4.1B).

3.1.2 Isolamento de micropartículas

Para o isolamento de MPs, as células Pgp-positivas, Lucena, foram cultivadas até atingirem a concentração de $2,5 \times 10^8$ em 50mL de volume final podendo essa quantidade variar até 0,6L de células dependendo dos experimentos realizados. Após atingirem a concentração ideal, as células foram centrifugadas por 10 min a 1000g, e o pellet foi descartado. Como as células Lucena são células cultivadas em suspensão, o

sobrenadante foi novamente centrifugado por 5 min a 500g para garantir que não houvesse contaminação com células. Embora não houvesse pellet nessa segunda centrifugação, optamos por descartar os últimos 5mL de sobrenadante no final do tubo. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado (Sorvall RC6⁺ - Thermo) por 20 min a 30.000g e a 4° C. Considerando que o pellet formado são as MPs, foi adicionado PBS estéril e as MPs foram novamente centrifugadas por 20 min a 30.000g e a 4° C. Este protocolo foi adaptado de Lima *et al.*, 2009 e Bebawy *et al.*, 2009.

As MPs isoladas foram identificadas por citometria de fluxo (FacsScalibur – BD), após marcação com FITC-anexina V por 15 min a temperatura ambiente (Pasquier *et al.*, 2012). Além disso, as MPs foram submetidas à análise proteica e de RNA.

3.1.2.1 Co-cultivo de MPs com células receptoras

As células receptoras Pgp-negativas foram co-cultivadas diretamente com MPs derivadas das células Lucena, Pgp-positivas, após plaqueamento e aderência das células receptoras em placas de 6 poços. Após 24 h de co-cultivo, as células receptoras foram lavadas com PBS e processadas para os experimentos de interesse.

3.1.3 Análise da expressão da glicoproteína P

3.1.3.1 Imunodeteção por citometria de fluxo

Para detecção da expressão de Pgp, 5×10^5 células de ambas as linhagens receptora A549 e MCF7 foram submetidas à incubação com solução de bloqueio contendo BSA a 2% por 30 min. Em seguida o pellet foi incubado com 5 μ L de anticorpo anti-Pgp clone UIC2 conjugado com PE (Immunotech) por 30 min. Ao término desta incubação, as células foram lavadas 2x com PBS/BSA 2%, e fixadas com 300 μ L de formaldeído a 1% e mantidas a 4° C para posterior aquisição no citômetro de fluxo (CyanADP-DAKO – programa Summit v4.3). Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente. As células A549 e MCF7 foram avaliadas antes e após o co-cultivo com as células Pgp-positivas. As MPs derivadas das células Lucena foram submetidas ao mesmo protocolo (SOUZA *et al.*, 2011).

3.1.3.2 Imunodeteção por Western blot

Para detecção da expressão de Pgp, 1×10^6 células de ambas as linhagens receptora A549 e MCF7 foram homogeneizadas em 100 μ l de tampão contendo 10mM TrisCl pH 8.0, 0.1% Triton X-100, 10mM MgSO₄, 2mM CaCl₂, 1% v/v aprotinina, 1mM AEBSF, 2mM DTT e 20 μ g/ml DNase. Em seguida as amostras foram aquecidas a 37° C por 5 min e rapidamente congeladas em gelo seco ou no nitrogênio líquido. Após esse procedimento, as amostras foram submetidas ao sonicador por um minuto e colocadas no gelo por mais um minuto. Esse procedimento foi repetido pelo menos 3 vezes. Após dosagem proteica pelo método Lowry (kit DC protein assay – BioRad), as amostras foram aquecidas a 37° C por 30 min na presença de tampão loading (115 mM Tris-HCl pH 6.8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100 mM de 2- β -mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol). 30 μ g de proteínas foram aplicadas no gel (BRIMACOMBE *et al.*, 2009).

A corrida eletroforética foi realizada em gel de gradiente 3-8% (NuPAGE Novex Tris-acetate gels – Invitrogen) e tampão de tris-acetato (Tris-Acetate SDS Running Buffer). As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond- ECL, Amersham Biosciences) utilizando transferência úmida com o tampão de transferência (25mM Tris, 0,2M Glicina, metanol 20%) por 3h a 100V. Ao término a membrana foi lavada com PBS-Tween por 5 min e submetida a bloqueio com leite em pó desnatado a 20% por 30 min. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo anti-Pgp (clone C219 na diluição de 1:10000) ou anti-Na⁺K⁺ATPase subunidade α (Clone M7-PB- M9 - Sigma) por aproximadamente 18 h. Após 3 lavagens com PBS-tween, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a HRP (HorseRadish-Peroxidase) por 1 h. Todos os anticorpos foram diluídos em TBS-Tween-Leite a 5%. Ao final da incubação com anticorpo secundário, a membrana de nitrocelulose foi lavada 3x com PBS-Tween e detectada através da reação de quimioluminescência utilizando o kit ECLTM (Western blotting Analysis System - Amersham Biosciences). A revelação foi realizada por meio digital utilizando o aparelho C-Digit Blot Scanner e o software Image Studio Lite. As MPs derivadas das células Lucena foram submetidas ao mesmo protocolo.

3.1.4 Ensaio funcional da glicoproteína-P

Para análise da atividade de efluxo da Pgp, as células receptoras foram submetidas ao ensaio funcional da Pgp utilizando o fluorocromo rodamina 123 (Rho). As células (5×10^5 para cada condição) após lavagem com PBS foram incubadas com Rho 123 (200 ng/ml) na presença ou ausência de 200 ng/ml de ciclosporina A (CsA) por 45 min a 37° C. Como controle negativo foram utilizadas células sem Rho 123 e CsA. Após o término da incubação, as células foram lavadas com PBS a 4° C e incubadas novamente (45 min a 37° C), apenas com CsA. Em seguida, as células foram analisadas por citometria de fluxo (CyanADP-DAKO – programa Summit v4.3). A taxa de efluxo de Rho-123 foi expressa como uma razão entre a média de intensidade de fluorescência (MFI) das células do tubo contendo Rho-123 e CSA, e a MFI das células do tubo contendo somente Rho-123 (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

3.1.5 Localização subcelular de proteínas por microscopia de fluorescência

Para a localização subcelular da Pgp (Immunotech clone UIC2, 1:10), NF- κ B/p65 (Cell Signalling, diluição 1:50) e YB-1 (Abcam, diluição 1:400), as células receptoras A549 e MCF7 foram previamente plaqueadas em lamínulas estéreis. Após lavagem com PBS pH 7,4 as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 20 min e após 3 lavagens de 5 min cada com PBS pH 8,0, as células foram incubadas com solução de 10 mM de NH_4Cl por 10 min. Mediante outras 3 lavagens com PBS pH 8,0 por 5 min cada e permeabilização com Triton X-100 0,5% por 10 min as células foram incubadas para bloqueio com 3% de BSA em PBS por 1h. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos primários por aproximadamente 18 h, e após lavagem com PBS pH 8,0, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa 488 (Invitrogen, diluição 1:500) ou anti-IgG conjugado Alexa 549 (Invitrogen, diluição 1:500) por 1 h. Os anticorpos foram diluídos em PBS-BSA 1%. Por fim, as células foram incubadas com DAPI por 20 min (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Molecular Probes - Invitrogen), para coloração nuclear, seguida de 3 lavagens com PBS pH 8,0. Na montagem das lamínulas sobre a lâmina utilizou-se n-propil-galato 2M (Sigma) para retenção da fluorescência. As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência NIKON Eclipse E200 (SOUZA *et al.*, 2011).

3.1.6 Marcação de anexina V com iodeto de propídeo

A apoptose nas linhagens receptoras foi avaliada mediante tratamento com os quimioterápicos, cisplatina (Accord Farmaceutica LTDA) e paclitaxel (Evotaxel 6mg/ml – Evolabis). As células foram submetidas ao ensaio de marcação com anexina V/PI de acordo com as instruções do fabricante (Anexin V conjugada FITC - kit Invitrogen) e analisadas no citômetro de fluxo (Cyan ADP-DAKO – programa Summit v4.3). A taxa de morte celular induzida pelos quimioterápicos foi considerada como o somatório de todos os quadrantes, exceto o que representa as células vivas (células sem marcação de anexina V e PI) (SOUZA *et al.*, 2012).

3.1.7 Fracionamento subcelular e Western blot

As células receptoras A549 e MCF7 foram submetidas ao fracionamento subcelular utilizando o kit NE-PER para separação das frações citoplasmática e nuclear (NE-PER® Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Reagent Kit, Thermo Scientific). O protocolo foi realizado de acordo com as especificações do fabricante para identificação da localização de NF κ B/p65 (Cell Signaling, diluição 1:2000) e Yb-1 (Abcam, diluição 1:1000). Como controles endógenos foram utilizados Lamina B para região nuclear (Calbiochem, diluição 1:500) e HSC70 para região citoplasmática (Santa Cruz, diluição 1:100). Essas proteínas, e também survivina (R&D Systems, diluição 1:1000), cIAP-1 (R&D Systems, diluição 1:500), XIAP (R&D Systems, diluição 1:2000), I κ B α (Cell Signaling, diluição 1:1000) e β -actina como controle endógeno (Sigma, diluição 1:5000) foram avaliadas por Western blot.

Para análise das proteínas em fração total, as células receptoras, doadoras e as MPs foram homogeneizadas em tampão contendo 40mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM EDTA, sendo adicionado na proporção de 1:1 dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS). Após dosagem pelo método Lowry, 50 μ g de proteínas foram adicionadas em géis desnaturantes de poliacrilamida e submetidas à eletroforese (Souza *et al.*, 2011). A transferência proteica e a marcação com anticorpos foram realizada como descrita anteriormente, exceto pela utilização de TBS-Tween (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 150mM de NaCl; 0,2% Tween-20) e bloqueio por 2 h. Os procedimentos referentes a revelação após da reação de quimioluminescência, incluíram a exposição da membrana em filmes

de raio X - Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences) ou Kodak Diagnostic Film/Min-R (Kodak) – e a revelação no processador Kodak X-OMAT.

3.1.8 Expressão de RNA mensageiro e microRNAs por PCR em tempo real

3.1.8.1 Extração de RNA mensageiro pelo método TRIZOL e síntese de cDNA

As células receptoras e doadoras foram lavadas 3x com PBS e o RNAm extraídos por Trizol (Trizol® Reagent; Invitrogen). O protocolo foi iniciado com adição de 200µL de clorofórmio, agitação manual e incubação por 3 min a temperatura ambiente. Prosseguindo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4° C, e a fase aquosa (sobrenadante) foi cuidadosamente retirada para evitar contaminação com o DNA. O RNA, de cada amostra foi então precipitado pela adição de 500µL de isopropanol e incubado por 10 min a temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 g por 10 min a 4° C. O pellet de RNA de cada amostra, foi lavado através da remoção do sobrenadante e adição de 1mL de etanol 75% seguido de centrifugação a 7500 g por 5 min a 4° C. O sobrenadante foi desprezado e após secar, o RNA foi dissolvido em 20µL de água Milli-Q estéril, homogeneizado e desnaturado a 60° por 10 min.

Ao final do procedimento, o RNA foi quantificado (NanoDrop 1000 Spectrophotometer Thermo Scientific) e 2µg de cada amostra foi utilizada para a síntese de uma fita única de cDNA como recomendado pelo fabricante do Kit Primed First-Strand Ready-to-Go (Amersham Biosciences).

O RNAm das MPs foi extraído pelo Kit *mirVana*TM miRNA Isolation e o cDNA sintetizado pelo kit Primed First-Strand Ready-to-Go conforme recomendação do fabricante.

3.1.8.2 Extração de microRNA e Síntese de cDNA

A extração dos miRNAs das células receptoras, doadoras e das MPs foi realizada de acordo com as instruções do Kit *mirVana*TM miRNA Isolation (Ambion). Ao final do procedimento, os miRNAs foram quantificados (NanoDrop 1000 Spectrophotometer Thermo Scientific) e 10ng de miRNA foram utilizados para a síntese do cDNA pelo kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription; os iniciadores para RT (*reverse*

transcription) utilizados foram fornecidos com as sondas no Kit, TaqMan® MicroRNA Assays. Para cada alvo - miR-21 (hsa-miR-21), miR-27a (TaqMan hsa-miR-27a), miR-451 (TaqMan hsa-miR-451) e controle endógeno RNU6B (TaqMan RNU6B).

3.1.8.3 PCR em tempo real

A expressão dos RNAm da Pgp, survivina, cIAP-1 e XIAP foram realizadas utilizando sondas específicas para Pgp/*ABCB1* (Hs01067802_m1), survivina/*BIRC5* (Hs000153353_m1), cIAP-1/*BIRC2* (Hs01112284) e XIAP/*BIRC4* (Hs01597783_m1); e o RNAm da β -actina como controle endógeno com a sonda β -actina/*ACTB* (Hs99999903_m1). Cada reação foi realizada em duplicada contendo cDNA, tampão Universal PCR Mastermix TaqMan® (Applied Biosystems), a respectiva sonda TaqMan® (TaqMan Gene Expression Assay - Applied Biosystems) e água estéril para equilibrar o volume. Os resultados foram obtidos pelo equipamento Step one Sequence Detection (Applied Biosystems®), e para análise da quantificação da expressão relativa utilizou-se a função exponencial $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct^{\text{gene alvo}} - Ct^{\text{gene constitutivo}}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct^{\text{tempo alvo}} - \Delta Ct^{\text{tempo de referência}}$).

Os níveis de expressão dos miR-21, miR-27a e miR-451 também foram realizadas pelo método TaqMan. Cada condição foi realizada em duplicada por experimento, contendo cDNA, tampão Master Mix (2X TaqMan Universal Mix), sonda (20X *TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems*) e água estéril para equilibrar a reação.

3.2 Parte 2

3.2.1 Cultura de células

As linhagens celulares utilizadas na segunda parte do trabalho (Tabela 3.3) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 2mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (SFB), e penicilina e estreptomicina, e mantidas em estufa a 37° C com 5% de CO₂. Para cultivo das linhagens HeLa MDR-off e HeLa Tet-off utilizou-se SFB *Tetracycline approved* (Clontech) e a linhagem HeLa MDR-off foi cultivada na presença de doxiciclina ou tetraciclina (Clontech) para silenciamento da expressão de

Pgp como previamente descrito por Alemán e cols. (2003), sem suplemento de outros antibióticos (Figura 3.2).

Tabela 3.3: Linhagens celulares

Linhagem celular	Origem	Código	Observações
HeLa MDR-off (ALEMÁN <i>et al.</i> , 2003)	Carcinoma cervical	-	Pgp-positiva
HeLa Tet-off (Clontech)	Carcinoma cervical	-	Pgp-negativa
HeLa	Carcinoma de cervical	ATCC, CCL-2	Pgp-negativa
KB-3-1	Linhagem derivada de HeLa		Pgp-negativa
KB-8-5 (AKIYAMA <i>et al.</i> , 1985)	Linhagem derivada de KB-3-1	-	Pgp-positiva Cultivo na presença de 10ng/ml de colchicina
KB-8-5-11 (AKIYAMA <i>et al.</i> , 1985)	Linhagem derivada de KB-8-5	-	Pgp-positiva Cultivo na presença de 100ng/ml de colchicina
KB-C1 (SHEN <i>et al.</i> , 1988)	Linhagem derivada de KB-3-1	-	Pgp-positiva Cultivo na presença de 1µg/ml de colchicina

ATCC=www.atcc.org; Pgp= Glicoproteína P

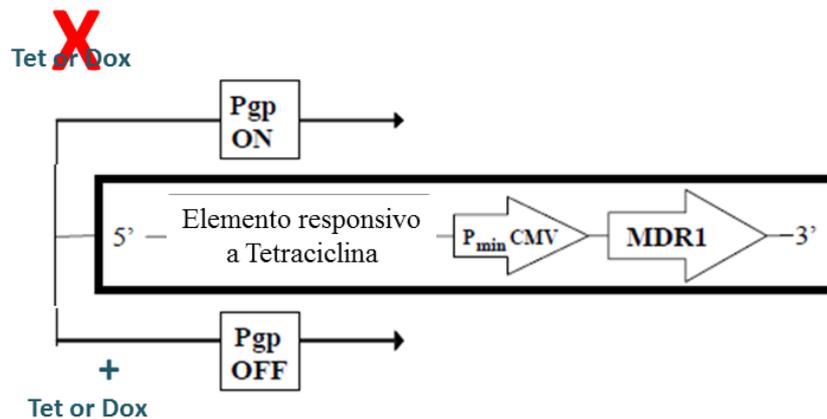


Figura 3.2 Representação esquemática da regulação Pgp/ABCB1/MDR1 pelo sistema Tet-off. O elemento responsivo a tetraciclina (TER) localiza-se antes do promotor mínimo do citomegalovírus (P_{min}CMV), o qual é reprimido na ausência de ativação. Na ausência de tetraciclina ou doxociclina, a proteína híbrida tTA (*tetracycline-controlled transactivator*) liga-se ao TER e ativa a transcrição de ABCB1. Na presença de tetraciclina ou doxociclina a proteína tTA não é capaz de se ligar ao TER e a transcrição de ABCB1 é reprimida (Adaptado de GALSKI *et al.*, 2013).

3.2.2 Expressão de RNA mensageiro por PCR em tempo real e PCR array

3.2.2.1 Extração de RNA mensageiro e Síntese de cDNA

O RNAm das células de interesse foram extraídos a partir do kit RNAeasy (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA foi mensurada (NanoDrop 1000 Spectrophotometer Thermo Scientific) e 1µg de RNA foi utilizado para síntese de cDNA utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen).

3.2.2.2 PCR em tempo real

A expressão dos RNAm da Pgp e TRAIL, foram realizadas utilizando sondas específicas para Pgp/ABCB1 (Hs00184491_m1) e TRAIL/TNFSF10 (Hs00234356_m1); e o RNAm da do GAPDH (Hs99999905_m1) como controle endógeno. A reação foi realizada como descrita anteriormente (3.1.8.3) e os resultados foram obtidos pelo equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

3.2.2.3 PCR array

Para expressão gênica utilizando PCR array, 100ng de cDNA foram utilizados para a corrida do TaqMan[®] Array Micro Fluidic Card. O preparo das amostras foi realizado de acordo com a instrução do fabricante. Foram utilizadas duas placas diferentes para análise da expressão gênica, uma delas customizada contendo 380 genes relacionados a MDR - Taqman Low Density Arrays_Applied Biosystems (Gillet *et al.*, 2011) - e a outra contendo 96 genes relacionados a apoptose (TaqMan[®] Array Human Apoptosis). Os resultados foram obtidos pelo aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e a análise dos resultados avaliados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando o SDS RQ Manager software (GILLET *et al.*, 2011).

3.2.3 Ensaios de transfecção

3.2.3.1 Transfecção plasmidial

O plasmídeo pCMV6-XL5 (OriGene) foi utilizado para transfecção de TRAIL nas células HeLa MDR-Off, KB-8-5-11 e KB-C1. A sequência contida no plasmídeo foi confirmada por sequenciamento e o mesmo expandido em bactérias competentes (Invitrogen). O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit Hispeed Plasmid Maxi (Qiagen).

Para a transfecção de pCMV6-XL5 nas células eucarióticas foram utilizados 2 μ g de DNA utilizando o Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit R (Lonza) e o programa O-005 do aparelho Nucleofector[™] II (Lonza). O protocolo foi realizado de acordo com a recomendação do fabricante referente às células HeLa. Como controle do ensaio de transfecção utilizou-se 2 μ g de pmaxGFP vector (Lonza). As células HeLa MDR-Off, KB-8-5-11 e KB-C1 foram avaliadas 24h após transfecção.

3.2.2.1 Infecção com baculovírus BacMam-Pgp

Os clones de expressão para Pgp selvagem e mutante E556Q/E1206Q foram gentilmente cedidos pelo Dr. Suresh Ambudkar (Sauna *et al.*, 2002; Kapoor *et al.*, 2013). Células HeLa (2.5x10⁶ células/condição) foram colocadas em 3mL de DMEM e infectadas com os clones de Pgp selvagem e mutante, separadamente (título de 50 partículas virais por célula). Após incubação de 1h à 37° C, foram adicionados mais

17mL de DMEM e as células foram incubadas por mais 2h. Em seguida, 10mM de butirato de sódio foi adicionado e a expressão e função de Pgp e dos alvos de interesse foram avaliadas após 24h.

3.2.3.3 Silenciamento gênico

Para o silenciamento da expressão da Pgp e TRAIL o vetor shRNA pLKO.1-puro (Addgene number 10878) foi utilizado como arcabouço para inserção das sequências CCGAACACATTGGAAGGAAAT (clone ID: TRCN0000059683, Sigma-Aldrich) formando assim o vetor Pgp-shRNA; GCTGTAACTTACGTGTACTTT, CCATTCTACAGTTCAAGAAA e GTAACAAATGAGCACTTGATA (clone IDs: TRCN000005925, TRCN000005927 e TRCN000005928, respectivamente, Sigma-Aldrich) formando assim os vetores TNFSF10-shRNAs 25, 27 e 28. Como controle utilizou-se uma sequência que não parecia em nenhum alvo humano conhecido - *non-targeting* shRNA (shRNA NS).

As partículas lentivirais foram produzidas *via* Lipofectamina 2000 (Invitrogen) em células 293T transfectadas com os Pgp-shRNA, TRAIL-shRNAs ou NT-shRNA junto com o plasmídeo com envelope lentiviral (pMD2.G, Addgene number 12259) e plasmídeo de empacotamento lentiviral (psPAX2, Addgene number 12260). As células-alvo (KB-8-5-11 e KB-C1 para Pgp-shRNA e NT-shRNA; e KB-3-1 para TRAIL-shRNAs e NT-shRNA) foram transduzidas individualmente para cada shRNA contendo as partículas virais na presença de 8µg/ml Polybrene® e as células silenciadas foram selecionadas com 3µg/ml de puromicina. As células KB-8-5-11 e KB-C1 foram selecionadas com 5µg/ml puromicina na presença de 5µM de CsA.

3.2.4 Western blot

Para análise da expressão proteica o protocolo realizado foi o mesmo que descrito anteriormente na sessão 3.1.3.2, como descrito por Brimacombe *et al.*, 2009. Os alvos avaliados por Western blot foram anti-Pgp (clone C219 na diluição de 1:10000), anti-TRAIL (clone C92B9 - Cell Signaling), anti-caspase-3 (Cell Signaling), -8 (clone 1C12 - Cell Signaling) e -9 (Cell Signaling), anti-Na⁺K⁺ATPase subunidade α

(Clone M7-PB- M9 - Sigma), anti-DcR1 (LSBio clone LS-C154605), DcR2 (Cell Signaling clone D13H4).

3.2.4.1 Análise da apoptose via Western blot

As células foram incubadas com TRAIL recombinante humano (R&D 375-TL-010) nas concentrações de 5, 10 e 15 ng/ml por 24h. Em seguida as células foram submetidas a análise da expressão das caspases-3, -8 e -9 por Western blot.

3.2.5 Atividade da Pgp

Para o ensaio clássico da atividade da Pgp, 2×10^5 células/por condição foram incubadas com 1µg/ml do substrato fluorescente calceína AM (caAM - Sigma) na presença ou ausência de 1µg/ml do agente inibidor tariquidar (TXR9576) por 10 min a 37° C. Em seguida foram avaliadas por citometria de fluxo (FACs Calibur – BD).

Referente ao ensaio de inibição da atividade da Pgp para análise da expressão de TRAIL/TNFSF10, as células foram incubadas com tariquidar, verapamil (Sigma) e PSC833 (Tocris) por 24h em condição de cultivo (estufa de CO₂ a 37° C).

3.2.6 Imunodeteção de proteínas por citometria de fluxo

Para detecção da expressão de Pgp (MRK-16, ABNOVA), DR4 (CD261-PE, eBioscience) e DR5 (CD262-PE, eBioscience), 2×10^5 células/por condição foram incubadas por 30 min a 37° C. Referente a marcação com MRK-16 as células foram lavadas com meio de cultura (IMDM – Gibco) contendo 5% de SFB e incubadas com anticorpo secundário (FITC-goat anti-mouse, Jackson Immuno Research Laboratories). Como controles isotípicos foram utilizados mouse IgG2a (R&D) e mouse IgG1 K (eBioscience).

3.2.7 Análise da localização de TRAIL

3.2.7.1 Localização subcelular de TRAIL por microscopia confocal

As células HeLa MDR-Off na presença ou ausência da doxíciclina e KB-C1 shNS e shABCB1 foram processadas para análise da localização subcelular de TRAIL (anti-TRAIL clone C92B9 - Cell Signalling) com anticorpo secundário anti-IgG rabbit (Alexa-488, Invitrogen) como descrito anteriormente (3.1.5) e analisadas no microscópio Zeiss LSM 510 NLO Meta pertencente ao CCR Confocal Microscopy Core Facility, NCI, NIH.

3.2.7.2 ELISA

As células HeLa Tet-Off, HeLa MDR-Off e KB-C1 shRNA foram submetidas ao ensaio de ELISA para mensuração do ligante solúvel TRAIL. O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit DuoSet ELISA Development (R&D System).

4. RESULTADOS

4.1 Parte 1: Estudo da aquisição do fenótipo multifatorial mediado por MPs de membranas em células tumorais

4.1.1 Identificação de MPs de membrana derivadas de células de LMC

De acordo com a literatura, MPs derivadas de membrana celular expõem a fosfatidilserina (PS) na face externa da membrana durante sua formação, o que favorece sua identificação através da marcação deste fosfolípídeo (HUGEL *et al.*, 2005). Além disso, Bebawy e cols. (2009) verificaram que células resistentes de leucemia linfoblástica liberam MPs espontaneamente no microambiente *in vitro*. Desta forma, as MPs das células K562 (linhagem de LMC), e de sua variante resistente a drogas que expressa Pgp-positiva, denominada Lucena, foram isoladas através de ultracentrifugação. Os resultados obtidos revelaram que ambas as linhagens de LMC foram capazes de liberar espontaneamente MPs *in vitro* (Figura 4.1 B e C). Tais MPs, derivadas de K562 e da variante resistente Lucena representaram, respectivamente, 52.22% e 50% da população positiva para marcação de FITC-anexina V. Essa marcação representa a exposição de fosfatidilserina na região externa da membrana das MPs (Figura 4.1 D e E).

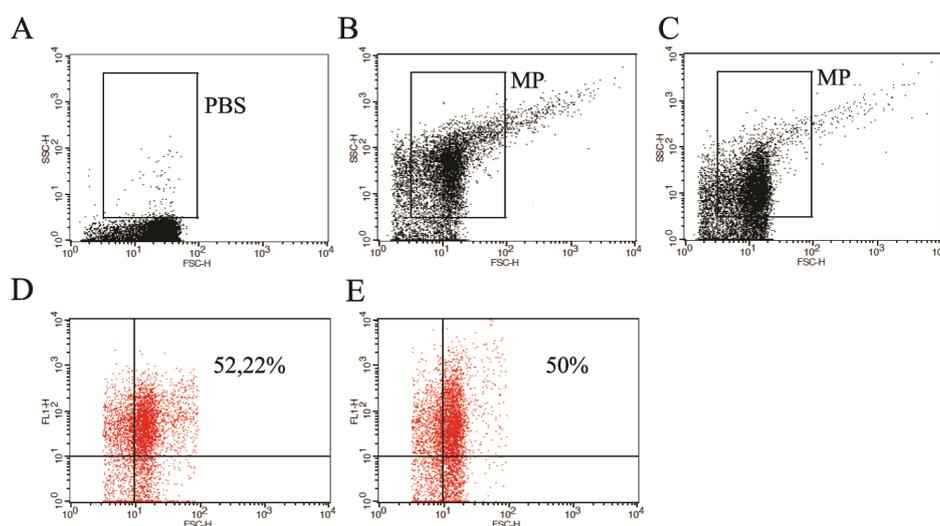


Figura 4.1. Linhagens celulares liberam espontaneamente micropartículas (MPs) *in vitro*. MPs isoladas de células K562 (B) e Lucena (C) foram identificadas por citometria de fluxo através da análise de FCS (*forward light scattering*) vs. SSC (*side light scattering*). O sinal SSC emitido das MPs foi comparado ao sinal emitido pelo PBS estéril (A). 52.22% dos eventos referentes as MPs derivadas das células K562 (D) e 50% dos eventos referentes as MPs derivadas das células Lucena foram positivos para marcação de FITC-anexina V.

4.1.2 Caracterização das MPs derivadas das células de LMC com fenótipo MDR

A fim de avaliar o conteúdo que as MPs derivadas de células resistentes podem carrear, avaliou-se presença de Pgp, proteínas solúveis e RNAs (RNAm e miRNAs) que também estão envolvidos com o fenótipo de resistência. Inicialmente, foi possível confirmar que MPs derivadas de células com fenótipo MDR carregam Pgp na superfície da membrana. Utilizando citometria de fluxo, verificou-se que aproximadamente 22% do total da população selecionada referente às MPs são positivas para marcação de Pgp (Figura 4.2A). Por outro lado, MPs derivadas das células K562 não carregam Pgp em sua superfície (Figura 4.2B).

Posteriormente, utilizando técnicas de Western blot e qRT-PCR, foi possível demonstrar que MPs Pgp-positivas também carregam proteínas antiapoptóticas como survivina e cIAP1, além de uma pequena quantidade de XIAP (Figura 4.2C). Os respectivos RNAm – *BIRC5* e *BIRC2* -, exceto *BIRC4*, estão incluídos no conteúdo da MPs, assim como o RNAm da Pgp, *ABCB1* (Figura 4.2D).

Por fim, as MPs foram submetidas ao ensaio de qRT-PCR para análise de miRNAs. Dados na literatura mostraram que miR-27a, miR-451 e miR-21 estão relacionados a expressão de Pgp e podem contribuir para a resistência à quimioterápicos em células neoplásicas (MEDINA *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2008). Os resultados obtidos nesse trabalho revelaram que MPs derivadas de células resistentes carregam miR-27a, miR-451 e miR-21 como conteúdo (Figura 4.2D).

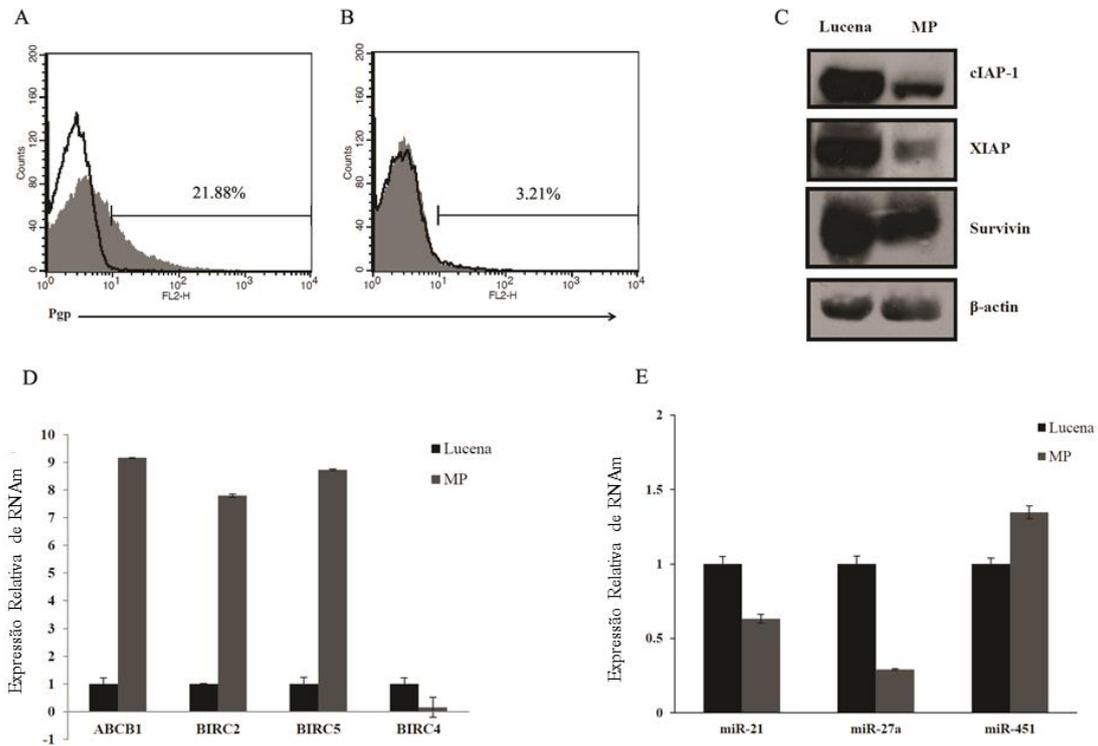


Figura 4.2. Micropartículas (MPs) derivadas de células MDR-positivas carregam moléculas proteicas e de RNAm relacionadas a resistência. A expressão de Pgp foi analisada nas MPs derivadas das células Lucena (Pgp-positiva) (A) e das células K562 (Pgp-negativas) (B) por citometria de fluxo. Histograma preto corresponde ao controle negativo e o histograma cinza corresponde a marcação com anticorpo anti-Pgp conjugado a PE. Os níveis das proteínas cIAP-1, survivina e XIAP foram avaliadas através de Western blot nas células Lucena e nas MPs Pgp-positivas. β -actina foi utilizada como controle endógeno (C). Os níveis de RNAm *ABCB1*, *BIRC2*, e *BIRC4* foram avaliados nas células Lucena e nas MPs Pgp-positivas por qRT-PCR. Os valores obtidos no qRT-PCR foram normalizados pelo valor do RNAm da β -actina (D). Os níveis de miR-21, -451 e -27a foram avaliados nas células Lucena e nas MPs Pgp-positivas. Os valores obtidos foram normalizados pelo RNUB6 (E).

4.1.3 Células neoplásicas sensíveis a quimioterápicos adquirem um perfil de resistência através da transferência intercelular de proteínas e RNAs associados à MDR

A fim de verificar o efeito das MPs derivadas de células resistentes na aquisição do perfil MDR em linhagens celulares que não expressam Pgp, células receptoras sensíveis a fármacos (A549 e MCF7) foram submetidas ao co-cultivo com células Pgp-positivas (Lucena). Os procedimentos relacionados ao co-cultivo foram realizados utilizando insertos Transwell® para evitar contaminação e contato entre as células de diferentes origens (ver material e métodos). Os dados obtidos mostraram que ambas as

linhagens A549 e MCF7 adquiriram expressão proteica e de RNAm de Pgp. Além disso, por microscopia de fluorescência foi possível observar *clusters* de Pgp nas células receptoras (Figura 4.3).

O próximo passo do estudo foi avaliar a expressão das proteínas survivina, cIAP-1 e XIAP nas células receptoras, após o co-cultivo com as células Pgp-positivas. Referente a linhagem A549, após o co-cultivo observou-se claramente um aumento na quantidade proteica das três IAPs analisadas tanto no nível proteico como no nível de RNAm. No entanto, após o co-cultivo as células MCF7 apresentaram apenas um aumento discreto referente a expressão da XIAP e nenhuma alteração nos níveis de RNAm de *BIRC2* (Figura 4.4). Os resultados referentes as alterações de RNAm foram confirmados mediante o co-cultivo direto das células receptoras com as MPs derivadas das células Pgp-positivas (Figura 4.5). Além disso, as linhagens A549 e MCF7 foram cultivadas com meio condicionado proveniente das células Pgp-positivas e não foram observadas alterações na expressão proteica das IAPs e da Pgp (Figura 4.6). Esses resultados indicam que a transferência de proteínas e RNAm via MPs ocorre de maneira independente do tipo celular.

Em seguida, com o objetivo de avaliar se a aquisição da expressão da Pgp e o aumento na quantidade proteica da survivina, cIAP-1 e XIAP poderiam induzir o fenótipo MDR, as células receptoras foram submetidas aos ensaios de atividade de efluxo da Pgp e de apoptose induzida por quimioterápicos. A Figura 4.7A mostra que as células A549 e MCF7, após co-cultivo com células Pgp-positivas, adquiriram a expressão de uma Pgp funcional com discreta atividade de efluxo (MFI=1,3 e 1,4, respectivamente). Em relação a apoptose, as células A549 e MCF7 foram tratadas respectivamente, com cisplatina e paclitaxel por 24 h, antes e após co-cultivo com células Pgp-positivas. Os resultados obtidos mostraram que houve uma redução de aproximadamente 33% na taxa de apoptose induzida nas células A549 (Figura 4.7B); enquanto as células MCF7 mostraram redução de aproximadamente 15% (Figura 4.7C). Esses dados indicam que as MPs derivadas de células resistentes são capazes de induzir o fenótipo MDR em linhagens tumorais sensíveis a fármacos.

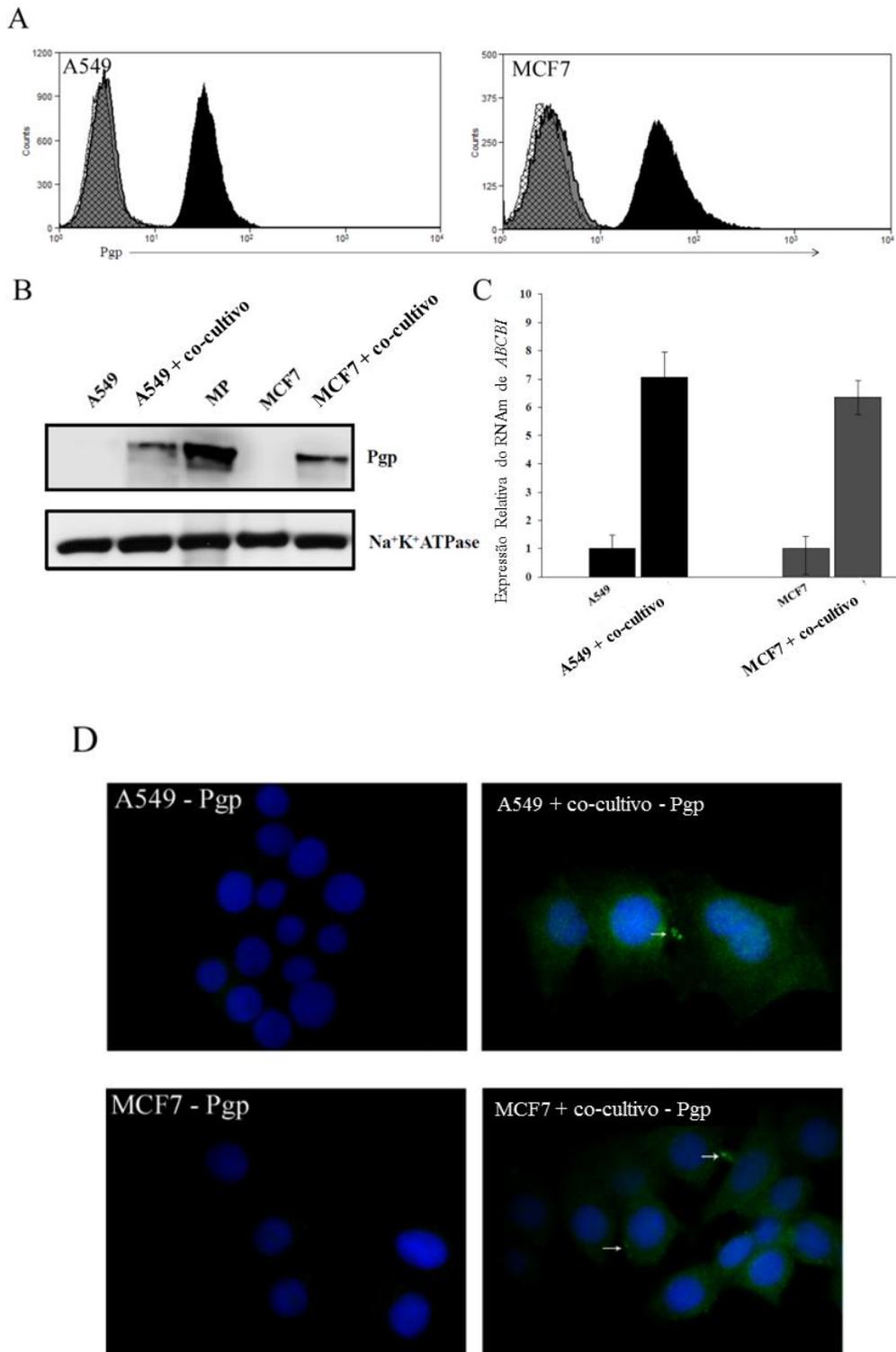


Figura 4.3. Células A549 e MCF7 adquirem expressão da glicoproteína P (Pgp) após co-cultivo com células Pgp-positivas. A expressão de Pgp foi analisada por citometria de fluxo – histograma hachurado representa o controle negativo, histograma cinza representa células antes do co-cultivo e histograma preto representa células após co-cultivo (A); Western blot - Na⁺K⁺ATPase foi utilizado como controle endógeno (B); qRT-PCR – os níveis de RNAm de *ABCB1* foram normalizados pela expressão do RNAm de β -actina (C); e microscopia de fluorescência – DAPI foi utilizado para marcação nuclear (azul) e anticorpo monoclonal UIC2 para marcação anti-Pgp (verde). Setas indicam *clusters* de Pgp. As imagens foram capturadas com aumento de 100X.

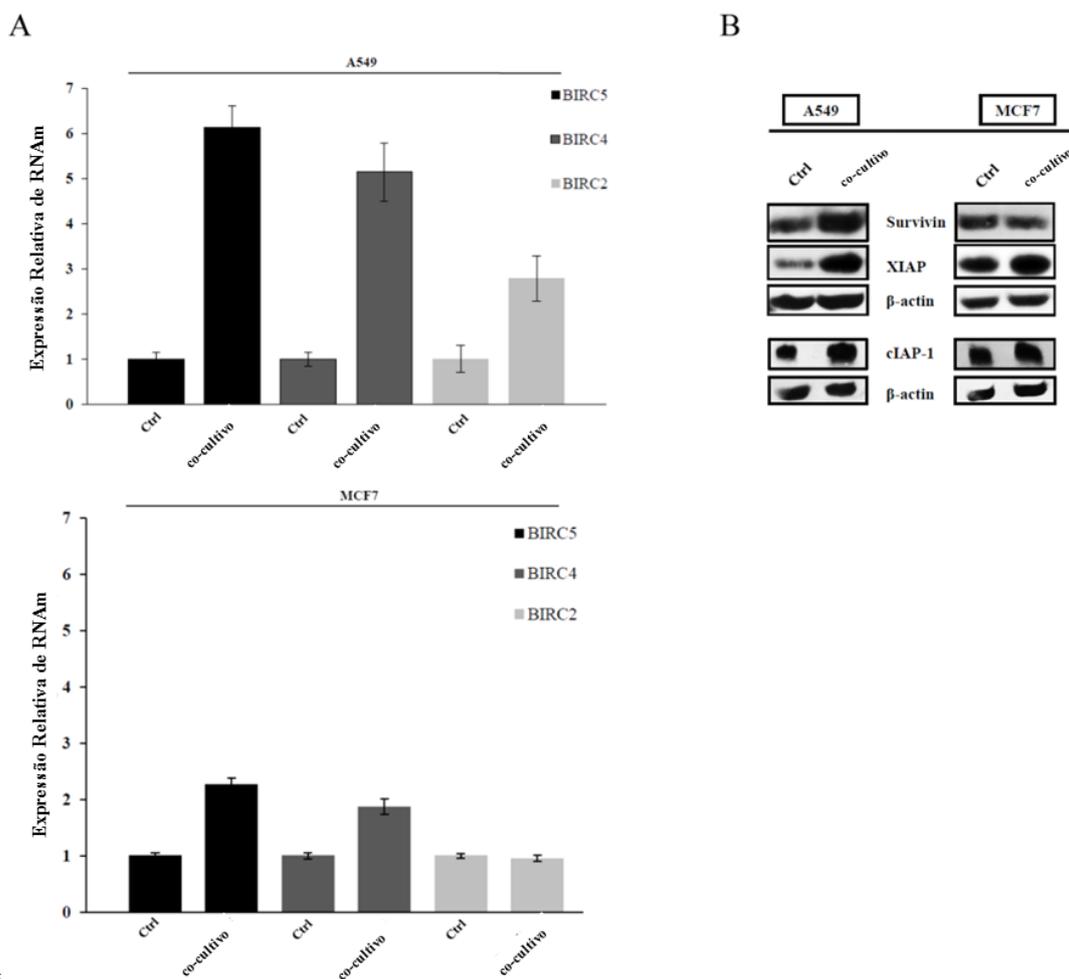


Figura 4.4. A expressão de genes e proteínas da família de inibidores da apoptose (IAPs) foram aumentados em células Pgp-negativas após co-cultivo com células Pgp-positivas. Expressão dos genes e das proteínas survivina (*BIRC5*), XIAP (*BIRC4*) e cIAP-1 (*BIRC2*) nas células A549 (A – painel superior; B – painel esquerdo) e MCF7 (A – painel superior; B – painel direito) após co-cultivo com células Pgp-positivas. qRT-PCR foi utilizado para análise de RNAm com os valores obtidos normalizados pelo RNAm da β -actina. A proteína β -actina foi utilizada como controle endógeno para Western blot.

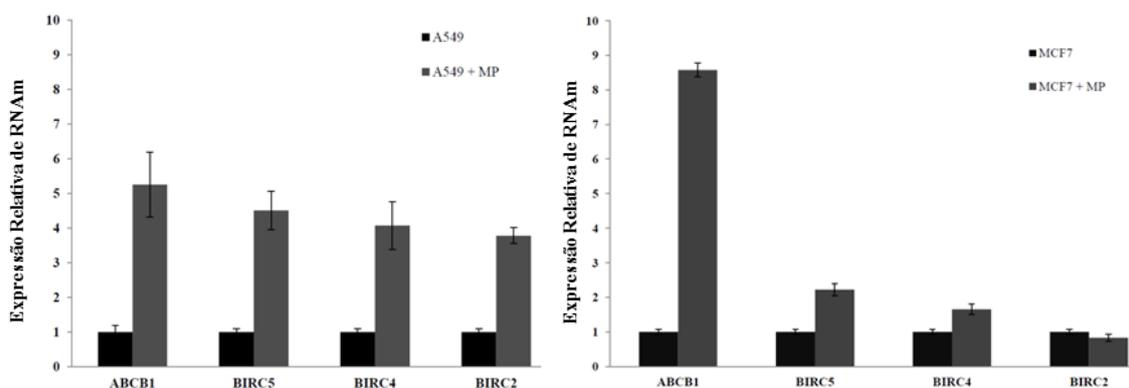


Figura 4.5. Micropartículas (MPs) isoladas de células Pgp-positivas transferem RNAm relacionados a resistência para células Pgp-negativas. Expressão de RNAm de *ABCB1*, *BIRC5*, *BIRC4* e *BIRC2* nas células A549 (painel esquerdo) e MCF7 (painel direito) após cocultivo com MPs isoladas de células Pgp-positivas. Os valores obtidos pelo qRT-PCR foram normalizados pelo RNAm da β -actina.

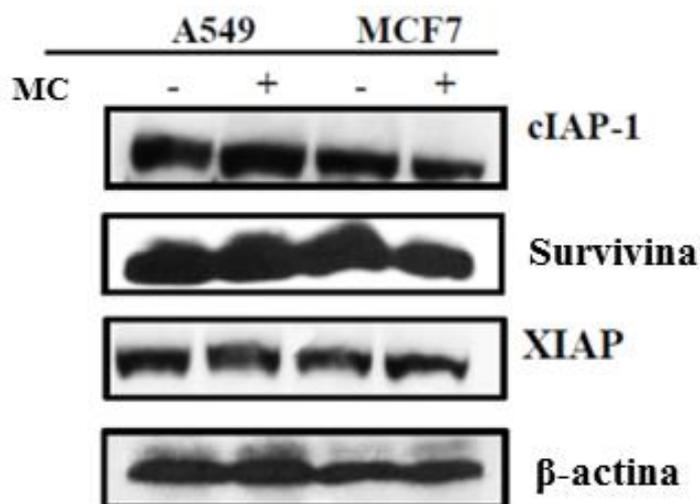


Figura 4.6. Cultivo das células Pgp-negativas com meio condicionado (MC) proveniente de células Pgp-positivas não altera a expressão das proteínas inibidoras da apoptose. Expressão das proteínas cIAP-1, survivina e XIAP nas células A549 e MCF7 mediante cultivo com meio condicionado proveniente de células Pgp-positivas. A proteína β -actina foi utilizada como controle endógeno para Western blot.

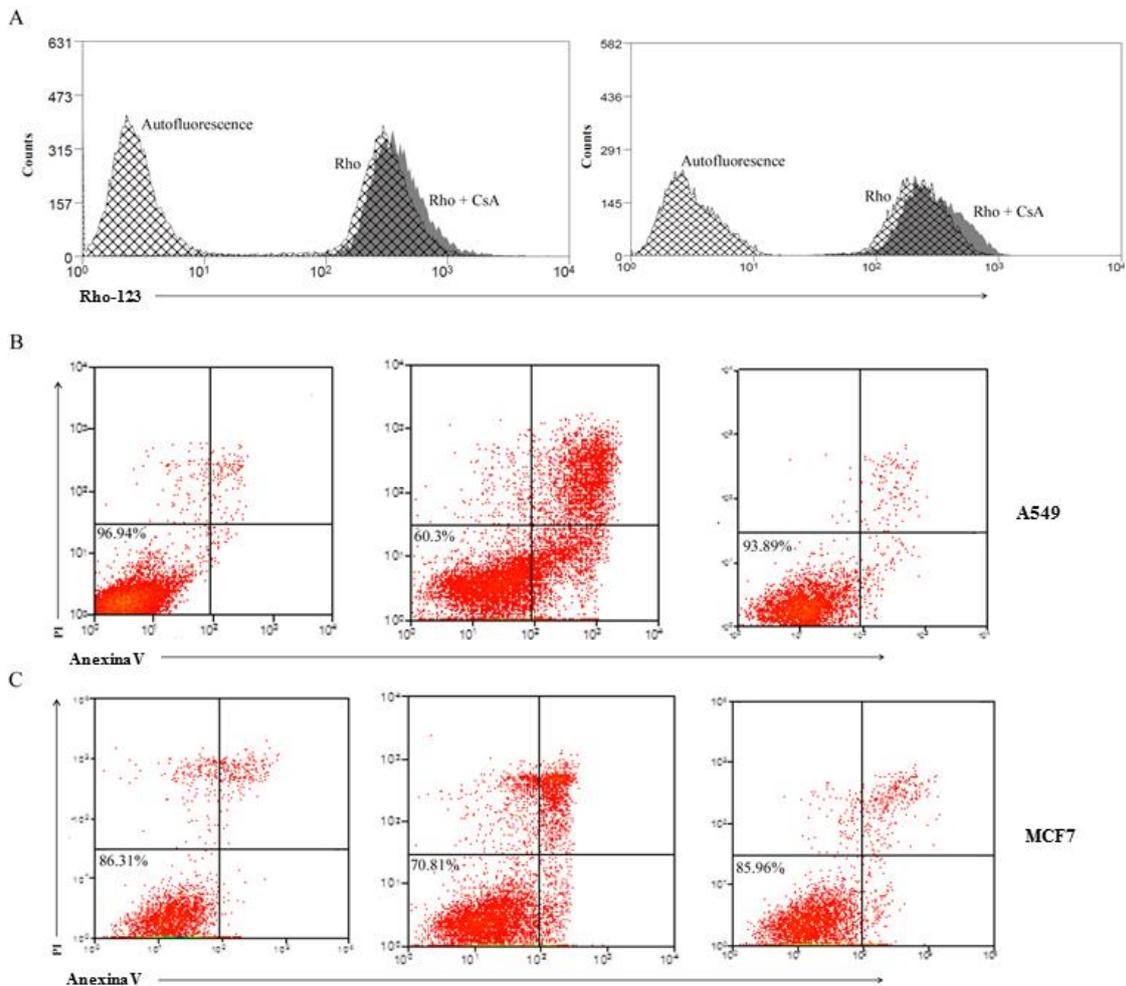


Figura 4.7. Células Pgp-negativas adquirem fenótipo de resistência após co-cultivo com células Pgp-positivas. A atividade de Pgp em células A549 (A – painel esquerdo; MFI=1,3) e MCF7 (A – painel direito; MFI=1,4) foi analisada por citometria de fluxo após incubação com o fluorocromo rodamina 123 (Rho-123) com ou sem ciclosporina A (CsA). Histograma cinza representa positividade na atividade de Pgp e histograma hachurado representa células com Rho (direita) ou células apenas (esquerda). Células A549 (B) e MCF7 (C) foram tratadas com cisplatina e paclitaxel, respectivamente, por 24h e a taxa de apoptose induzida foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação de FITC-anexina V e iodeto de propídeo (PI). Cisplatina induziu 40% de morte nas células A549 (painel do meio) e apenas aproximadamente 6% de morte celular nas células após co-cultivo com células Pgp-positivas (painel da direita). Células não tratadas estão representadas no painel esquerdo (B). Paclitaxel induziu aproximadamente 30% de morte nas células MCF7 (painel do meio) e apenas aproximadamente 14% de morte celular nas células após co-cultivo com células Pgp-positivas (painel da direita). Células não tratadas estão representadas no painel esquerdo (C).

4.1.4 Proteínas relacionadas a vias oncogênicas contribuem para um fenótipo de resistência multifatorial em células tumorais sensíveis após a transferência de proteínas e RNAs envolvidos com a MDR

A ativação constitutiva da via de NF κ B tem sido observada em vários tumores sólidos e neoplasias hematológicas e está relacionada a oncogênese, uma vez que essa via controla vários mecanismos incluindo a regulação de genes antiapoptóticos e de resistência (BRAUN *et al.*, 2006). Como indicado nas Figura 4.2, o RNAm de *BIRC4* não foi identificado como conteúdo das MPs derivadas de células Pgp-positivas. No entanto, os resultados obtidos mostraram um aumento nos níveis de RNAm de *BIRC4* em ambas as células receptoras, co-cultivadas com as células Pgp-positivas ou com as MPs derivadas das mesmas (Figuras 4.4 e 4.5). Diante desse contexto, a via de NF κ B foi avaliada através de sua localização subcelular e da regulação de seu inibidor endógeno I κ B α . Os níveis de expressão de I κ B α foram reduzidos nas células A549 e MCF7 mediante co-cultivo com MPs derivadas de células Pgp-positivas (Figura 4.8A). Concomitantemente, foi observada uma redistribuição subcelular de NF κ B, com predominante localização nuclear após o co-cultivo (Figura 4.8B). Esses resultados sugerem fortemente o envolvimento funcional da via de NF κ B na regulação intrínseca de *BIRC4*. Além disso, a localização nuclear de NF κ B pode contribuir para regulação endógena das outras IAPs e da Pgp (Figura 4.8C).

A via de Yb-1 também foi avaliada através dos níveis de expressão proteica e localização subcelular. Dados da literatura demonstram que Yb-1 é uma proteína multifuncional que também está envolvida na regulação transcricional e na resistência a quimioterápicos (KUWANO *et al.*, 2003; KUWANO *et al.*, 2004). De acordo com os dados obtidos, não foram observadas alterações nos níveis de expressão de Yb-1 nas células receptoras após co-cultivo com MPs derivadas de células Pgp-positivas (Figura4.8A). No entanto, Yb-1 apresentou-se diferencialmente distribuído nas células receptoras após co-cultivo. Nas células A549 foi possível observar uma localização perinuclear de Yb-1 sem que houvesse alterações nas frações citoplasmática e nuclear, enquanto nas células MCF7 foram observados focos nucleares de Yb-1 e um aumento na fração nuclear (Figura4.8B e C). Esses resultados sugerem que os focos nucleares de Yb-1 podem contribuir para a transcrição endógena de Pgp nas células MCF7.

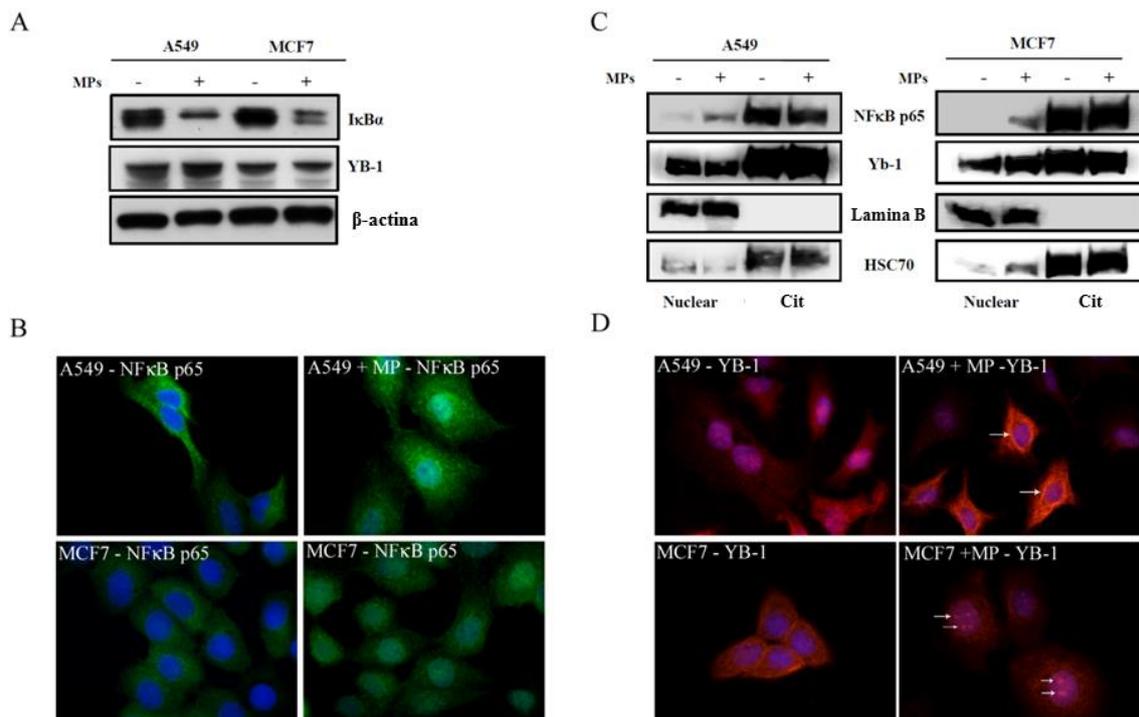


Figura 4.7. O perfil de expressão das vias de NFκB e Yb-1 foram alterados nas células Pgp-negativas após co-cultivo com MPs isoladas. A via de NFκB foi analisada nas células A549 e MCF7 através da degradação de IκBα (A), localização subcelular de NFκB por microscopia de fluorescência (B) e fracionamento celular (C). A via de Yb-1 foi analisada em ambas as linhagens celulares através da expressão da proteína total (A), fracionamento celular (B) e localização subcelular por microscopia de fluorescência (D). A proteína β-actina foi utilizada como controle endógeno para a análise das proteínas totais por Western blot, lamina B e HSC70 foram utilizados como controle endógeno e de pureza das frações nuclear e citoplasmática (cit), respectivamente. DAPI foi utilizado para marcação nuclear (azul), anticorpo policlonal anti-NFκB/p65 (verde) e anticorpo policlonal anti-Yb-1 (vermelho). Aumento de 100x.

4.1.4 MPs derivadas de células com perfil MDR transferem miRNAs oncogênicos e de resistência à células tumorais sensíveis

Os resultados obtidos anteriormente demonstraram que as MPs derivadas de células Pgp-positivas carregam miR-27a, -451, e -21 (Figura 4.2). Por essa razão, esses miRNAs foram avaliados nas células receptoras após co-cultivo com MPs derivadas de células resistentes. Os resultados obtidos mostraram um aumento nos miR-27a e miR-451 nas células A549 e MCF7 mediante co-cultivo. Além disso, o miRNA-21, que apresenta características oncogênicas mostrou-se aumentado nas células MCF7 após o co-cultivo com MPs derivadas de células resistentes (Figura 4.8). Esses resultados sugerem que miR-27a e miR-451 podem contribuir na regulação intrínseca do RNAm

de *ABCBI* em ambas as linhagens receptoras, e que o miR-21 pode contribuir para um potencial mais maligno das células MCF7.

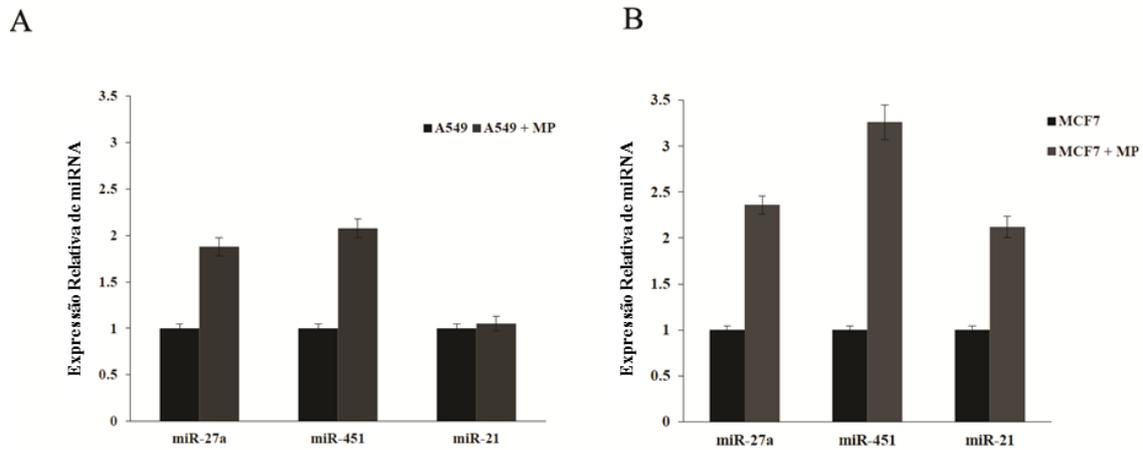


Figura 4.8. Células Pgp-negativas apresentaram aumento na expressão de miR-27a, -451 e -21 foram após co-cultivo com micropartículas (MPs) Pgp-positivas. Células A549 (painel esquerdo) e células MCF7 (painel direito) foram submetidas a análise da expressão dos miR-27a, -451 and -21 mediante co-cultivo com MPs isoladas de células Pgp-positivas. Os valores obtidos foram normalizados pelo RNUB6.

4.2 Parte 2: Estudo da relação da expressão da Pgp com genes e proteínas que participam das vias que regulam a apoptose

4.2.1 Doxíciclina induz menos alterações no perfil de expressão dos genes ligados à MDR do que a tetraciclina em células HeLa com sistema Tet-Off.

As células HeLa MDR-Off foram previamente desenvolvidas por Alemán e cols. (2003) utilizando o sistema Tet-off. Essas células apresentam a regulação da expressão do gene da Pgp através da tetraciclina; na presença da tetraciclina ocorre a repressão do gene (ver Materiais e Métodos). No entanto, essa linhagem é também responsiva a doxíciclina, e a fim de verificar o melhor fármaco e concentração para regulação da expressão da Pgp, as células HeLa MDR-Off foram tratadas com 0.002, 0.02, 0.2 and 2 µg/ml de tetraciclina e 0.0001, 0.001, 0.01 and 0.1 µg/ml de doxíciclina. Os níveis de expressão proteico e de expressão do RNAm da Pgp/ABCB1 foram avaliados por Western blot, citometria de fluxo e qRT-PCR. Os dados obtidos mostram que a tetraciclina foi capaz de reprimir a expressão de Pgp; no entanto, a doxíciclina induziu o mesmo efeito em menores concentrações (Figura 4.9). Assim, o próximo passo foi avaliar as condições para otimização do efeito da doxíciclina na expressão da Pgp. As concentrações de 0.001, 0.005 e 0.01 µg/ml de doxíciclina foram testadas nas células HeLa MDR-Off por dois, três e quatro dias para verificar a melhor concentração e tempo para o silenciamento da Pgp. Em seguida, para avaliar o tempo no qual os níveis de expressão da Pgp eram restabelecidos, a doxíciclina foi retirada do meio de cultura e as células HeLa MDR-Off foram analisadas quanto a expressão da Pgp um, dois, três e quatro dias após a retirada da doxíciclina (Figura 4.10). Os resultados obtidos demonstraram que a expressão de Pgp é reprimida a partir de 0.005 µg/ml de doxíciclina após 3 dias de incubação. No entanto, embora os níveis de expressão de Pgp tenham sido restabelecidos, sua função não foi completamente restaurada. Por essa razão para os próximos experimentos apenas foram utilizadas células HeLa MDR-Off expressando Pgp e na presença de 0.005 µg/ml de doxíciclina por três dias, o que representa a Pgp silenciada (Figura 4.11).

Posteriormente, as células HeLa Tet-Off (controle das células HeLa MDR-Off) foram incubadas com 2 µg/ml de tetraciclina e com 0.005 µg/ml doxíciclina para comparação quanto ao efeito na expressão gênica utilizando uma plataforma customizada de TLDA (*TaqMan Low Density Array*), a qual apresenta 380 genes

relacionados a MDR (GILLET *et al.*, 2011). De acordo com os dados obtidos com esse *array*, dezessete genes foram alterados pela tetraciclina enquanto apenas nove foram alterados pela doxiciclina (Tabela 4.1). Em conjunto esses dados indicam que a doxiciclina controla a expressão de Pgp e nas células HeLa MDR-Off induzindo menos alterações gênicas que a tetraciclina.

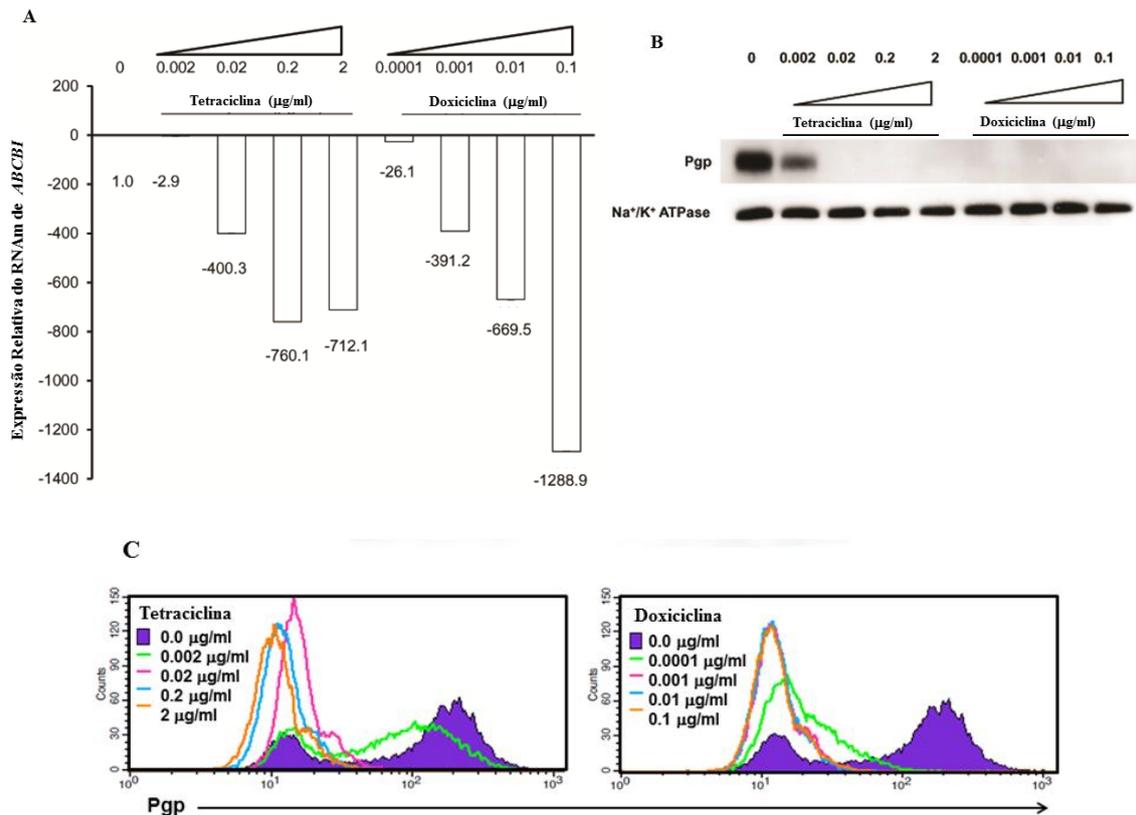


Figura 4.9. Análise da expressão da glicoproteína P (Pgp) através do modelo HeLa MDR-Off. As células HeLa MDR-Off foram incubadas com tetraciclina ou doxiciclina por quatro dias e submetidas a análise da expressão do RNAm da Pgp/ABCB1 (A) e da expressão proteica por Western blot (B) e por citometria de fluxo (C). Os níveis de RNAm foram normalizados pelo valor do RNAm de *GAPDH* e *Na⁺K⁺ATPase* foi utilizado como controle endógeno na técnica de Western blot.

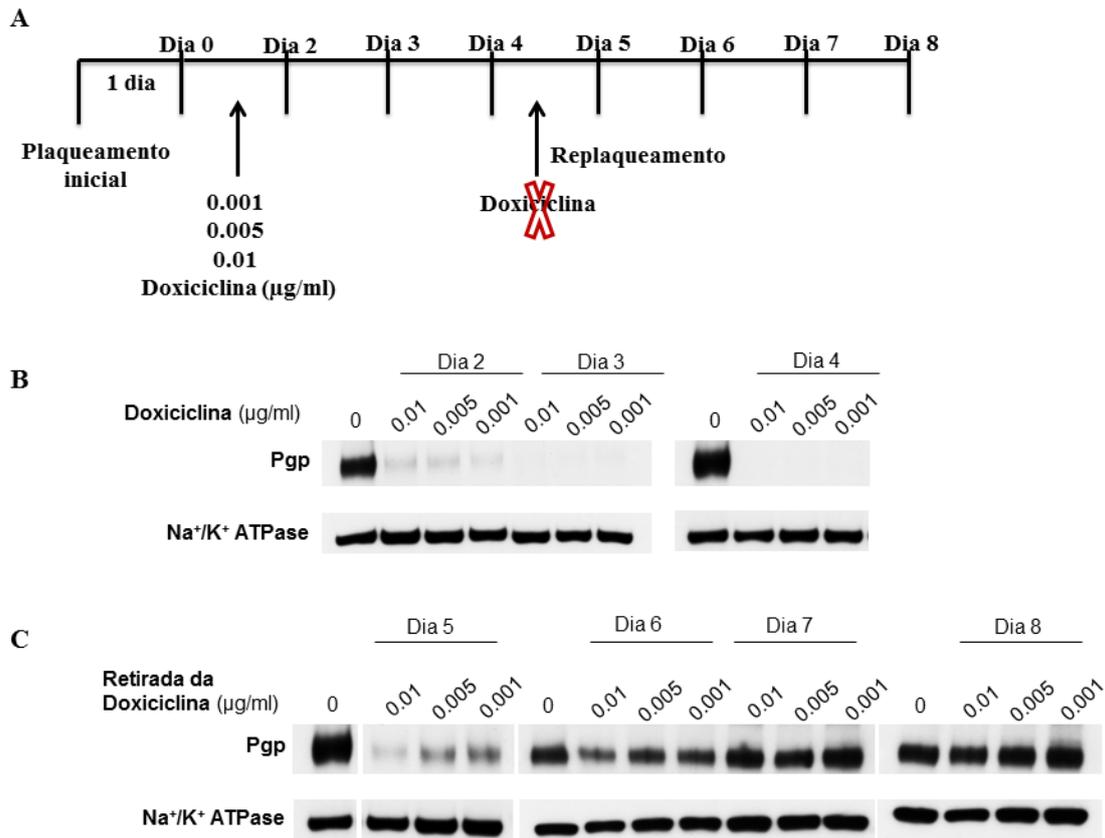


Figura 4.10: Efeito da doxiciclina (Dox) na expressão de glicoproteína P (Pgp) em células HeLa MDR-Off. Esquema representativo da cultura das células HeLa MDR-Off na presença e ausência de Dox (A). Efeito de diferentes concentrações de Dox na expressão proteica da Pgp, sendo o silenciamento na presença de Dox (B) e a restauração dos níveis de expressão após a retirada de Dox (C). Na⁺/K⁺ATPase foi utilizado como controle endógeno na técnica de Western blot.

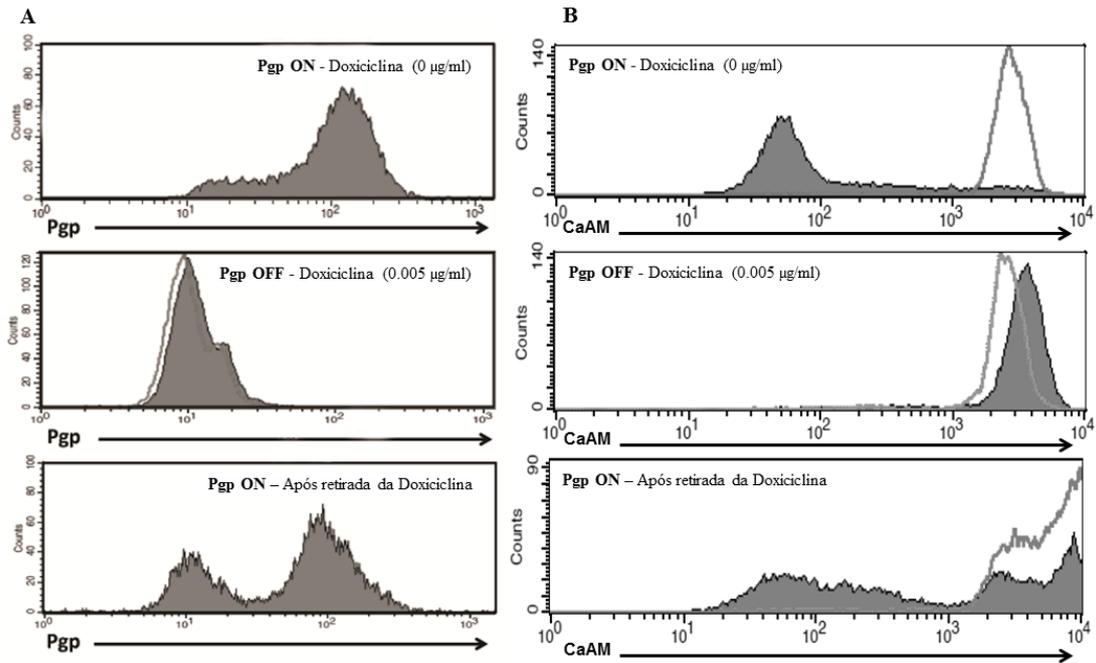


Figura 4.11: Efeito de 0.005µg/ml de doxiciclina (Dox) na expressão e função da glicoproteína P (Pgp) em células HeLa MDR-Off. As células HeLa MDR-Off foram incubadas por três dias com 0.005µg/ml de Dox e avaliadas quanto a expressão (A) e atividade (B) da Pgp por citometria de fluxo. Painel superior representam células sem Dox; painel do meio representam células após 3 dias de incubação com 0.005µg/ml de Dox; e painel inferior representa células após 3 dias da retirada de Dox. Para o ensaio funcional foram utilizados tariquidar como agente modulador e calceína AM como substrato fluorescente da Pgp.

Tabela 4.1. Efeito comparativo da tetraciclina e doxíciclina em 380 genes relacionados a MDR em células HeLa TET-Off.

Genes	Tetraciclina (expressão relativa - vezes)	Genes	Doxiciclina (expressão relativa - vezes)
ABCB7	-15.52	ABCA13	-2.09
ABCE1	2.02	ABCD2	-3.54
APOE	-2.02	GPX2	-2.13
CCND1	2.01	PDGFRB	97.47
CDKN1A	-2.20	POLI	12.24
CLDN1	3.05	PTEN	-4.41
CLDN7	-2.55	SIRT4	-4.52
FOS	-2.77	SLC2A5	2.34
IL6	-9.17	TNFSF10	2.87
MT2A	-3.78	-	-
NRAS	-4.77	-	-
PDGFRB	482.0	-	-
POLI	14.18	-	-
SIRT4	-2.25	-	-
SLC2A5	7.50	-	-
TNF	-4.52	-	-
TNFSF10	-3.81	-	-

O valor de +2.00 e -2.00 foram utilizados como ponto de corte para análise da expressão gênica.

4.2.2 Análise da expressão de genes relacionados a apoptose em células Pgp-positiva revela correlação inversa entre as expressões de Pgp e TRAIL

A fim de verificar a relevância da expressão de Pgp com a expressão de genes relacionados a apoptose, as células HeLa MDR-Off sem doxíciclina (Pgp^{ON}) e com doxíciclina (Pgp^{OFF}) foram utilizadas para análise de 96 genes utilizando *PCR array*. Como controle foram utilizadas células HeLa Tet-Off do efeito da doxíciclina. Os dados obtidos mostraram que onze genes apoptóticos foram correlacionados a expressão de Pgp, porém oito desses onze também foram alterados nas células HeLa Tet-Off na presença de doxíciclina (Tabela 4.2). Dessa maneira, para identificar um gene apoptótico que realmente estivesse correlacionado a expressão de Pgp, as células KB-8-5, KB-8-5-11 e KB-C1 (Pgp-positivas) foram comparadas à linhagem parental KB-3-1 (Pgp-negativa). Os resultados obtidos mostraram que 34 genes se correlacionaram a expressão de Pgp, porém apenas 12 foram alterados nas três linhagens (Tabela 4.3). Ao comparar as tabelas 4.2 e 4.3 foi possível identificar o gene TNFSF10 (TRAIL) como correlacionado a expressão de Pgp em todas as linhagens analisadas. As análises da expressão e da função dessas linhagens são demonstradas na Figura 4.12.

Tabela 4.2. Análise da expressão de 96 genes relacionados a apoptose mediante expressão da glicoproteína P em células HeLa MDR-Off.

Genes	Expressão relativa – HeLa Tet-Off (referência) x HeLa Tet-Off + Doxíciclina
BCL2A1	-3.30 ± 3.07
BIRC1	-9.24 ± 3.46
BIRC8	-4.90 ± 3.10
CASP6	-3.14 ± 1.73
CASP9	2.91 ± 1.25
DAPK1	3.68 ± 4.04
LTA	4.34 ± 3.73
LTB	6.34 ± 1.21
TNF	3.64 ± 4.89
TNFRSF1B	6.39 ± 0.96
TNFSF10	2.61 ± 2.92

Genes	Expressão relativa – HeLa MDR-Off (referência) x HeLa MDR-Off + Doxíciclina
BCL2A1	-12.49 ± 2.88
BIRC1	16.60 ± 3.49
CASP1	2.00 ± 0.94
CASP10	2.18 ± 0.66
CASP5	11.26 ± 5.44
CASP9	3.31 ± 2.13
DAPK1	-15.12 ± 1.61
LTA	5.29 ± 3.90
TNF	-2.31 ± 1.49
TNFRSF1B	4.30 ± 0.71
TNFSF10	16.6 ± 1.92

O valor de +2.00 e -2.00 foram utilizados como ponto de corte para análise da expressão gênica.

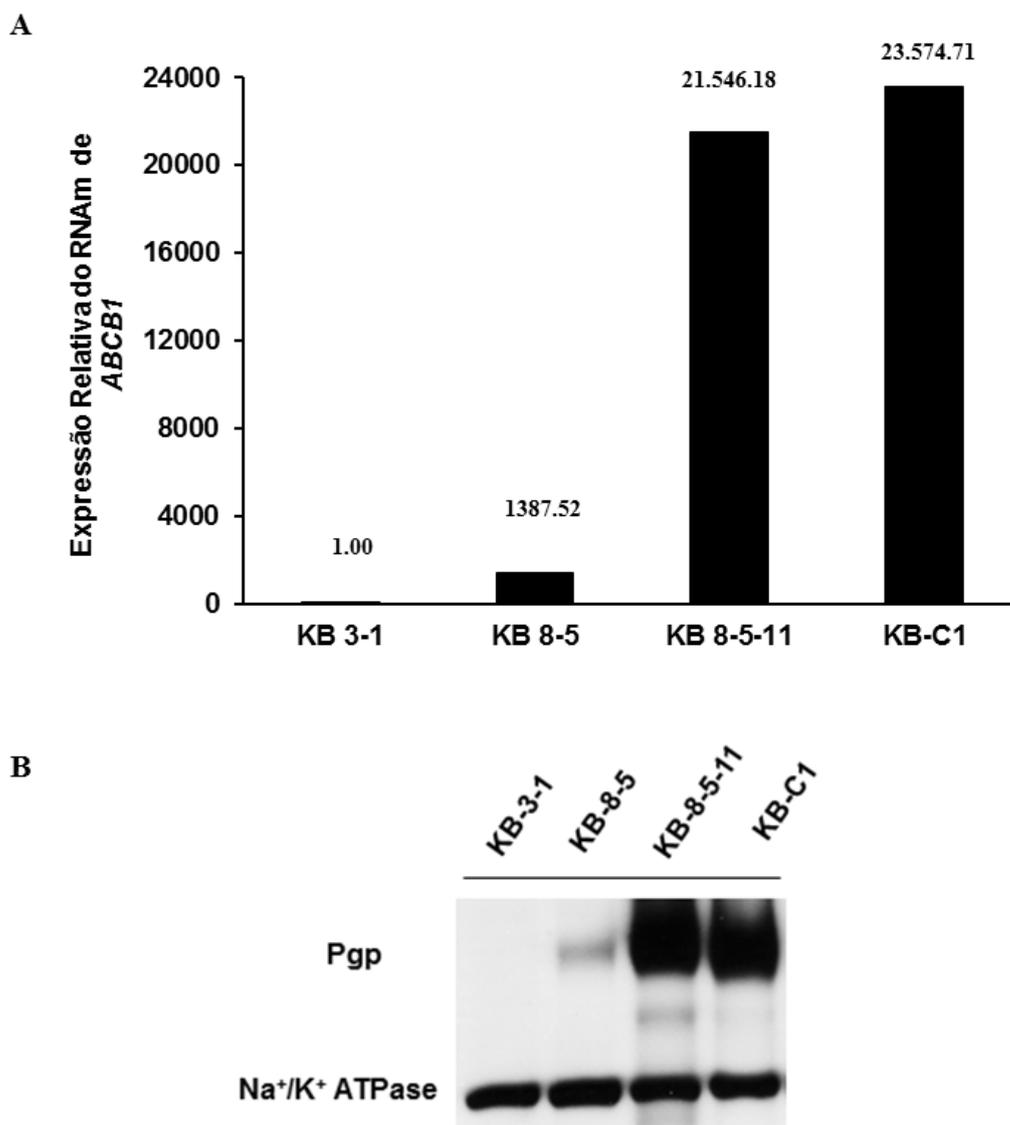


Figura 4.12. Análise da expressão da glicoproteína P (Pgp) em células KBs resistentes e na linhagem parental KB-3-1. As células KB-3-1; KB-8-5, KB-8-5-11 e KB-C1 foram submetidas a análise da expressão do RNAm da Pgp/ABCB1 (A) e da expressão proteica por Western blot (B). Os níveis de RNAm foram normalizados pelo valor do RNAm de *GAPDH* e Na⁺K⁺ATPase foi utilizado como controle endógeno na técnica de Western blot.

Tabela 4.3. Análise da expressão de 96 genes relacionados a apoptose mediante expressão da glicoproteína P em células KBs resistentes.

Gene	KB-8-5	KB-8-5-11	KB-C1
APAF1	-2.45	-2.06	S/A
BAD	S/A	-2.13	-2.25
BCL2A1	S/A	2.63	37.56
BCL2L1	2.56	2.76	2.91
BCL2L14	S/A	-35.74	S/A
BIK	-3.53	S/A	S/A
BIRC3	S/A	S/A	2.35
BIRC7	S/A	-2.23	-5.95
BIRC8	S/A	S/A	-18.00
BNIP3	-6.79	-3.53	-5.71
BNIP3L	-3.34	S/A	-2.20
CARD6	-5.29	-4.59	-2.39
CARD9	S/A	-2.10	S/A
CASP1	-2.23	-2.14	S/A
CASP10	2.01	S/A	2.10
CASP14	-22.31	-2.94	-2.84
CASP6	S/A	-2.36	S/A
CASP9	S/A	-7.22	-3.83
CFLAR	S/A	S/A	2.56
ESRRBL1	-3.82	-3.80	-3.16
FADD	2.37	2.10	2.62
FAZ	S/A	S/A	-3.11
HRK	17.29	22.17	28.27
IKBKE	3.15	2.29	5.44
IKBKG	2.29	S/A	S/A
LRDD	-2.54	-3.02	-2.59
LTA	S/A	45.49	S/A
LTB	-32.01	2.54	S/A
NFKB2	2.11	S/A	3.17
RELB	2.42	2.17	2.74
TNF	-4.33	S/A	S/A
TNFRSF25	4.82	8.59	8.89
TNFSF10	3.30	2.97	2.02
TRADD	S/A	-2.51	-2.32

O valor de +2.00 e -2.00 foram utilizados como ponto de corte para análise da expressão gênica. A linhagem KB-3-1 que não expressa a Pgp foi utilizada como linhagem referência para análise da expressão relativa. S/A representam os genes que não sofreram alterações. Os genes alterados nas três linhagens avaliadas estão destacados em negrito.

4.2.3 A expressão endógena de TRAIL é dependente da expressão e função da Pgp

O próximo passo do estudo foi confirmar que a Pgp estava envolvida com a expressão de TRAIL e para isso ambos os genes foram validados por qRT-PCR utilizando sondas específicas (Figura 4.13A e B). Os níveis proteicos também foram analisados e revelaram que HeLa MDR-Off/Pgp^{OFF} apresentam níveis elevados de TRAIL (Figura 4.13C e D). O aumento da expressão de TRAIL mostrou-se tempo-dependente a diminuição da expressão de Pgp nas células HeLa MDR-Off/Pgp^{ON} (Figura 4.13E). Além disso, foi possível observar que as células HeLa MDR-Off/Pgp^{ON} submetidas a superexpressão transiente de TRAIL apresentaram redução nos níveis de expressão de Pgp, demonstrando que a correlação entre Pgp e TRAIL é bidirecional (Figura 4.13F).

Utilizando shRNA a expressão de Pgp foi silenciada nas células KB-8-5-11 e KB-C1 para confirmar a correlação entre as expressões de Pgp e TRAIL em células resistentes mantidas com quimioterápico. Os resultados obtidos mostraram que ambas as linhagens KB-8-5-11/shABCB1 e KB-C1/shABCB1 apresentaram aumento na expressão de TRAIL comparadas as respectivas células controle (KB-8-5-11 shNS e KB-C1 shNS) (Figura 4.14A). Além disso, quando as células KB-8-5-11 e KB-C1 foram submetidas à transfecção transiente com o vetor de TRAIL para superexpressão do mesmo, foi possível observar aumento nos níveis de expressão da Pgp (Figura 4.14B). Esses dados confirmam a correlação das expressões de Pgp e TRAIL em diferentes linhagens celulares.

A fim de explorar a correlação de Pgp e TRAIL, o próximo passo foi avaliar se a função de efluxo da Pgp também estaria associada a expressão de TRAIL. Inicialmente, a atividade de Pgp foi bloqueada com os inibidores verapamil, tariquidar e PSC833, sendo em seguida submetidas a análise da expressão de TRAIL por qRT-PCR. Como demonstrado na Figura 4.15A, as células MDR-Off/Pgp^{ON} com a atividade da Pgp bloqueada pelos inibidores químicos, exceto o verapamil, apresentaram aumento na expressão de TRAIL. Esses dados sugerem que a expressão endógena de TRAIL é também dependente da função de Pgp. Para confirmar essa hipótese, células HeLa foram infectadas com vetores virais expressando Pgp selvagem e com Pgp apresentando mutação (E556Q/E1206Q) que impede sua atividade de efluxo. Os resultados obtidos mostraram que as células que expressam Pgp mutada obtiveram maior expressão de

TRAIL em relação às células expressando Pgp selvagem (Figura 4.15B e C). Assim, nossos dados demonstram que a atividade de Pgp é essencial para a baixa expressão de TRAIL.

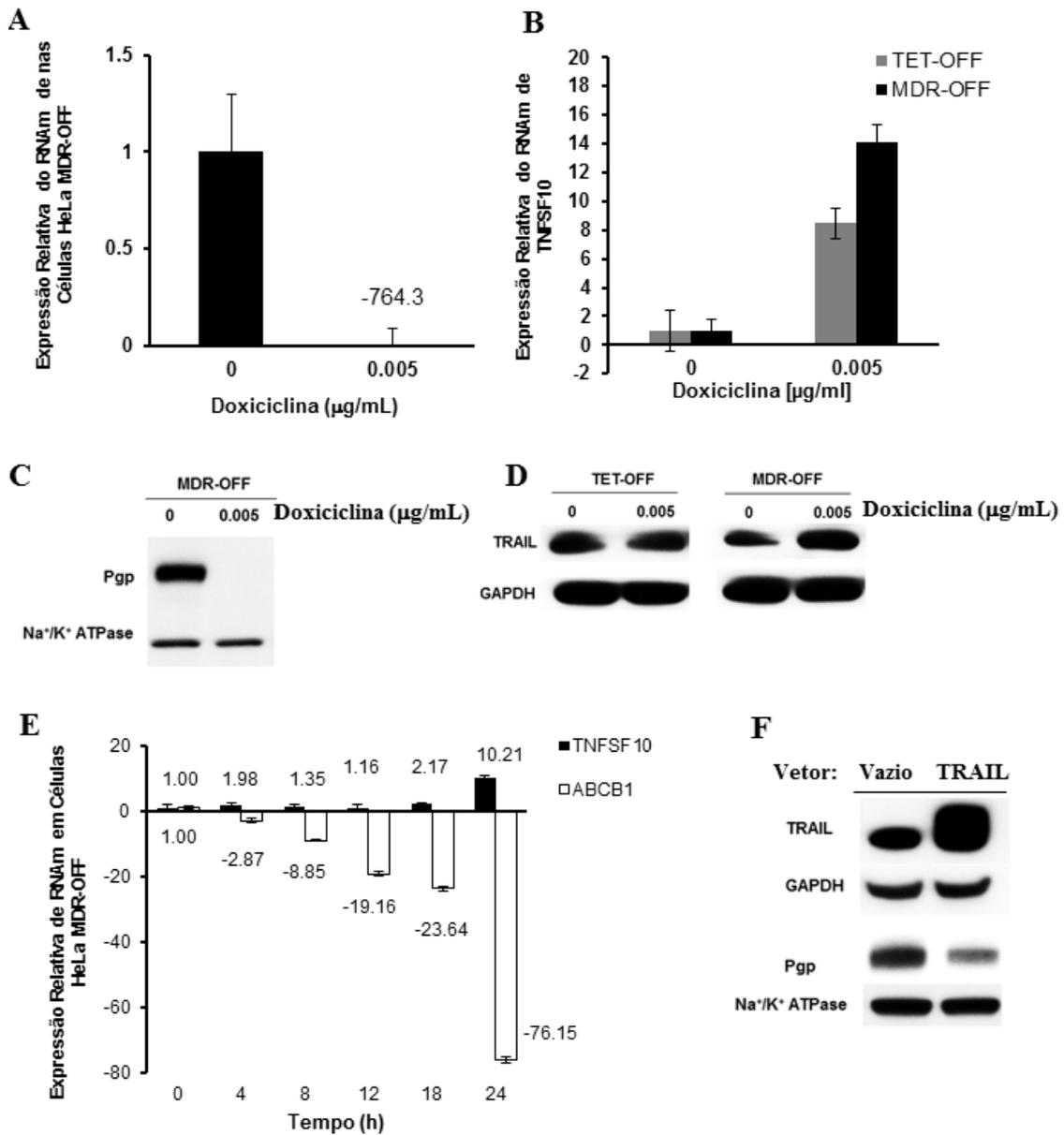


Figura 4.13: Análise da correlação inversa entre a expressão de glicoproteína P (Pgp) e TRAIL em células HeLa MDR-Off. Análise do RNAm e dos níveis proteicos de Pgp/ABCB1 em células HeLa MDR-Off na presença de doxiciclina (Dox) (A,C). Análise do RNAm e dos níveis proteicos de TNFSF10/TRAIL quando a expressão de Pgp está silenciada mediante presença de Dox (B,D). Análise da expressão de TNFSF10/TRAIL quando Pgp é silenciada de maneira tempo-dependente na presença de Dox (E). (F) Análise da expressão de Pgp em células HeLa MDR-Off mediante superexpressão transitente de TRAIL com plasmídeo pCMV6-XL5. Os níveis de RNAm foram normalizados pelo valor do RNAm de *GAPDH* e *Na⁺K⁺ATPase* e *GAPDH* foram utilizados como controle endógeno na técnica de Western blot.

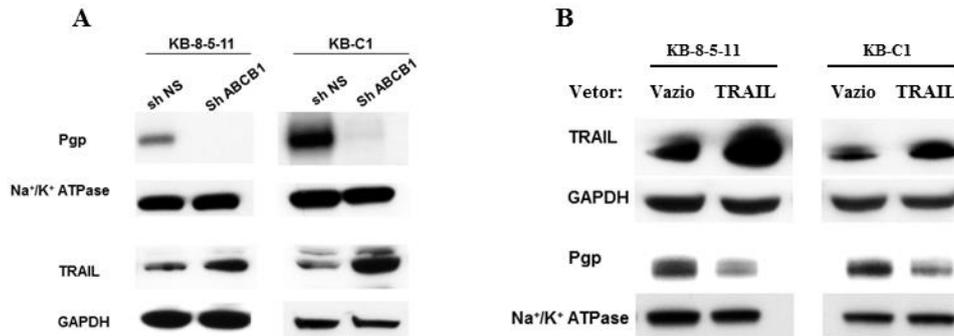


Figura 4.14: Análise da correlação inversa entre a expressão de glicoproteína P (Pgp) e TRAIL em células KB-8-5-11 e KB-C1. Análise dos níveis proteicos de TRAIL em células KB-8-5-11 e KB-C1 silenciadas para Pgp (shABC1) (A). Análise da expressão de Pgp em KB-8-5-11 e KB-C1 mediante superexpressão transitória de TRAIL com plasmídeo pCMV6-XL5 (B). Sh NS representam células silenciadas para alvo não específico. Na⁺K⁺ATPase e GAPDH foram utilizados como controle endógeno na técnica de Western blot.

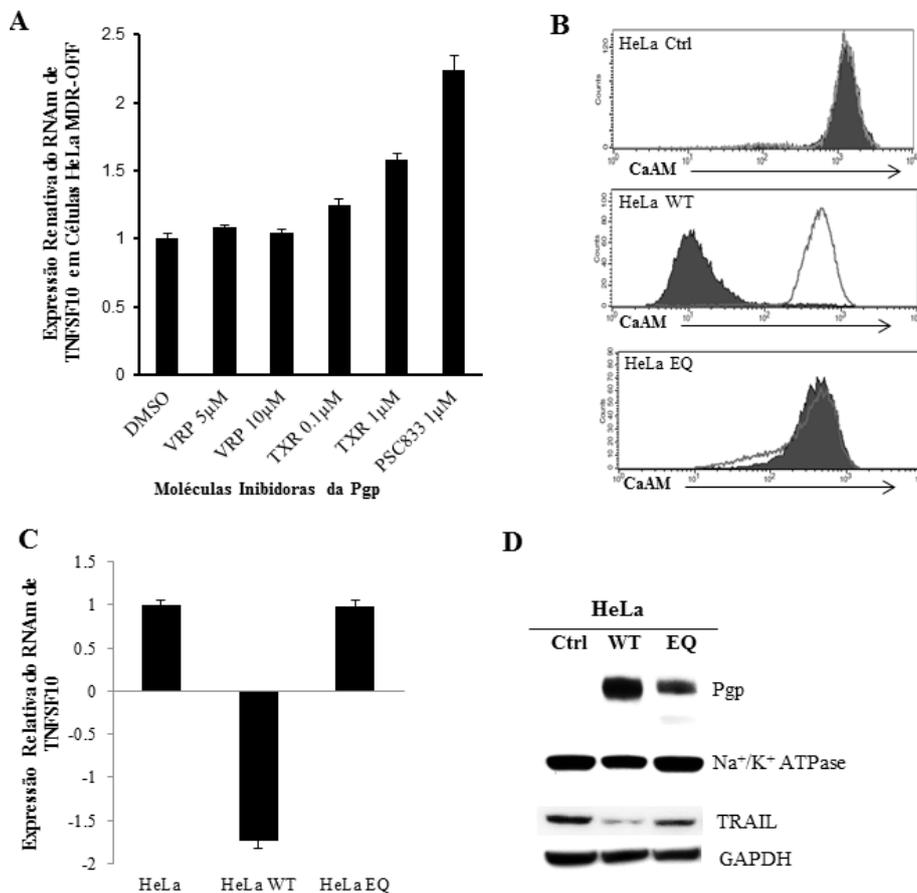


Figura 4.15. Expressão de TRAIL é dependente da expressão e função da glicoproteína P (Pgp). Células HeLa MDR-Off foram submetidas à incubação com inibidores da função da Pgp – Verapamil (VRP), Tariquidar (TXR) e PSC833 - e após 24h a expressão do RNAm de TNFSF10/TRAIL foi analisada por qRT-PCR (A). Células HeLa foram transfectadas com vetores virais para Pgp selvagem (WT) e Pgp mutante (EQ -com mutação nos domínios de ligação ao ATP). A função da Pgp foi analisada nas células HeLa controle (ctrl) e transfectadas (B), assim como a expressão do RNAm de TNFSF10/TRAIL (C) e expressão proteica de Pgp e TRAIL (D). Os níveis de RNAm foram normalizados pelo valor do RNAm de GAPDH e Na⁺K⁺ATPase e GAPDH foram utilizados como controle endógeno na técnica de Western blot. Para o ensaio funcional foram utilizados TXR como agente modulador e calceína AM como substrato fluorescente da Pgp.

4.2.4 A localização citoplasmática de TRAIL contribui para resistência ao ligante TRAIL em células Pgp-negativas

Tem sido discutido na literatura a importância da via extrínseca da apoptose como alvo para o tratamento de neoplasias. Além disso, devido a potencial de TRAIL em induzir apoptose em vários tipos tumorais e pouco induzir morte em células não transformadas, TRAIL na forma solúvel (sTRAIL) tem sido utilizada em ensaios clínicos (Srivastava 2001; Falschlehner *et al.*, 2007). No presente estudo, as células HeLa MDR-off/Pgp^{OFF}, HeLa MDR-off/Pgp^{ON}, KB-3-1 e KB-C1 foram tratadas com o ligante TRAIL e avaliadas quanto a taxa de apoptose induzida. Os dados obtidos mostraram que após 24h de tratamento as células silenciadas para Pgp, e consequentemente, que apresentam maior expressão de TRAIL endógeno mostraram maior sensibilidade ao tratamento com o sTRAIL. Além disso, as células KB-C1/shNS e KB-C1/shABCB1 também foram tratadas com o sTRAIL e os resultados confirmaram que células com baixos níveis de expressão de Pgp, e consequentemente maiores níveis de expressão de TRAIL endógeno, apresentam mais resistência ao sTRAIL (Figura 4.16).

Visando verificar o impacto do silenciamento da expressão da Pgp na localização subcelular de TRAIL as células HeLa MDR-off/Pgp^{OFF} e KB-C1 shABCB1 foram submetidas a análise por microscopia confocal. Os dados obtidos revelaram que TRAIL estava localizado no citoplasma de ambas as células Pgp-negativas (Figura 4.17A). Além disso, através do ensaio de ELISA não foi possível observar diferenças nos níveis de TRAIL secretados entre as células Pgp-positivas e Pgp-negativas (Figura 4.17B). Esses dados indicam que o aumento da expressão de TRAIL observado no compartimento citosólico de células Pgp-negativas, não é secretado por essas células o que sugere um papel diferenciado de TRAIL na apoptose.

O próximo passo foi avaliar a expressão dos receptores de TRAIL. Não foram observadas alterações na expressão dos receptores de morte DR4 e DR5 nas linhagens HeLa MDR-Off/Pgp^{ON}, HeLa MDR-Off/Pgp^{OFF}, KB-C1 shNS e KB-C1 shABCB1 (Figura 4.18A e B). No entanto, em análise dos receptores do tipo *decoy* foi possível observar aumento na expressão de DcR1 e diminuição da expressão de DcR2 mediante silenciamento da Pgp (HeLa MDR-Off/Pgp^{OFF} e KB-C1 shABCB1). É importante ressaltar que as células silenciadas para Pgp apresentam aumento na expressão de TRAIL. Esses dados sugerem que apesar da diminuição de DcR2, a expressão

aumentada de DcR1 pode contribuir para resistência a apoptose mediada pelo ligante sTRAIL.

Diante de todos os resultados obtidos nessa segunda parte do trabalho, nossa hipótese refere-se a TRAIL como uma proteína que pode contribuir para resistência a apoptose mediada pelo ligante sTRAIL. Diante disso, o próximo passo foi testar se células KB-3-1, que não expressam Pgp e conseqüentemente, não apresentam o perfil MDR, silenciadas para TRAIL tornavam-se mais sensíveis ao ligante sTRAIL. Os resultados obtidos mostraram que as células KB-3-1shNS e KB-3-1 shTNFSF10 não apresentam diferença na taxa de apoptose induzida pelo ligante sTRAIL (Figura 4.19), o que sugere que TRAIL pode atuar como uma proteína de resistência apenas em um contexto no qual células tumorais apresentam o perfil MDR.

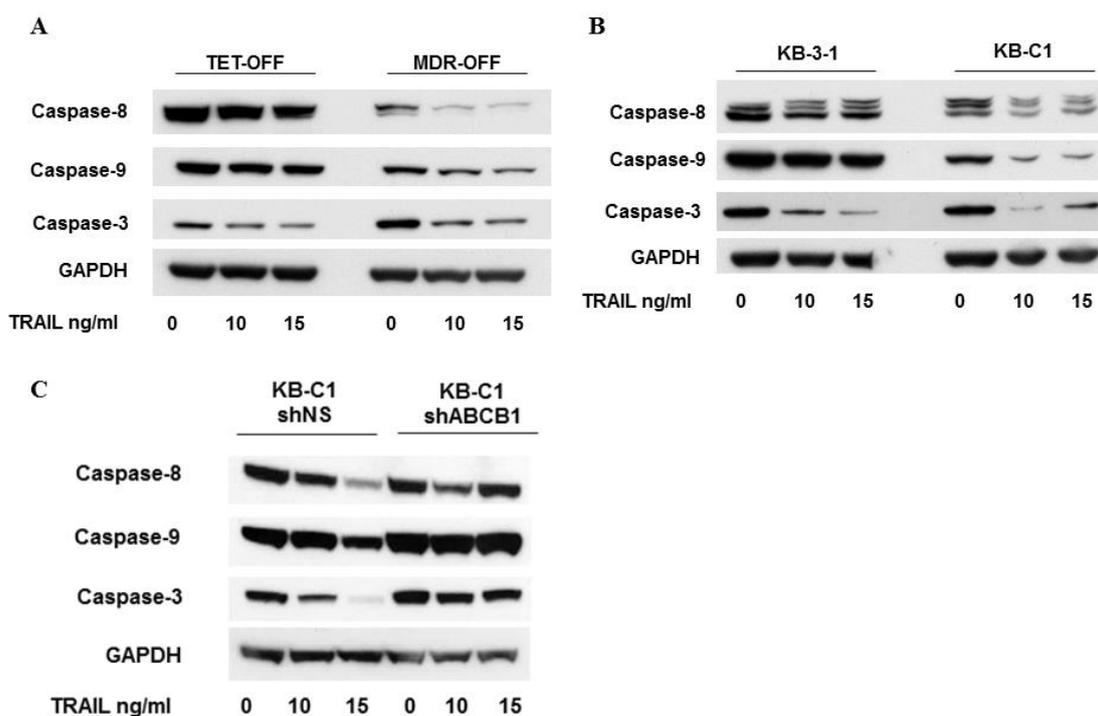


Figura 4.16. Células com maior expressão de TRAIL apresentam menos susceptibilidade a apoptose induzida pelo ligante sTRAIL. Análise da apoptose induzida por TRAIL recombinante (sTRAIL) após 24h de incubação, através da imunomarcção das caspases-3, -8 e -9 em células HeLa TET-Off e MDR-Off (A); KB-3-1 e KB-C1 (B); e KB-C1 silenciada para Pgp (shABC1) (C). Sh NS representam células silenciadas para alvo não específico. GAPDH foi utilizado como controle endógeno na técnica de Western blot.

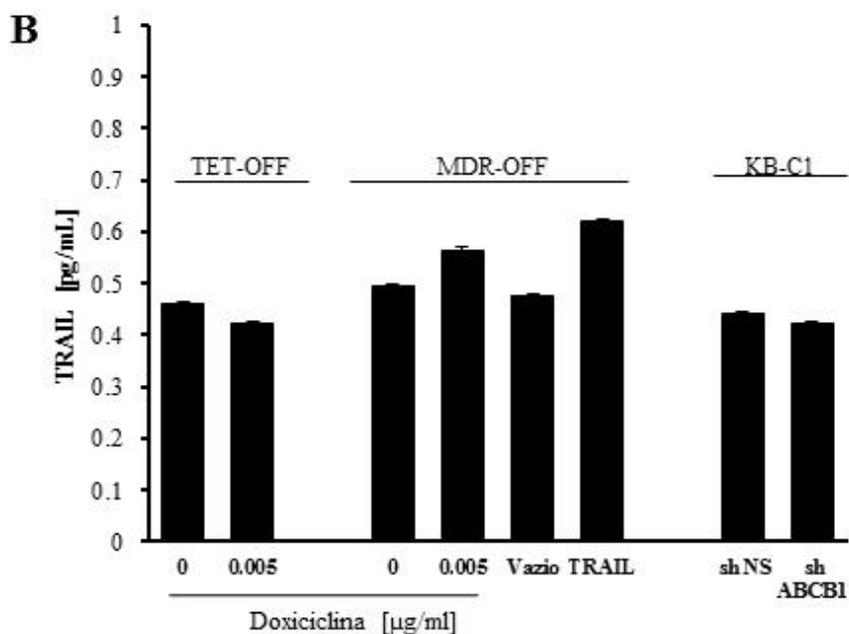
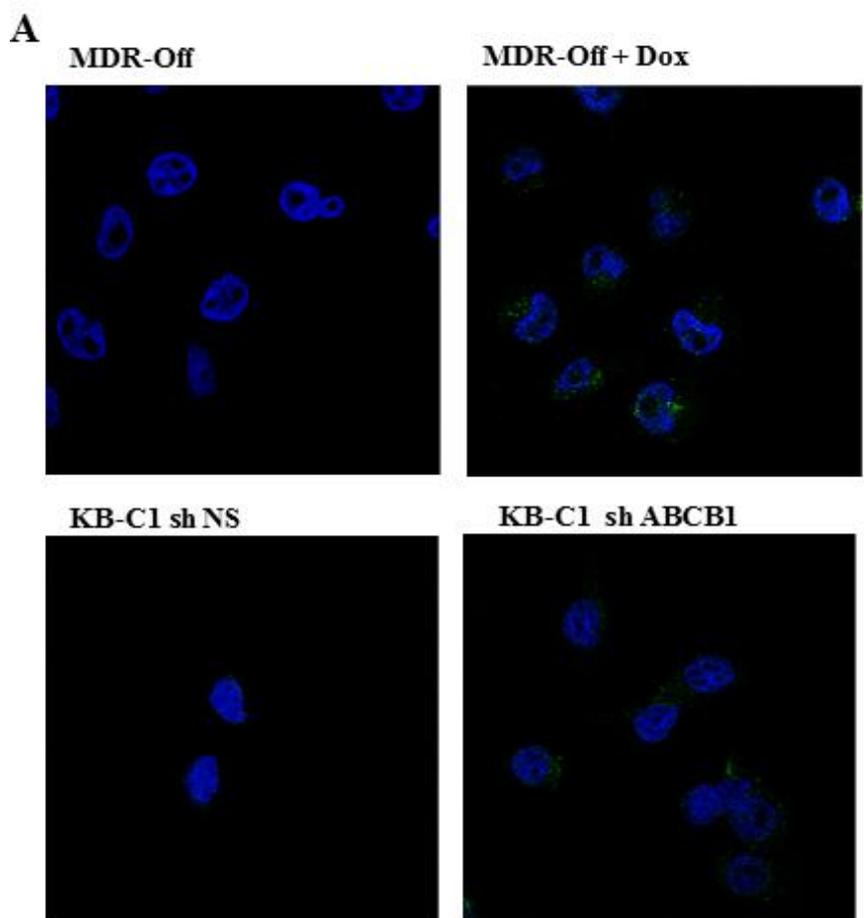


Figura 4.17. Análise do efeito do silenciamento da glicoproteína P na localização de TRAIL. Células HeLa MDR-Off na presença ou ausência de doxiciclina e células KB-C1 shNS e shABCB1 foram submetidas a microscopia confocal (A) e a análise quantitativa de TRAIL solúvel através do ensaio de ELISA. Células HeLa Tet-Off foram utilizadas como controle (B). Na microscopia confocal, marcação nuclear com DAPI (azul) e com anticorpo policlonal anti-TRAIL (verde). As imagens foram obtidas com aumento de 100X.

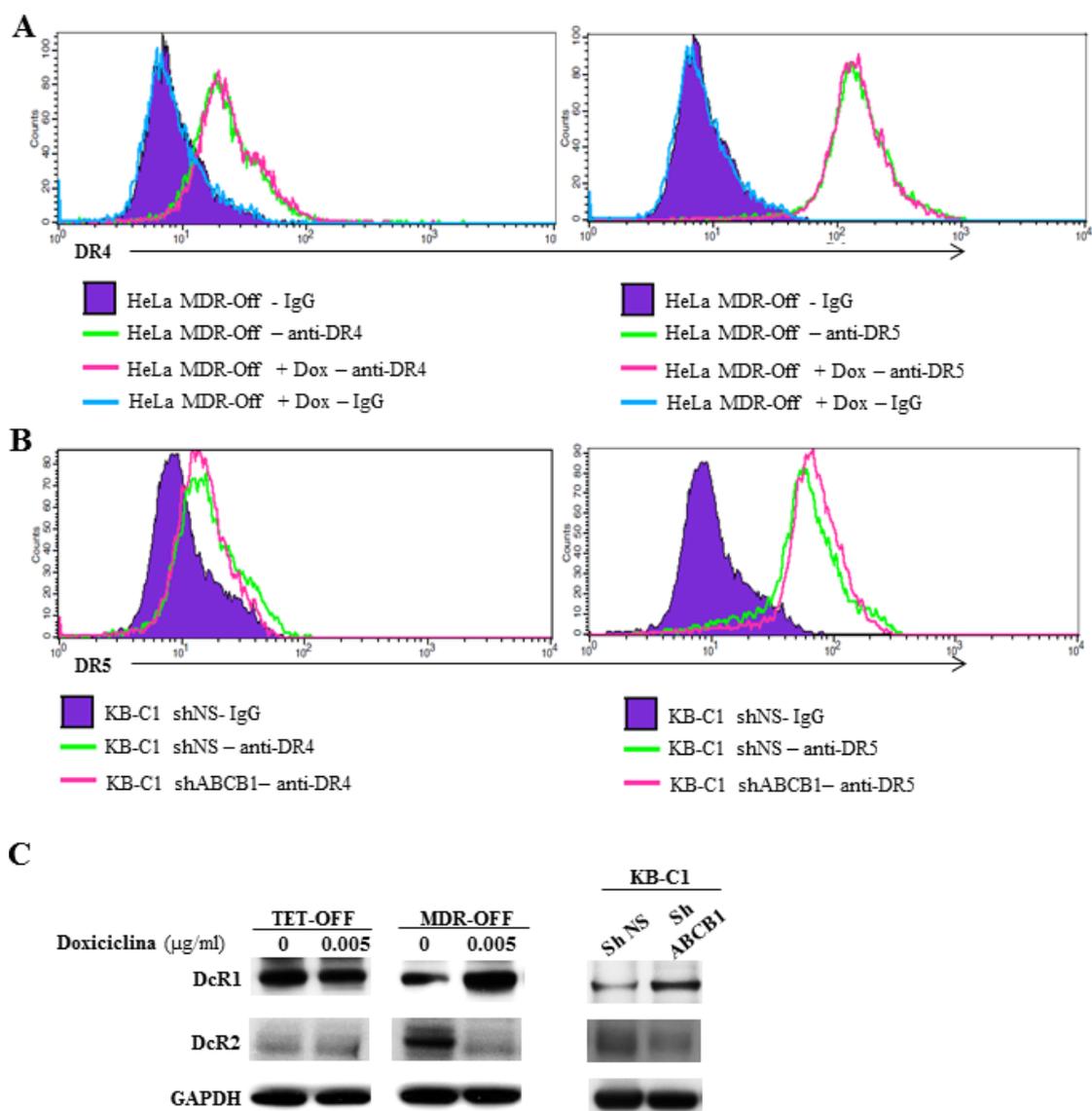


Figura 4.18. Análise do efeito do silenciamento da glicoproteína P na expressão dos receptores de morte. Células HeLa MDR-Off na presença ou ausência de doxiciclina (Dox) e células KB-C1 shNS e KB-C1 shABC1 foram avaliadas quanto a expressão dos receptores de TRAIL, DR4 (A e B painel da esquerda), DR5 (A e B painel da direita) por citometria de fluxo. A expressão dos receptores DcR1 e DcR2 foi avaliada por Western blot (C). Controle isotópico (IgG) foi utilizado como controle negativo na análise de DR4 e DR5. GAPDH foi utilizado como controle endógeno na técnica de Western blot.

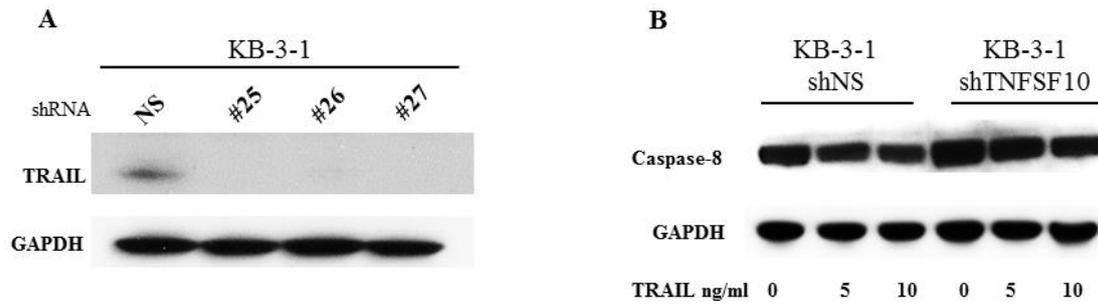


Figura 4.19: Silenciamento de TRAIL não altera a sensibilidade das células KB-3-1 ao ligante sTRAIL. As células KB-3-1 foram silenciadas com shRNA pLKO.1 com três sequências diferentes, todas alvo para TRAIL #25, #26 e #27 (A). As células KB-3-1 shNS e KB-3-1 shTNFSF10 #25 foram incubadas com o ligante sTRAIL por 24h e avaliadas quando a expressão de caspase-8 por Western blot (B).

5. DISCUSSÃO

5.1 Parte 1: Estudo da aquisição do fenótipo multifatorial mediado por micropartículas de membranas em células tumorais

Nessa primeira parte do estudo foi mostrado que MPs derivadas de células CML resistentes de são capazes de transferir Pgp e moléculas apoptóticas para células de câncer de pulmão e mama. Ademais, foi demonstrado que tais MPs causam alterações no perfil oncogênico das células receptoras sensíveis.

A seletividade de ligação das MPs Pgp-positivas foi recentemente discutida por Jaiswal e cols. (2013), que revelaram que MPs liberadas a partir de células resistentes de câncer de mama apenas transferiam Pgp para células malignas do mesmo tipo tumoral. Além disso, os autores mostraram que as MPs derivadas de células de leucemia linfoblástica são capazes de transferir Pgp para células não leucêmicas. No entanto, Pasquier e cols. mostraram que MPs derivadas de células neoplásicas de origem epitelial e mesenquimal interagem com células endoteliais (PASQUIER *et al.*, 2014).

No presente estudo, os resultados obtidos revelaram que MPs derivadas de células LMC resistentes foram capazes de transferir Pgp/ABCB1 à células sensíveis de câncer de pulmão e mama, não mostrando seletividade pelo tipo celular. Além disso, os níveis de expressão aumentados da survivina, cIAP-1 e XIAP em células A549 sugerem que as MPs derivadas das células LMC resistentes foram capazes de transferir IAPs para células de câncer de pulmão, porém não transferiram tais proteínas a células de câncer mama (Figura 4.4). A survivina foi previamente identificada em exossomos (pequenas vesículas menores que MPs e derivadas de organelas intracelulares) secretados a partir de células de câncer cervical e de pacientes com câncer de próstata (KHAN *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2012). Além disso, outro estudo também utilizando células de câncer cervical mostrou cIAP1 e XIAP em uma fração enriquecida de MPs, contendo exossomos, após longa exposição do *pool* proteico por Western blot (HONEGGER *et al.*, 2013). No entanto, no presente estudo descrevemos pela primeira vez a presença de RNAm das IAPs em MPs derivadas de células LMC resistentes (Figura 4.2).

A transferência intercelular de Pgp mediada por MPs derivadas de células neoplásicas com perfil MDR foi previamente descrita como um potente mediador de resistência devido a atividade funcional da glicoproteína como uma transportadora de

fármacos (PASQUIER *et al.*, 2012). Da mesma maneira, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que as células A549 adquiriram resistência a cisplatina mediante co-cultivo com células Pgp-positivas. No entanto, a cisplatina não é substrato da Pgp, não sendo, assim, transportada por esta glicoproteína (GIBALOVÁ *et al.*, 2009); embora, as células A549 tenham mostrado um perfil de evasão a apoptose induzida por cisplatina. Esse dado claramente demonstra que as células A549 adquiriram resistência por outro mecanismo além da transferência da Pgp. Em trabalho conduzido por Gong e cols. (GONG *et al.*, 2013) foi verificado que antracilinas podem ser sequestrados por MPs e isso contribuiria para a aquisição da resistência. No entanto, considerando o conteúdo observado das MPs e sua capacidade em transferi-los, sugerimos que a expressão concomitante das IAPs e da Pgp induziram um fenótipo de resistência multifatorial nas células A549. Esses dados estão de acordo com nosso estudo anterior, o qual mostrou que XIAP contribui para resistência a cisplatina e vincristina em células de LMC mediante bloqueio da atividade da Pgp (SOUZA *et al.*, 2012). Ademais, as células MCF7 mostraram um perfil de evasão a apoptose induzida por paclitaxel após co-cultivo com células Pgp-positivas. No entanto, uma vez que não foram observadas alterações no nível de expressão proteica das IAPs, exceto pelo discreto aumento da XIAP (Figura 4.4), assumimos que as células MCF7 apresentaram resistência ao paclitaxel devido a expressão e atividade da Pgp.

Posteriormente, foi mostrado que MPs Pgp-positivas induziram alterações no perfil de expressão de NFκB/p65, em ambas as células receptoras. NFκB é um fator transcricional oncogênico que se liga na forma de homo ou heterodímeros, e sob estímulo sua localização nuclear pode controlar eventos relacionados a diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. Na via canônica, a translocação nuclear de NFκB ocorre mediante fosforilação e degradação de IκBα, seu regulador endógeno (OECKINGHAUS *et al.*, 2011). Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram que a degradação de IκBα e a localização nuclear de NFκB ocorreram nas células A549 e MCF7 após co-cultivo com MPs derivadas de células resistentes (Figura 4.7). Assim, sugerimos que o miR-21 poderia regular a ativação da via de NFκB nas células receptoras. Iliopoulos e cols. demonstraram que miR-21 induz transformação celular e inibição do gene supressor tumoral PTEN, com consequente ativação de Akt e NFκB (ILIOPOULOS *et al.*, 2010). Ademais, Pasquier e cols. (2014) mostraram que MPs derivadas de células neoplásicas foram capazes de induzir a fosforilação de Akt em

células receptoras de origem endotelial. Dessa maneira, sugerimos que a via de NFκB foi ativada nas células MCF7 via transferência do miR-21 por MPs Pgp-positivas. Entretanto, não foram observadas alterações no nível de expressão do miR-21 em células A549 após o co-cultivo (Figura 4.8), o que indica outra via de ativação relacionada a NFκB. No entanto, uma variedade de miRs que tem sido relacionados com a ativação da via de NFκB podem ser carreados e transferidos por MPs (JAISWAL *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2011). De qualquer maneira, sugerimos que a localização nuclear de NFκB está associada a possível expressão endógena dos genes *ABCB1* e dos genes que transcrevem as IAPs, principalmente *BIRC4*, cujo RNAm não foi identificado nas MPs, porém foi observado em maior quantidade nas células receptoras após co-cultivo com MPs (Figura 4.4).

No presente estudo foram observadas alterações no perfil de localização de Yb-1 em ambas as células receptoras mediante co-cultivo com MPs Pgp-positivas. A superexpressão do fator transcricional Yb-1 tem sido descrita em neoplasias sólidas e hematológicas, e a localização nuclear dessa proteína tem sido associada a um prognóstico ruim no câncer (ELISEEVA *et al.*, 2011). Como resultados, não foram observadas alterações nos níveis de expressão de Yb-1; entretanto, foram identificados focos nucleares de Yb-1 nas células MCF7 o que indicam sua ativação transcricional após co-cultivo com MPs Pgp-positivas (Figura 4.7). Em trabalho conduzido por Chatterjee e cols. (2008) também foi observado Yb-1 em focos nucleares em células de melanoma múltiplo. Os autores associaram esse tipo de marcação com a resistência a quimioterápico e ao fenótipo altamente proliferativo apresentado por essas células. Por outro lado, Yb-1 mostrou-se distribuído nos compartimentos citoplasmático e nuclear nas células A549, e mediante co-cultivo com MPs foi possível observar uma localização perinuclear de Yb1. Esses dados podem sugerir que Yb-1 está associado à RNAs no retículo endoplasmático. Nossa hipótese é baseada nos dados de Hayakawa e cols. (2002) que mostraram que Yb-1 é capaz de se ligar a RNA em estado oxidado, possivelmente para protegê-lo da degradação.

Tem sido descrito que Pgp/*ABCB1* pode ser regulado por miRs; entretanto, há dados controversos na literatura no que se refere a regulação de Pgp/*ABCB1* e consequentemente o fenótipo MDR pelo miR-27a (LI *et al.*, 2013). Em um estudo recente foi observado que células leucêmicas que expressam Pgp apresentam baixos níveis do miR-27a, e que quando a expressão desse miRNA era induzida via

transfecção, os níveis de expressão de Pgp eram reduzidos (FENG *et al.*, 2011). Os dados obtidos no presente estudo mostraram que as MPs derivadas de células Pgp-positivas de LMC apresentam baixos níveis do miR-27a, porém foi possível observar um aumento nos níveis de expressão desse miRNA nas células receptoras após o co-cultivo com MPs o que sugere que a aquisição do fenótipo MDR está também associado com o miR-27a (Figura 4.8). Essa hipótese é corroborada pelos dados obtidos por Zhu e cols. que demonstraram que o miR-27a e também o miR-451, regulam positivamente regulam a expressão de Pgp/ABCB1. Os autores verificaram que a inibição dos miR-27a e -451 levou a diminuição dos níveis de expressão de Pgp/ABCB1 (ZHU *et al.*, 2008). Da mesma maneira que os dados da literatura, nós também observamos aumento do miR-451 nas células receptoras após co-cultivo com, MPs sugerindo a contribuição deste miRNA na aquisição do fenótipo MDR.

A primeira parte do estudo nos permite concluir que MPs derivadas de células resistentes carregam e transferem moléculas envolvidas com a MDR e moléculas antiapoptóticas que são capazes de estabelecer a resistência a agentes quimioterápicos em células neoplásicas sensíveis. Ademais, tais MPs puderam induzir ativação de vias oncogênicas e a transferência de miRs, o que contribui para a malignidade e para o fenótipo de resistência multifatorial nessas células.

5.2 Parte 2: Estudo da relação da expressão da Pgp com genes e proteínas que participam das vias que regulam a apoptose

Na segunda parte do estudo foi mostrado que a expressão de TRAIL está inversamente correlacionada a expressão de Pgp, ou seja, em células cuja expressão de Pgp foi silenciada ou sua atividade de efluxo inibida observou-se aumento da expressão de TRAIL. Ademais, o acúmulo de TRAIL no compartimento citoplasmático das células Pgp-negativas foi associado aos baixos índices de apoptose induzida pelo ligante sTRAIL.

Como abordado ao longo do presente estudo, embora a Pgp tenha sido descrita como a principal proteína relacionada a MDR, sabe-se que diferentes fatores também contribuem para o fenótipo de resistência à quimioterápicos. A evasão a apoptose induzida por fármacos tem sido observada em diversas neoplasias, o que ressalta a importância do desenvolvimento de estudos que envolvem a análise de proteínas

associadas à via de morte celular (GOTTESMAN *et al.*, 2006). Nosso grupo e outros autores vêm discutindo ao longo dos anos uma possível correlação entre a expressão de Pgp e a expressão de proteínas envolvidas na via de apoptose, o que sugere uma contribuição multifatorial para fenótipo de resistência (NAKAGAWA *et al.*, 2006; SHMAN *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013). No presente estudo, através da técnica de PCR array foi possível analisar 96 genes relacionados a via de apoptose, e dentre esses genes identificou-se TRAIL como inversamente correlacionado a expressão de Pgp, ou seja células Pgp-positivas expressam baixos níveis de expressão de TRAIL.

Até o presente momento, o nosso estudo é o primeiro a claramente demonstrar que a expressão de TRAIL em células MDR correlaciona-se com a expressão e função de Pgp. Os resultados obtidos demonstraram que concomitantemente ao silenciamento de Pgp, ou ao bloqueio de sua função, ocorre um aumento nos níveis de expressão de TRAIL. Além disso, demonstramos que células MDR apresentam redução nos níveis de expressão de Pgp quando são induzidas a superexpressão de TRAIL (Figura 4.13). Os níveis aumentados da expressão de TRAIL/TNFSF10 em células neoplásicas foram relatados por Tanaka e cols. (2007). Os autores verificaram que os níveis de RNAm de *TNFSF10* estavam aumentados em neutrófilos de pacientes com LMC após tratamento *in vitro* e *in vivo* com interferon α (IFN α), em comparação a neutrófilos desses pacientes ao diagnóstico. Ademais, no mesmo estudo os autores ainda observaram que os níveis de RNAm de *TNFSF10* em células CD34⁺ desses pacientes eram relativamente baixos. Embora os autores não tenham mencionado sobre a expressão de Pgp, já foi mostrado que neutrófilos expressam baixos níveis dessa proteína e que células CD34⁺ apresentam expressão de Pgp (BEM-CHETRIT & LEVY, 1998; HIWASE *et al.*, 2013), o que poderia também contribuir para os níveis elevados de TRAIL nessas células. Ressalta-se que no estudo atual, os níveis aumentados de TRAIL foram independentes de estímulo de citocinas.

TRAIL é uma molécula capaz de induzir apoptose através de sua ligação aos receptores proapoptóticos de membranas, DR4 e DR5, os quais propagam sinais intracelulares de morte promovendo assim a ativação da via extrínseca da apoptose (SHEIKH & HUANG, 2003). Atualmente, sTRAIL recombinante e anticorpos agonistas monoclonais anti-DR5 tem sido avaliados em ensaios clínicos para terapia de vários tipos de tumores sólidos e neoplasias hematológicas, como monoterapia ou em

combinação com quimioterapia convencional (YOUNES *et al.*, 2010; HERBST *et al.*, 2010; MICHAEAU *et al.*, 2013). No entanto, tumores de alta malignidade como melanoma e neuroblastoma, por exemplo, apresentam resistência a apoptose induzida por sTRAIL. Tem sido discutido que a resistência a sTRAIL pode ocorrer devido a alterações moleculares em sua via de ativação (ZHANG *et al.*, 2005). No presente estudo foi possível observar que as células Pgp-positivas apresentaram maior susceptibilidade ao tratamento com sTRAIL que as células MDR com a Pgp silenciada (Figura 4.16). Esses dados estão de acordo com relatos da literatura, nos quais foram verificados que células Pgp-positivas são mais sensíveis ao tratamento com sTRAIL quando comparadas as células parentais Pgp-negativas (PARK *et al.*, 2006; SEO *et al.*, 2010). Em contraste, Galski e cols (2013) utilizaram as células HeLa MDR-Off (Alemán et al 2003) e verificaram que Pgp contribui para resistência ao ligante TRAIL; no entanto, tais células foram tratadas com o ligante TRAIL em associação com ciclohexamida. Além disso, para silenciar a expressão de Pgp, as células HeLa MDR-Off precisam ser cultivadas com tetraciclina ou doxíciclina. Dessa forma, a sensibilidade observada nas células Pgp-negativas possivelmente está relacionada a interação com diferentes drogas, o que provavelmente contribuiu para o alto índice de apoptose observado nessas células.

Diferentes hipóteses têm sido discutidas a fim de justificar a apoptose mediada pelo ligante sTRAIL em células Pgp-positivas. Seo e cols. (2010) verificaram que células de leucemia Pgp-positivas foram mais susceptível a apoptose induzida por sTRAIL devido a diminuição da expressão da proteína antiapoptótica cFLIP e ao aumento da expressão de DR4 e DR5. Tal evento não ocorreu nas células parentais Pgp-negativas. Park e cols. (2010) também associaram a expressão dos receptores DR4 e DR5 apoptose induzida por sTRAIL em células Pgp-positivas. Neste trabalho os autores verificaram que esses receptores são mais expressos em células que expressam Pgp quando comparadas às células parentais que não expressam Pgp, e que quando a expressão de DR5 foi inibida, TRAIL induziu baixos índices de apoptose. Em outro estudo do mesmo grupo, os autores verificaram através de ensaio de co-imunoprecipitação que Pgp pode interagir com DR4 e DR5, e que esta interação aumenta mediante o tratamento com sTRAIL. Os autores sugerem que a aproximação molecular entre Pgp e, principalmente, DR5 poderia favorecer sTRAIL ligar-se a DR5 e, conseqüentemente induzir apoptose (PARK *et al.*, 2006). Entretanto, no presente

estudo os níveis de expressão de DR4 e DR5 não foram alterados mediante a expressão ou silenciamento da Pgp (Figura 4.18A e B). Por outro lado, foi possível observar um pequeno aumento na expressão do receptor DcR1 mediante silenciamento da Pgp (Figura 4.18C), o que poderia contribuir para resistência a sTRAIL. Embora não tenha sido comprovada correlação entre a expressão dos receptores do tipo *decoy* (DcR1 e DcR2) e a resistência ao ligante sTRAIL, estudos que utilizaram a expressão ectópica de DcR1 e DcR2 em linhagens tumorais observaram redução da sensibilidade a sTRAIL, sugerindo que tais receptores poderiam proteger as células da apoptose induzida por sTRAIL. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a superexpressão de DcR2 pode levar a ativação de NFκB e conseqüentemente a transcrição de proteínas antiapoptóticas (DEGLI-ESPOSTI 1999; ZHANG & FANG, 2005).

Como abordado anteriormente, alguns estudos demonstraram que a expressão de TRAIL endógeno pode ser estimulada por interleucinas e IFNs, na superfície de células do sistema imunológico (KAYAGAKI *et al.*, 1999; JOHNSEN *et al.*, 1999; TANAKA *et al.*, 2007). Além disso, a expressão de TRAIL em neutrófilos e monócitos tem sido associada a atividade citotóxica dessas células contra células tumorais que apresentam sensibilidade a TRAIL (TECCHIO *et al.*, 2004; Koga *et al.*, 2004). Outros estudos, ainda mostraram que camundongos deficientes para expressão de TRAIL (TRAIL^{-/-}) apresentaram maior predisposição ao desenvolvimento de tumores e metástases, sugerindo que TRAIL atua como uma proteína supressora tumoral (CRETNEY *et al.*, 2002; SEDGER *et al.*, 2002). No entanto, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho estamos sugerindo que TRAIL pode atuar como uma proteína relacionada a sobrevivência de células tumorais. Nossos dados demonstraram que as células tumorais que apresentam expressão aumentada de TRAIL – mediante silenciamento da expressão de Pgp - são menos susceptíveis ao tratamento com o ligante sTRAIL quando comparadas a células que expressam menores quantidades de TRAIL (Figura 4.16). Além disso, não foi possível identificar maiores níveis de sTRAIL secretado pelas células que apresentavam aumento da expressão de TRAIL; e tais células apresentaram TRAIL no compartimento citoplasmático (Figura 4.17). Esses dados corroboram que TRAIL pode apresentar um papel diferenciado na resistência ao ligante sTRAIL.

Alguns estudos têm investigado os eventos relacionados a resistência ao sTRAIL. Em um estudo desenvolvido por Ehrhardt e cols. (2003) foi demonstrado que amostras de pacientes com leucemia aguda apresentaram resistência a apoptose induzida

por sTRAIL e após incubação com o ligante também foi observada redução na taxa de apoptose espontânea. Além disso, os autores observaram que as células leucêmicas primárias sofreram proliferação espontânea *in vitro*. Os autores observaram os mesmos eventos em linhagens celulares resistentes a sTRAIL e sugerem que este ligante contribui para sobrevivência e proliferação de clones resistentes. Ademais, em modelos de camundongos com injúria na artéria femoral foi observado que proteína TRAIL está envolvida com a proliferação e sobrevivência de células vasculares via indução de IGF1R mediada por NFκB (KAVURMA *et al.*, 2008; CHAN *et al.*, 2010). Esses estudos contribuem para nossa hipótese de que TRAIL atua como uma proteína de sobrevivência em células tumorais silenciadas para Pgp.

Embora o silenciamento de TRAIL não tenha alterado os níveis de apoptose induzida pelo ligante sTRAIL, vale ressaltar que tal evento foi observado em células que não expressam Pgp, e conseqüentemente não apresentam o perfil MDR (Figura 4.19). Assim, a segunda parte do estudo nos permite concluir que células Pgp-positivas apresentam maior susceptibilidade a sTRAIL devido aos baixos níveis de expressão de TRAIL endógeno; porém quando essas células Pgp-positivas são silenciadas para Pgp e, conseqüentemente, passam a apresentar maiores níveis de expressão de TRAIL localizado em compartimento citoplasmático, tornam-se resistentes ao tratamento ao tratamento com o ligante sTRAIL.

6. CONCLUSÕES

6.1 – Parte 1: Estudo da aquisição do fenótipo multifatorial mediado por micropartículas de membranas em células tumorais

- MPs de membrana são espontaneamente liberadas *in vitro* por células de LMC com perfil MDR;
- MPs de membrana carregam moléculas (proteínas e RNAs) relacionadas a resistência multifatorial e as transferem para outras células neoplásicas independente da origem celular;
- Células tumorais sensíveis a fármacos que interagem com MPs derivadas de células com perfil MDR, adquirem resistência a morte celular induzida por quimioterápicos;
- Proteínas relacionadas a vias de NFκB e Yb-1 são ativadas em células tumorais sensíveis após transferência de moléculas envolvidas com a resistência multifatorial mediada por MPs de membrana.

6.2 – Parte 2: Estudo da relação da expressão da Pgp com genes e proteínas que participam das vias que regulam a apoptose

- O gene TNFSF10/TRAIL foi identificado como inversamente correlacionado a expressão de Pgp em diferentes modelos celulares;
- Células que superexpressam Pgp apresentam baixa expressão de TRAIL, assim como células que superexpressam TRAIL apresentam baixa expressão de Pgp revelando que a correlação entre a expressão de Pgp e TRAIL é bidirecional;
- A correlação inversa entre Pgp e TRAIL é dependente da função de efluxo da Pgp
- Células MDR silenciadas para Pgp apresentam TRAIL localizado no citoplasma o que possivelmente impede sua clivagem e liberação na forma solúvel;
- Células MDR silenciadas para Pgp e que, conseqüentemente, expressam altos níveis de TRAIL apresentam maior resistência a apoptose induzida pelo ligante sTRAIL.

6.3 – Conclusão final

O presente estudo demonstrou que o fenótipo MDR é transferido entre diferentes células neoplásicas através de MPs causando alterações no fenótipo das células receptoras, incluindo ativação de vias oncogênicas. Além disso, verificamos que a Pgp não atua sozinha na MDR, mas que outras proteínas relacionadas a via de apoptose contribuem para um fenótipo de resistência multifatorial. Em conjunto, os resultados obtidos proporcionam novas informações sobre o surgimento e manutenção da MDR em neoplasias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA S, FOJO A, HANOVER JA, *et al.*,. **Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs.** Somat Cell Mol Genet. 1985 Mar; 11(2):117-26.

AKYUREK N, REN Y, RASSIDAKIS GZ, *et al.*,. **Expression of inhibitor of apoptosis proteins in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas.** Cancer. 2006 Oct 15; 107(8):1844-51.

ALEMÁN C, ANNEREAU JP, LIANG XJ, *et al.*,. **P-glycoprotein, expressed in multidrug resistant cells, is not responsible for alterations in membrane fluidity or membrane potential.** Cancer Res 2003; 63(12):3084-91.

ALTIERI DC. **Validating survivin as a cancer therapeutic target.** Nat Rev Cancer. 2003; 3:46-54.

AMBUDKAR SV, SAUNA, ZE, GOTTESMAN MM. *et al.*,. **A novel way to spread drug resistance in tumor cells: functional intercellular transfer of P-glycoprotein (ABCB1).** Trends Pharmacol Sci. 2005; 26(8):385–387.

ARORA V, CHEUNG HH, PLENCHETTE S, *et al.*,. **Degradation of Survivin by the X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP)-XAF1 Complex.** JBC 2007; 282(36): 26202–9.

ASHKENAZI A, PAI RC, FONG S, *et al.*,. **Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand.** J Clin Invest 1999; 104:155–162.

ASSEF Y, RUBIO F, COLÓ G, *et al.*,. **Imatinib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells.** Leuk Res 2009; 33: 710-716,

BAKER E, EL-OSTA A. **MDR1, chemotherapy and chromatin remodeling.** Cancer Biol Ther. 2004; 3: 819–824.

BALDWIN AS. **Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kB.** J Clin Invest. 2001; 107: 241–246.

BARNHART BC, ALAPPAT EC, PETER M.E. **The Cd45 typeI/typeII model.** Semin Immunol. 2003; 15: 185-193.

BASAKI Y, TAGUCHI K, IZUMI H, et al.,. Y-box binding protein-1 (YB-1) promotes cell cycle progression through CDC6-dependent pathway in human cancer cells. Eur J Cancer. 2010; 46(5):954-65.

BEBAWY M, COMBES V, LEE E, et al.,, Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. Leukemia. 2009; 23: 1643–49.

BEN-CHETRIT E, LEVY M. Does the lack of the P-glycoprotein efflux pump in neutrophils explain the efficacy of colchicine in familial Mediterranean fever and other inflammatory diseases? Med Hypotheses. 1998 Nov;51(5):377-80.

BERQUIN IM, PANG B, DZUIBINSKI ML, et al.,. Y-box binding protein 1 confers EGF independence to human mammary epithelial cells. Oncogene. 2005; 21:1-10.

BIEDLER, J. L. AND RIEHM, H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: crossresistance, radioautographic, and cytogenetic studies. Cancer Res. 1970; 30, 1174–1184.

BOLLRATH J, GRETEN FR. IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. EMBO Rep. 2009; 10(12):1314-9.

BRANDT S, RAFFETSEDER U, DJUDJAJ S, et al.,. Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities. Eur J Cell Biol. 2012 Jun-Jul;91(6-7):464-71.

BRAUN T, CARVALHO G, FABRE C, et al.,. Targeting NF-kB in hematologic malignancies. Cell Death and Differ. 2006; 13: 748-58.

BRIMACOMBE KR, HALL MD, AULD DS, et al.,. A dual-fluorescence high-throughput cell line system for probing multidrug resistance. Assay Drug Dev Technol. 2009 Jun;7(3):233-49.

BUDA G, ORCIUOLO E, MAGGINI V, et al.,. MDR1 modulates apoptosis in CD34+ leukemic cells. Ann Hematol. 87(12): 1017-8, 2008.

CALLAGHAN R, CROWLEY E, POTTER S, et al.,. P-glycoprotein: so many ways to turn it on. J Clin Pharm. 2008; 48:365–78.

CHAN J, PRADO-LOURENCO L, KHACHIGIAN LM, et al.,. TRAIL promotes VSMC proliferation and neointima formation in a FGF-2-, Sp1 phosphorylation-, and NFkappaB-dependent manner. Circ Res. 2010 Apr 2;106(6):1061-71.

CHATTERJEE M, RANCSO C, STÜHMER T, *et al.*,. **The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma.** *Blood*. 2008; 111: 3714-3722.

CHE X, YANG D, ZONG H, *et al.*,. **Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients.** *Urol Oncol*. 2012 Jul-Aug;30(4):450-6.

CHEN P, LI J, GE LP, *et al.*,. **Prognostic value of survivin, X-linked inhibitor of apoptosis protein and second mitochondria-derived activator of caspases expression in advanced non-small-cell lung cancer patients.** *Respirology*. 2010 Apr;15(3):501-9

COCUCCI E, RACCHETTI G, MELDOLESI J. **Shedding microvesicles: artefacts no more.** *Trends Cell Biol*. 2009; 19:43–51.

CONTE E, STAGNO F, GUGLIELMO P, *et al.*,. **Survivin expression in chronic myeloid leukemia.** *Cancer Lett*. 2005; 225(1): 105-110.

CRETNEY E, TAKEDA K, YAGITA H, *et al.*,. **Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice.** *J Immunol* 2002;168:1356–61.

DEAN M., RZHETSKY A., ALLIKMETS R. **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.** *Genome Res*. 2001; 11:1156–1166.

DEGLI-ESPOSTI, M. **To die or not to die—The quest of the TRAIL receptors.** *J. Leuk Biol*. 1999; 65(5), 535–542.

DEGTEREV A, YUAN J. **Expansion and evolution of cell death programmes.** *Nature*. 2008; 9: 378-390.

DEMON D., VAN DAMME P., BERGHE T.V., *et al.*,. **Caspase substrates: easily caught in deep waters?** *Trends Biotechnol*. 2009 Dec;27(12):680-8.

DIMBERG LY, ANDERSON CK, CAMIDGE R, *et al.*,. **On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics.** *Oncogene*. 2013 Mar 14;32(11):1341-50.

DU YJ, LI J, ZHU WF, *et al.*,. **Survivin mRNA-circulating tumor cells predict treatment efficacy of chemotherapy and survival for advanced non-small cell lung cancer patients.** *Tumour Biol*. 2014 Jan 5. [Epub ahead of print]

EHRHARDT H, FULDA S, SCHMID I, *et al.*,. **TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB.** *Oncogene*. 2003 Jun 19;22(25):3842-52.

EL ANDALOUSSI S, MÄGER I, BREAKEFIELD XO, *et al.*,. **Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities.** *Nat Rev Drug Discov*. 2013; 12: 347-357.

ELISEEVA IA, KIM ER, GURYANOV SG, *et al.*,. **Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions.** *Biochemistry (Mosc)*. 2011; 76: 1402-1433.

EL-OSTA A, KANTHARIDIS P, ZALCBERG JR, *et al.*,. **Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation.** *Mol Cell Biol*. 2002; 22:1844–57.

FACCION RS, REZENDE LM, ROMANO SO, *et al.*,. **Centroblastic diffuse large B cell lymphoma displays distinct expression pattern and prognostic role of apoptosis resistance related proteins.** *Cancer Invest*. 2012 Jun;30(5):404-14

FADEEL B, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. **Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?** *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 266: 699–717.

FALSCHLEHNER C, EMMERICH CH, GERLACH B, *et al.*,. **TRAIL signalling: decisions between life and death.** *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39:1462-1475.

FENG DD, ZHANG H, ZHANG P, *et al.*,. **Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia.** *J Cell Mol Med*. 2011; 15: 2164-2175.

FERREIRA CG, VAN DER VALK P, SPAN SW, *et al.*,. **Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients.** *Ann Oncol*. 2001; 12(6): 799-805.

FROMM MF. **Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers.** *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 25: 423–429.

FUKUDA S, PELUS LM. **Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues.** *Mol Cancer Ther*. 2006; 5(5): 1087-98.

FULDA S, VUCIC D. **Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer.** *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11(2):109-24.

GALLUZZI L, MAIURI MC, VITALE, I *et al.*,. **Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications.** *Cell Death Differ*. 2007; 14:. 1237–43.

GALSKI H, OVED GELBER T, SIMANOVSKY M, *et al.*, **P-glycoprotein-dependent resistance of cancer cells toward the extrinsic TRAIL apoptosis signaling pathway.** Biochemical pharmacology 2013; 86(5): 584-596.

GAO Q, YANG S, KANG MQ. **Influence of survivin and Bcl-2 expression on the biological behavior of non-small cell lung cancer.** Mol Med Rep. 2012 Jun;5(6):1409-14.

GIBALOVÁ L, SEDLÁK J, LABUDOVIČ M, *et al.*, **Multidrug resistant P-glycoprotein positive L1210/VCR cells are also cross-resistant to cisplatin via a mechanism distinct from P-glycoprotein-mediated drug efflux activity.** Gen Physiol Biophys 2009; 28: 391–403.

GILLET JP, CALCAGNO AM, VARMA S, *et al.*, **Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108(46):18708-13.

GILLET JP, GOTTESMAN MM. **Mechanisms of multidrug resistance in cancer.** Methods Mol Biol. 2010;596:47-76.

GILLET JP, EFFERTH T, REMACLE J. **Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes.** Biochim Biophys Acta. 2007; 1775, 237–262.

GONG J, JAISWAL R, MATHYS JM, *et al.*, **Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance.** Cancer Treat Rev. 2012; 38(3):226-34.

GONG J, LUK F, JAISWAL R, *et al.*, **Microparticle drug sequestration provides a parallel pathway in the acquisition of cancer drug resistance.** Eur. J. Pharmacol. 2013; 721: 116-125.

GOTTESMAN MM, AMBUDKAR SV. **Overview: ABC transporters and human disease.** J Bioenerg Biomembr. 2001; 33: 453–458.

GOTTESMAN MM, LUDWIG J, XIA D. *et al.*, **Defeating drug resistance in cancer.** Discov Med. 2006; 6(31):18-23.

GOTTESMAN MM. **Mechanisms of cancer drug resistance.** Annu Rev Med. 2002; 53:615–627.

GRIVICICH I, REGNER A, ROCHA AB. **Morte Celular por Apoptose.** Revista Brasileira de Cancerologia. 2007; 53(3): 335-343.

HACKER G. **The morphology of apoptosis.** Cell Tissue Res. 2000; 301: 5–17.

HÄCKER H, KARIN M. **Regulation and function of IKK and IKK-related kinases.** Sci STKE. 2006; (357):re13.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

HARIKUMAR KB, KUNNUMAKKARA AB, AHN KS, *et al.*. **Modification of the cysteine residues in IkappaBalpha kinase and NF-kappaB (p65) by xanthohumol leads to suppression of NF-kappaB-regulated gene products and potentiation of apoptosis in leukemia cells.** Blood. 2009; 113(9):2003-13.

HARMSSEN S, MEIJERMAN I, FEBUS CL, *et al.*. **PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line.** Cancer Chemother Pharmacol. 2010; 66(4):765-71.

HAYAKAWA H, UCHIUMI T, FUKUDA T, *et al.*. **Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine,** Biochemistry. 2002; 41:12739-12744.

HAYDEN MS, GHOSH S. **Signaling to NF-kappaB.** Genes Dev. 2004; 18(18):2195-224.

HERBST RS, KURZROCK R, HONG DS, *et al.*. **A first-in-human study of conatumumab in adult patients with advanced solid tumors.** Clin Cancer Res. 2010 Dec 1;16(23):5883-91.

HERNANDEZ JM, FARMA JM, COPPOLA D, *et al.*. **Expression of the antiapoptotic protein survivin in colon cancer.** Clin Colorectal Cancer. 2011; 10(3):188-93.

HINNIS AR, LUCKETT JC, WALKER RA. **Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients.** Br J Cancer. 2007 Feb 26;96(4):639-45.

HIWASE DK, SAUNDERS VA, NIEVERGALL E, *et al.*. **Dasatinib targets chronic myeloid leukemia-CD34+ progenitors as effectively as it targets mature cells.** Haematologica. 2013 Jun;98(6):896-900.

HOFMANN HS, SIMM A, HAMMER A, *et al.*. **Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer.** J Cancer Res Clin Oncol. 2002; 128 (10): 554-60.

HOMER C, KNIGHT DA, HANANEIA L, *et al.*. **Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function.** Oncogene. 2005; 24(56):8314-25.

HONEGGER A, LEITZ J, BULKESCHER J, *et al.*,. **Silencing of human papillomavirus (HPV) E6/E7 oncogene expression affects both the contents and the amounts of extracellular microvesicles released from HPV-positive cancer cells.** Int J Cancer. 2013; 133: 1631-1642.

HUGEL B, MARTÍNEZ MC, KUNZELMANN C, *et al.*,. **Membrane microparticles: two sides of the coin.** Physiology (Bethesda). 2005; 20:22-7.

HUNDSDOERFER P, DIETRICH I, SCHMELZ K, *et al.*,. **XIAP expression is post-transcriptionally upregulated in childhood ALL and is associated with glucocorticoid response in T-cell ALL.** Pediatr Blood Cancer. 2010; 55 (2): 260–266.

HUNTER AM, LACASSE EC, KORNELUK RG. **The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets.** Apoptosis. 2007; 12: 1543–68.

HWANG JH, VOORTMAN J, GIOVANNETTI E, *et al.*,. **Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer.** PLoS One 2010; 5:10630.

HYOGOTANI A, ITO K, YOSHIDA K, *et al.*,. **Association of nuclear YB-1 localization with lung resistance-related protein and epidermal growth factor receptor expression in lung cancer.** Clin Lung Cancer. 2012 Sep;13(5):375-84.

ILIOPOULOS D, JAEGER SA, HIRSCH HA, *et al.*,. **STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer.** Mol Cell. 2010; 39: 493-506.

JAISWAL R, GONG J, SAMBASIVAM S, *et al.*,. **Microparticle-associated nucleic acids mediate trait dominance in cancer.** FASEB J. 2012; 26(1):420-9.

JAISWAL R, LUK F, DALLA PV, *et al.*,. **Breast cancer-derived microparticles display tissue selectivity in the transfer of resistance proteins to cells.** PLoS One. 2013; 8: e61515.

JANZ M, HARBECK N, DETTMAR P, *et al.*,. **Y-BOX factor YB-1 predict drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, UPA and PAI-1.** Int J Cancer. 2002; 97: 278–282.

JIN HS, LEE DH, KIM DH, *et al.*,. **cIAP1, cIAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor-kappaB activation.** Cancer Res. 2009; 69(5):1782-91.

JOHNSEN AC, HAUX J, STEINKJER B, *et al.*,. **Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity.** Cytokine. 1999 Sep;11(9):664-72.

JOHNSON RA, INCE TA, SCOTTO KW. **Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element.** J Biol Chem. 2001; 276: 27716–20.

JOHNSTONE RW, CRETNEY E, SMYTH MJ. **P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death.** Blood. 1999; 93(3): 1075-1085.

JULIANO RL, LING V. **A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.** Biochim Biophys Acta. 1976; 455:152–162.

JURCHOTT K, BERGMANN S, STEIN U, *et al.*. **YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression.** J Biol Chem. 2003; 278(30):27988-96.

KARTNER N, RIORDAN JN, LING V. **Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines.** Science 1983; 221: 1285–1288.

KASHIHARA M, AZUMA K, KAWAHARA A, *et al.*. **Nuclear Y-box binding protein-1, a predictive marker of prognosis, is correlated with expression of HER2/ErbB2 and HER3/ErbB3 in non-small cell lung cancer.** J Thorac Oncol. 2009; 4(9):1066-74.

KAVURMA MM, SCHOPPET M, BOBRY SHEV YV, *et al.*. **Trail stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of NF-kappa B and induction of insulin-like growth factor-1 receptor.** J Biol Chem. 2008; 283:7754–7762

KAWAKAMI H, TOMITA M, MATSUDA T, *et al.*. **Transcriptional activation of survivin through the NF-kB pathway by human T-cell leukemia virus type I Tax.** Int J Cancer. 2005; 115(6): 967–974.

KAYAGAKI N, YAMAGUCHI N, NAKAYAMA M, *et al.*. **Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs.** J Exp Med. 1999 May 3;189(9):1451-60.

KESSEL D, BOTTERILL V, WODINSKY I. **Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response.** Cancer Res. 1968 May; 28(5):938-41.

KHAN KH, BLANCO-CODESIDO M, MOLIFE LR. **Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway.** Crit Rev Oncol Hematol. 2013 *in press*

KHAN S, JUTZY JM, ASPE JR, *et al.*,. **Survivin is released from cancer cells via exosomes.** Apoptosis. 2011; 16: 1-12.

KHAN S, JUTZY JM, VALENZUELA MM, *et al.*,. **Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer.** PLoS One. 2012; 7: e46737.

KIM DW, KIM KYUNG-OK, SHIN MJ, *et al.*,. **siRNA-based targeting of antiapoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cells.** Mol Cancer. 2009; 8(28): 1-10.

KIM HG, HIEN TT, HAN EH, *et al.*,. **Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF- κ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation.** Br J Pharmacol. 2011; 162(5): 1096–1108.

KIM HJ, HAWKE N, BALDWIN AS. **NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer.** Cell Death Differ. 2006; 13(5):738-47.

KIRTANE AR, KALSCHUEER SM, PANYAM J. **Exploiting nanotechnology to overcome tumor drug resistance: Challenges and opportunities.** Adv Drug Deliv Rev. 2013 Nov 30;65(13-14):1731-47.

KOGA Y, MATSUZAKI A, SUMINOE A, *et al.*,. **Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils.** Cancer Res. 2004 Feb 1;64(3):1037-43.

KOHNO K, IZUMI H, UCHIUMI T. *et al.*,. **The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1.** Bioessays. 2003 Jul;25(7):691-8.

KUO MT, LIU Z, WEI Y, *et al.*,. **Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF- κ B signaling.** Oncogene. 2002; 21(13):1945-54.

KUWANO M, ODA Y, IZUMI H, *et al.*,. **The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance.** Mol Cancer Ther. 2004; 3(11):1485–92.

KUWANO M, UCHIUMI T, HAYAKAWA H, *et al.*,. **The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies.** Cancer Science 2003; 94: 9–14.

LAGE H. **An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem.** Cell Mol Life Sci. 2008; 65:3145–67.

- LASHAM A, MOLONEY S, HALE T, *et al.*,. **The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor.** J Biol Chem. 2003; 278(37):35516-23.
- LEVCHENKO A, MEHTA BM, NIU X, *et al.*,. **Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells.** PNAS. 2005; 102(6): 1933-38.
- LI H, YANG BB, **Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance.** Acta Pharmacol Sin. 2013; 34: 870-879.
- LI X, HONG L, ZHAO Y, *et al.*,. **A new apoptosis inhibitor, CIAPIN1 (cytokine-induced apoptosis inhibitor 1), mediates multidrug resistance in leukemia cells by regulating MDR-1, Bcl-2, and Bax.** Biochem Cell Biol. 2011; 408(2):344-9.
- LI Z, HU S, WANG J, *et al.*,. **MiR-27a modulates MDR1/P-glycoprotein expression by targeting HIPK2 in human ovarian cancer cells.** Gynecol Oncol. 2010; 119(1):125-30.
- LIMA LG, CHAMMAS R, MONTEIRO RQ, *et al.*,. **Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner.** Cancer Lett. 2009; 283: 168-175.
- LIST AF, KOPECKY KJ, WILLMAN CL, *et al.*,. **Cyclosporine inhibition of P-glycoprotein in chronic myeloid leukemia blast phase.** Blood. 2002; 100(5): 1910-2.
- LIU F, XIE ZH, CAI GP, *et al.*,. **The Effect of Survivina on Multidrug Resistance Cells P-Glycoprotein in MCF-7 and Its Adriamycin Cells.** Biol Pharm Bull. 2007; 30: 2279-83.
- LOURENÇO JJ, MAIA R, SCHEINER MA, *et al.*,. **Genomic variation at the *MDR1* promoter and P-glycoprotein expression and activity in AML patients.** Leukemia Research. 2008; 32:976–979.
- LOWN KS, MAYO RR, LEICHTMAN AB, *et al.*,. **Role of intestinal P-glycoprotein (Mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine.** Clin Pharmacol Ther. 1997; 62: 248–260.
- LU M, LIN SC, HUANG Y, *et al.*,. **AP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization.** Mol Cell. 2007; 26(5):689-702.
- LU Q, HARRINGTON EO, ROUNDS S. **Apoptosis and lung injury.** Keio J Med. 2005; 54: 184-189.

LUURTSEMA G, VERBEEK GL, LUBBERINK M, *et al.*,. **Carbon-11 labeled tracers for in vivo imaging P-glycoprotein function: kinetics, advantages and disadvantages.** *Curr Top Med Chem.* 2010; 10: 1820-33.

MA X, BECKER BUSCAGLIA LE, BARKER JR. *et al.*,. **MicroRNAs in NF-kappaB signaling.** *J Mol Cell Biol.* 2011; 3: 159-166.

MARÁZ A, FURÁK J, PÁLFÖLDI R, *et al.*,. **Roles of BCL-2 and MDR1 expression in the efficacy of paclitaxel-based lung cancer chemoradiation.** *Mol Biol (Mosk).* 2010; 44(6):1010-7.

MEDINA PP, SLACK FJ. **microRNAs and cancer: an overview.** *Cell Cycle.* 2008; 7: 2485-2492.

MENG Z, LOU S, TAN J, *et al.*,. **Nuclear factor-kappa B inhibition can enhance apoptosis of differentiated thyroid cancer cells induced by I.** *PLoS One.* 2012; 7(3):e33597.

MICHEAU O, SHIRLEY S, DUFOUR F. **Death receptors as targets in cancer.** *Br J Pharmacol.* 2013 Aug;169(8):1723-44.

MIZUTANI T, MASUDA M, NAKAI E, *et al.*,. **Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1).** *Curr Drug Metab.* 2009; 9: 167-74.

MURALIDHARAN-CHARI V, CLANCY JW, SEDGWICK A, *et al.*,. **Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression.** *J Cell Sci.* 2010; 123(Pt 10):1603-11.

MURIS JJ, CILLESSEN SA, VOS W, *et al.*,. **Immunohistochemical profiling of caspase signaling pathways predicts clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas.** *Blood.* 2005; 105(7): 2916-23.

NAKAGAWA Y, ABE S, KURATA M, *et al.*,. **IAP Family Protein Expression Correlates With Poor Outcome of Multiple Myeloma Patients in Association With Chemotherapy-induced Overexpression of Multidrug Resistance Genes.** *Am J Hematol.* 2006; 81:824–831.

NORBURY CJ, HICKSON ID. **Cellular responses to DNA damage.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41: 367–401.

NOTARBARTOLO M, CERVELLO M, DUSONCHET L, *et al.*,. **Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-**

apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins). Cancer Lett. 2002; 180(1): 91-101.

OECKINGHAUS A, HAYDEN MS, GHOSH S. **Crosstalk in NF- κ B signaling pathways.** Nat. Immunol. 2011; 12: 695-708.

OHSAWA M, IKURA Y, FUKUSHIMA H, *et al.*,. **Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins as a predictor of poor response to chemotherapy and prognosis in patients with nodal diffuse large B-cell lymphoma.** Oncology. 2005; 68(4-6): 422-31.

OKAMOTO T, IZUMI H, IMAMURA T, *et al.*,. **Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression.** Oncogene. 2000; 19(54):6194-202.

OKAMOTO T, SANDA T, ASAMITSU K. **NF κ B signaling and carcinogenesis.** Curr Pharm Des. 2007; 13: 447-62.

OZÖREN N, EL-DEIRY WS. **Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL.** Neoplasia. 2002; 4(6):551-7.

PALLIS M, TURZANSKI J, SEEDHOUSE C, *et al.*,. **Resistance to spontaneous apoptosis in acute myeloid leukaemia blasts is associated with P-glycoprotein expression and function, but not with the presence of FLT3 internal tandem duplications.** Br J Haematol. 2003; 120: 1009-1016.

PAN X, WANG ZX, WANG R. **MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer.** Cancer Biol Ther. 2010 Dec 15;10(12):1224-32.

PARK SJ, BIJANGI-VISHEHSARAEI K, SAFA AR. **Selective TRAIL-triggered apoptosis due to overexpression of TRAIL death receptor 5 (DR5) in P-glycoprotein-bearing multidrug resistant CEM/VBL1000 human leukemia cells.** Int J Biochem Mol Biol. 2010;1(1):90-100.

PARK SJ, WU CH, CHOI MR, *et al.*,. **P-glycoprotein enhances TRAIL-triggered apoptosis in multidrug resistant cancer cells by interacting with the death receptor DR5.** Biochem Pharmacol. 2006 Jul 28;72(3):293-307.

PASQUIER J, GALAS L, BOULANGÉ-LECOMTE C *et al.*,. **Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells.** J Biol Chem. 2012; 287: 7374-7387.

PASQUIER J, THAWADI HA, GHIABI P, *et al.*,. **Microparticles mediated cross-talk between tumoral and endothelial cells promote the constitution of a pro-**

metastatic vascular niche through Arf6 up regulation. *Cancer Microenviron.* 2014; Epub ahead of print.

PATEL C, STENKE L, VARMA S, *et al.*, **Multidrug resistance in relapsed acute myeloid leukemia: evidence of biological heterogeneity.** *Cancer.* 2013 Aug 15;119(16):3076-83.

PETTER ME, KRAMMER PH. **The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond.** *Cell Death Differ.* 2003; 10: 26-35.

PICCIN A, MURPHY WG, SMITH OP. **Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications.** *Blood Reviews.* 2007; 21:157-171.

REIS FR, VASCONCELOS FC, PEREIRA DL, *e al.* **Survivin and P-glycoprotein are associated and highly expressed in late phase chronic myeloid leukemia.** *Oncol Rep.* 2011; 26(2):471-8.

ROBINSON LJ, ROBERTS WK, LING TT, *et al.*,. **Human MDR 1 Protein Overexpression Delays the Apoptotic Cascade in Chinese Hamster Ovary Fibroblasts.** *Biochemistry.* 1997; 36: 11169-78, 1997.

ROSS DD, DOYLE LA. **Mining our ABCs: pharmacogenomic approach for evaluating transporter function in cancer drug resistance.** *Cancer Cell.* 2004 Aug;6(2):105-7.

RUEFLI AA, TANTON KM, DARCY PK, *et al.*,. **P-glycoprotein inhibits caspase-8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following Fas ligation.** *Cell Death Differ.* 2002; 9(11): 1266-1272.

RUEFLI AA, TANTON KM, DARCY PK, *et al.*,. **P-glycoprotein inhibits caspase-8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following Fas ligation.** *Cell Death Differ.* 2002; 9(11): 1266-1272.

RUMJANEK VM, TRINDADE GS, WAGNER-SOUZA K, *et al.*,. **Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1.** *An Acad Bras Cienc.* 2001, 73(1): 57-69.

RYAN BM, KONECNY GE, KAHLERT S, *et al.*,. **Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1.** *Ann Oncol.* 2006 Apr;17(4):597-604.

SARKAD B, HOMOLYA L, SZAKÁCS G, *et al.*,. **Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System.** *Physiol Rev.* 2006; 86: 1179–1236.

SCHIMMER AD, DALILI S, RIED SJ. **Targeting XIAP for the treatment of malignancy.** Cell Death and Differentiation. 2006; 13: 179-188.

SCOTT FL, DENAULT JB, RIEDL SJ, *et al.*,. **XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs.** EMBO J. 2005; 24(3):645-55.

SECA H, LIMA RT, GUIMARAES JE, *et al.*,. **Simultaneous targeting of P-gp and XIAP with siRNAs increases sensitivity of P-gp overexpressing CML cells to imatinib.** Hematology. 2011; 16: 100-8.

SEDGER LM, GLACCUM MB, SCHUH JC, *et al.*,. **Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice.** Eur J Immunol. 2002 Aug;32(8):2246-54.

SEO SB, HUR JG, KIM MJ, *et al.*,. **TRAIL sensitize MDR cells to MDR-related drugs by down-regulation of P-glycoprotein through inhibition of DNA-PKcs/Akt/GSK-3beta pathway and activation of caspases.** Mol Cancer. 2010 Jul 28;9:199.

SHAFFER BC, GILLET JP, PATEL C, *et al.*,. **Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML.** Drug Resist Updat. 2012 Feb-Apr;15(1-2):62-9.

SHEIKH MS, HUANG Y. **Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1.** Cell Cycle. 2003 Nov-Dec;2(6):550-2.

SHEN B, LI D, DONG P, *et al.*. **Expression of ABC transporters is an unfavorable prognostic factor in laryngeal squamous cell carcinoma.** Methods Mol Biol. 2010; 596:47-76.

SHEN DW, CARDARELLI C, HWANG J. *et al.*,. **Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins.** J Biol Chem. 1986 Jun 15;261(17):7762-70.

Shi WL, Li J, Bao QL, *et al.*,. **Survivin mRNA expression in blood as a predictor of the response to EGFR-tyrosine kinase inhibitors and prognosis in patients with non-small cell lung cancer.** Med Oncol. 2014 Apr; 31(4):893.

SHI Z, LIANG YJ, CHEN ZS, *et al.*,. **Overexpression of Survivin and XIAP in MDR cancer cells unrelated to P-glycoprotein** Oncology Reports. 2007; 17: 969-976.

SHIBAHARA K, SUGIO K, OSAKI T, *et al.*,. **Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer.** Clin Cancer Res. 2001; 7(10):3151-5.

SHILLING RA, VENTER ., VELAMAKANNI ., *et al.*,. **New light on multidrug binding by an ATP-binding-cassette transporter.** Trends in Pharmacology Sciences. 2006; 27: 195–203.

SHMAN TV, FEDASENKA UU, SAVITSKI VP, *et al.*,. **CD34+ leukemic subpopulation predominantly displays lower spontaneous apoptosis and has higher expression levels of Bcl-2 and MDR1 genes than CD34- cells in childhood AML.** Ann Hematol. 2008; 87(5): 353-60.

SILVA KL, DE SOUZA PS, NESTAL DE MORAES G, *et al.*,. **XIAP and P-glycoprotein co-expression is related to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells.** Leuk Res. 2013 Oct;37(10):1350-8.

SINGH M, BLEILE MJ, SHROYER AL, *et al.*,. **Analysis of survivin expression in a spectrum of benign to malignant lesions of the breast.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2004 Dec;12(4):296-304.

SKABKIN MA, EVDOKIMOVA V, THOMAS AA, *et al.*,. **The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strand annealing.** J Biol Chem. 276:44841-7, 2001.

SMYTH MJ, KRASOVSKIS E, SUTTON VR, *et al.*,. **The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis.** Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(12): 7024-7029.

Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, *et al.*,. **Nature's TRAIL-on a path to cancer immunotherapy.** Immunity 2003;18:1–6.

SOUZA PS, VASCONCELOS FC, DE SOUZA REIS FR, *et al.*,. **P-glycoprotein and survivin simultaneously regulate vincristine-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells.** Int J.Oncol. 2011; 39(4):925-33.

SOUZA PS, DA CUNHA VASCONCELOS F, SILVA LF, *et al.*,. **Cyclosporine A enables vincristine-induced apoptosis during reversal of multidrug resistance phenotype in chronic myeloid leukemia cells.** Tumour Biol. 2012 Aug;33(4):943-56.

SPELETAS M, ARGENTOU N, KARANIKAS V, *et al.*,. **Survivin isoform expression patterns in CML patients correlate with resistance to imatinib and progression, but do not trigger cytolytic responses.** Clin Immunol. 2011; 139: 155-63.

SRINIVASULA SM, ASHWELL JD. **IAPs: what's in a name?** Mol Cell. 2008; 30(2):123-35.

SRIVASTAVA RK. **TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer.** Neoplasia 2001, 3:535-546.

STAVROVSKAYA AA, Stromskaya TP. **Transport Proteins of the ABC Family and Multidrug Resistance of Tumor Cells.** Biochemistry (Moscow). 2008; 73(5): 592-604.

STRATFORD AL, FRY CJ, DESILETS C, *et al.*,. **Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells** Breast Cancer Res. 2008; 10(6):R99.

STRAUSS BE, HAAS M. **the region 3v to the major transcriptional start site of the mdrl downstream promoter mediates activation by a subset of mutant p53 proteins.** Biochem Biophys Res Commun. 1995; 217:333–40.

SVOBODA-BEUSAN I, KUSEC R, BENDELJA K, *et al.*,, **The relevance of multidrug resistance-associated P-glycoprotein expression in the treatment response of B-cell chronic lymphocytic leukemia.** Haematologica. 2000; 85(12):1261-7.

SZAKACS G, PATERSON JK, LUDWIG JA, *et al.*,. **Targeting multidrug resistance in cancer.** Nat Rev Drug Discov. 2006; 5:219–234.

TAKEDA K, SMYTH MJ, CRETNEY E, *et al.*,. **Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development.** J Exp Med 2002;195:161–9.

TANAKA H, ITO T, KYO T, *et al.*,. **Treatment with IFNalpha in vivo up-regulates serum-soluble TNF-related apoptosis inducing ligand (sTRAIL) levels and TRAIL mRNA expressions in neutrophils in chronic myelogenous leukemia patients.** Eur J Haematol. 2007 May;78(5):389-98.

TECCHIO C, HUBER V, SCAPINI P, *et al.*,. **IFNalpha-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells.** Blood. 2004 May 15;103(10):3837-44.

TRACEY L, PÉREZ-ROSADO A, ARTIGA MJ, *et al.*,. **Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively.** J Pathol. 2005; 206(2):123-345.

UEDA K, PASTAN I AND GOTTESMAN MM. **Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrugresistance (P-glycoprotein) gene.** J Biol Chem. 1987; 262: 17432-17436

Van DOORMAAL FF, KLEINJAN A, DI NISIO M, *et al.,.* **Cell-derived microvesicles and cancer.** Neth. J Med. 2009; 67:266-273.

VASCONCELOS FC, GATTASS CR, RUMJANEK VM, *et al.,.* **Pomolic acid-induced apoptosis in cells from patients with chronic myeloid leukemia exhibiting different drug resistance profile.** Invest New Drugs. 2007; 25(6): 525-33.

VASCONCELOS FC, SILVA KL, SOUZA PS, *et al.,.* **Variation of MDR proteins expression and activity levels according to clinical status and evolution of CML patients.** Cytometry B Clin Cytom. 2011; 80(3):158-66.

VERMEULEN K, VAN BOCKSTAELE DR, BERNEMAN ZN. **Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer.** Ann Hematol. 2005 Oct;84(10):627-39.

VOGLER M, DICKENS D, DYER MJ, *et al.,.* **The B-cell lymphoma 2 (BCL2)-inhibitors, ABT-737 and ABT-263, are substrates for P-glycoprotein.** Biochem Biophys Res Commun. 2011; 408(2):344-9.

WANG G, RONG J, ZHOU Z, *et al.,.* **Novel gene P28GANK confers multidrug resistance by modulating the expression of MDR-1, Bcl-2 and Bax in osteosarcoma cells.** Mol Biol (Mosk). 2010 44(6):1010-7 (b).

WANG J, LIU Y, JI R, *et al.,.* **Prognostic value of the X-linked inhibitor of apoptosis protein for invasive ductal breast cancer with triple-negative phenotype.** Hum Pathol. 2010; 41(8):1186-95 (a).

WILEY, SR, SCHOOLEY, K, SMOLAK, PJ, *et al.,.* **Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.** Immunity. 1995; 3, 673–682.

XU YC, LIU Q, DAI JQ, *et al.,.* **Tissue microarray analysis of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) expression in breast cancer patients.** Med Oncol. 2014 Mar;31(3):764.

YAMAMOTO Y, GAYNOR RB. **Therapeutic potential of inhibition of the NF-kB pathway in treatment of inflammation and cancer.** J Clin Invest. 2001; 107:134–142.

YANG Z, LI C, WANG X, *et al.,.* **Dauricine induces apoptosis, inhibits proliferation and invasion through inhibiting NF-kappaB signaling pathway in colon cancer cells.** J Cell Physiol. 2010; 225(1):266-75.

YEH JJ, HSU NY, HSU WH, *et al.*,. **Comparison of Chemotherapy Response with P-Glycoprotein, Multidrug Resistance-Related Protein-1, and Lung Resistance-Related Protein Expression in Untreated Small Cell Lung Cancer.** Lung 2005; 183: 177–183.

YOUNES A, VOSE JM, ZELENETZ AD, *et al.*,. **A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma.** Br J Cancer. 2010 Dec 7;103(12):1783-7.

ZHANG L, FANG B. **Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer.** Cancer Gene Ther. 2005 Mar;12(3):228-37.

ZHAO Y, SRIVASTAVA D. **A developmental view of microRNA function.** Trends Biochem Sci. 2007; 32:189–197.

ZHOW S.F. **Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition.** Xenobiotica. 2008; 38(7–8): 802–832.

ZHU H, WU H, LIU X, *et al.*,. **Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells.** Biochem Pharmacol. 2008; 76(5):582-8.

ZINZI L, CAPPARELLI E, CANTORE M, *et al.*,. **Small and Innovative Molecules as New Strategy to Revert MDR.** Front Oncol. 2014 Jan 21;4:2. eCollection.

8. ANEXOS

8.1 Artigos Científicos Publicados

8.1.1 Silva KL, **de Souza PS**, Nestal de Moraes G, Moellmann-Coelho A, Vasconcelos Fda C, Maia RC. XIAP and P-glycoprotein co-expression is related to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Res.* 2013 Oct;37(10):1350-8.

8.1.2 Nestal de Moraes G, **Souza PS**, Costas FC, Vasconcelos FC, Reis FR, Maia RC. The Interface between BCR-ABL-Dependent and -Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia. *Leuk Res Treatment.* 2012;2012:671702.

8.1.3 de Souza Reis FR, de Faria FC, Castro CP, **de Souza PS**, da Cunha Vasconcelos F, Bello RD, da Silva AJ, Costa PR, Maia RC The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013 Feb;13(2):341-51.

8.1.4 **de Souza PS**, da Cunha Vasconcelos F, Silva LF, Maia RC. Cyclosporine A enables vincristine-induced apoptosis during reversal of multidrug resistance phenotype in chronic myeloid leukemia cells. *Tumour Biol.* 2012 Aug;33(4):943-56.

8.1.5 **Souza PS**, Vasconcelos FC, De Souza Reis FR, Nestal De Moraes G, Maia RC. P-glycoprotein and survivin simultaneously regulate vincristine-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Int J Oncol.* 2011 Oct;39(4):925-33.

8.1.6 Vasconcelos FC, Silva KL, **Souza PS**, Silva LF, Moellmann-Coelho A, Klumb CE, Maia RC. Variation of MDR proteins expression and activity levels according to

clinical status and evolution of CML patients. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011
May;80(3):158-66.