

Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

Gabriela Nestal de Moraes

"Avaliação de Survivina e XIAP e dos fatores de transcrição Foxo3a e FoxM1 como potenciais biomarcadores de quimiorresistência no câncer de mama"

Orientadora: Prof^a. Raquel Ciuvalschi Maia

Rio de Janeiro

Maio 2013



Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

Gabriela Nestal de Moraes

"Avaliação de Survivina e XIAP e dos fatores de transcrição Foxo3a e FoxM1 como potenciais biomarcadores de quimiorresistência no câncer de mama"

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Senso* do Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado em Oncologia.

Orientadora: Profa. Raquel Ciuvalschi Maia

Rio de Janeiro

Maio 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

M827

Moraes, Gabriela Nestal de.

Avaliação de survivina e XIAP e dos fatores de transcrição foxo 3a e fox M1 como potenciais biomarcadores de quimiorresistência no câncer de mama./ Gabriela Nestal de Moraes.- Rio De Janeiro, INCA, 2013.

xxv.; 171f.: il.

Tese (Doutorado em Oncologia)- Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Oncologia- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.

Orientador(a): Raquel Ciuvalschi Maia.

1. Neoplasias Mamárias. 2. Resistência a Medicamentos Antineoplásicos. 3. Survivina. 4. XIAP. 5. FOXO3A. 6. FOXM1. I. Maia, Raquel Ciuvalschi (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99449



Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

Gabriela Nestal de Moraes

"Avaliação de Survivina e XIAP e dos fatores de transcrição Foxo3a e FoxM1 como potenciais biomarcadores de quimiorresistência no câncer de mama"

Orientadora: Prof^a. Raquel Ciuvalschi Maia

Avaliada em: 28 de maio de 2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Gil Ferreira (INCA) - Presidente

Prof. Dr. Miguel Ângelo Moreira (INCA)

Prof^{a.} Dra. Luciana Barreto Chiarini (UFRJ)

Prof^{a.} **Dra.** Helena Lobo Borges (UFRJ)

Prof. Dra. Mirian Werneck (UFRJ) – Suplente

Prof. Dra. Tatiana Simão (UERJ) - Suplente

Rio de Janeiro

Maio 2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular – Programa de Hemato-Oncologia Molecular - Instituto Nacional de Câncer, sob a orientação da Doutora Raquel Maia. Contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ/APQ-1 e FAPERJ-PensaRio), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Swissbridge, CNPq, INCT para Controle do Câncer, Fundação do Câncer e Ministério da Saúde/INCA.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e chefe do Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular (LHOCM), Raquel Ciuvalschi Maia, por ter me recebido ainda como "estágio rotatório" em seu laboratório, lugar onde tenho o prazer de fazer parte há tantos anos, onde eu tive a oportunidade de aprender quase tudo que eu sei, desenvolver esse trabalho e amadurecer como pessoa e pesquisadora. Obrigada por acreditar e confiar em mim, pelo entusiasmo, respeito de sempre e incentivo em todas as etapas.

À minha colaboradora e grande amiga, Flavia da Cunha Vasconcelos, pelo auxílio com os experimentos de citometria de fluxo. Pessoalmente, agradeço pelo companheirismo nos momentos bons e ruins por que passei ao longo da minha caminhada acadêmica, por me proporcionar os momentos mais engraçados dentro e fora do laboratório e por se tornar uma pessoa tão importante na minha vida.

À Deborah Delbue, minha aluna de iniciação científica, por me ensinar a "nada fácil" arte de orientar. Agradeço imensamente por todo o empenho e dedicação em nossos trabalhos e pela ajuda nos experimentos com as linhagens celulares.

À Karina Lani Silva, por todos os ensinamentos desde que eu ingressei no laboratório, pela colaboração frutífera de longa data e por ter auxiliado no desenho e coleta de dados iniciais para o estudo com as amostras de pacientes.

À Roberta Faccion e Paloma Souza, por toda a amizade e companheirismo durante o decorrer desse trabalho e pelas discussões científicas e contribuições para o trabalho.

À Carolina Castro, pela confiança no meu trabalho, pelo carinho e pelos descontraídos almoços de todo dia.

À toda a equipe do laboratório do presente: Aline, AnaC, Carol, Claudete, Deborah, Elisângela, Felipe Roberto, Fernanda, Flavia, Flaviana, Jânio, Marcela, Marcos, Michelle, Paloma, Patrícia, Paula e Roberta, e também aos que passaram pelo lab ao longo do desenvolvimento da tese: Ana Cris, Aninha, Bárbara, Cristina, Dimenó, Karina, Giselle, Jolie, Luiz Felipe, Roberta 03, Renan, Victor e Viviane, agradeço por todos os momentos de descontração e por me fazerem levar o dia-a-dia de forma mais leve e divertida.

À AnaCris, Felipe Roberto e Elisângela, pelo auxílio técnico na organização e manutenção da infraestrutura do laboratório, fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. John Reed (Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA) por ter gentilmente cedido os plasmídeos pcDNA3-myc e pcDNA3-myc-survivina.

Ao Dr. João Viola e Dra. Giuliana Mognol (Programa de Biologia Celular), pela *expertise* em biologia molecular e auxílio com os experimentos envolvendo os plasmídeos e as transfecções em linhagens celulares.

À Dra. Cinthya Sternberg (Serviço de Pesquisa Clínica), pela colaboração no estudo e pela revisão crítica do manuscrito.

Ao Dr. André Mencalha, por ter cedido os plasmídeos pcDNA3 e pcDNA3-FoxM1, utilizados nos experimentos de superexpressão de FoxM1.

Aos membros da banca da qualificação do doutorado, realizada em maio de 2012, pelas inúmeras sugestões e por contribuíram para a construção do formato final da tese.

Aos membros da banca examinadora, por terem gentilmente aceitado o meu convite e por contribuírem para a minha formação acadêmica.

Aos membros da Secretaria da Pós-Graduação Daniele, Andreia e Rodrigo, por terem sido sempre tão solícitos diante das minhas necessidades enquanto aluna e pelos diversos "galhos" quebrados.

Ao Professor Robson Monteiro do Laboratório de Hemostases e Venenos da Universidade Federal do Rio de Janeiro por ter gentilmente nos cedido a linhagem MDA-MB-231, que foi utilizada nesse trabalho.

Apesar de a parte do estudo envolvendo as amostras de pacientes não ter sido inserida na tese, gostaria de agradecer a todas as pessoas com que eu pude conviver e estabelecer uma troca positiva ao longo do meu trabalho de tese e que puderam contribuir para um maior conhecimento da biologia do câncer de mama e para a minha formação:

- À Dra. Lídia Magalhães, patologista do estudo: por toda a competência e dedicação ao trabalho, desde a seleção dos casos e busca das lâminas e blocos, passando pela revisão do diagnóstico e a nova revisão para a realização do TMA, até a análise da imunohistoquímica.
- À Dra. Suzanne Crocamo (Núcleo de Pesquisa Clínica, Hospital do Câncer III), oncologista do projeto: pelas sugestões e direcionamento clínico do estudo.
- À Dra Ivanir, coordenadora do Departamento de Patologia (DIPAT), por ceder o anticorpo anti-Her2 para a técnica de imunohistoquímica.
- À Maria Theresa, Bianca e Thaíssa, funcionárias do DIPAT, pela realização dos recortes das lâminas para o estudo.
- Ao Dr. Eric Lam (Imperial College London), pela colaboração e por ceder os anticorpos para FoxM1 e Foxo3a para a imunohistoquímica.

- Por fim, mas não menos importante, à doutoranda Marcela Robaina, colaboradora do estudo, pelo auxílio com os experimentos de imunohistoquímica, com a interpretação dos dados e as análises estatísticas.

Ao meu marido e maior companheiro Alex, agradeço pelo apoio incondicional, por ter perdido tantos fins de semana para me fazer companhia no laboratório, por estar sempre torcendo pelo melhor e por vibrar com as minhas vitórias, por me fazer sempre seguir em frente e correr atrás dos meus sonhos, por ouvir por horas as minhas histórias de experimentos que dão certo e errado e por ser uma das poucas pessoas que realmente entende, se interessa e admira o que um biomédico é e o que ele se propõe a fazer.

À minha mãe e meu padrasto Nivaldo, obrigada pelo conforto, incentivo, pelas vibrações positivas, por compartilharem da minha vida pessoal e profissional, mesmo sem entender muito bem o que eu faço. E, principalmente, obrigada por terem sido responsáveis pelo que eu sou hoje.

A toda a minha família, tanto os "Moraes", quantos os "Nestal" e "Leitão", por compreenderem a minha ausência em diversos momentos e continuarem me dando força, torcendo por mim e vibrando com as minhas vitórias.

Aos meus amigos de sempre Emilia, Daniel, Simone, Leandro, Chuchu e Julião, por existirem na minha vida, pelos ouvidos cedidos, pelas gargalhadas, por fazerem de nossos encontros momentos de prazer, descontração e relaxamento e por me tornarem uma pessoa mais completa.

Aos meus amigos biomédicos Haynna e Chica por terem desmitificado a idéia de que na faculdade não se fazem amigos. Agradeço por todas as conversas e conselhos nos longos almoços de sexta-feira e por compartilharem comigo as aventuras e desventuras de ser um biomédico.

À minha crença em Deus, que me permite andar pelo caminho correto e ganhar forças para seguir em frente, sempre que necessário.

Ao suporte financeiro da CAPES, FINEP, FAPERJ-APQ1, FAPERJ-PensaRio, CNPq, Fundação Swissbridge, Fundação do Câncer e Ministério da Saúde/INCA.

"Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota." - Madre Teresa de Calcutá -



Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

"Avaliação de Survivina e XIAP e dos fatores de transcrição Foxo3a e FoxM1 como potenciais biomarcadores de quimiorresistência no câncer de mama"

RESUMO

Gabriela Nestal de Moraes

O câncer de mama é a neoplasia que apresenta maior mortalidade entre as mulheres ao redor do mundo, apesar dos avanços na descoberta de novas modalidades terapêuticas e marcadores prognósticos. A resistência ao tratamento quimioterápico é uma das principais causas de falha terapêutica, apontando para a necessidade da identificação de biomarcadores preditivos de resposta. Evidências científicas mostram que a superexpressão de FoxM1 e das proteínas antiapoptóticas Survivina e XIAP, bem como a inativação do fator de transcrição Foxo3a, estão associados a quimioresistência e a um prognóstico desfavorável no câncer de mama. Dessa forma, o objetivo desse estudo é avaliar o papel das proteínas Survivina, XIAP. Foxo3a e FoxM1 como potenciais fatores de resistência à doxorrubicina (doxo), quimioterápico amplamente empregado no tratamento no câncer de mama. Nossos dados mostram que a doxo foi capaz de inibir a viabilidade celular nas linhagens celulares derivadas de carcinoma de mama MCF7 (não-invasiva, positiva para receptores de estrogênio e Her2) e MDA-MB-231 (invasiva, triplo-negativa), como avaliado pelo ensaio de MTT. A droga induziu a perda da adesão celular e fragmentação do DNA, como observado pela análise morfológica com quantificação das células não-aderidas e avaliação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. A análise da ativação das caspases-3, -7 e -9 por Western blotting revelou que a doxo induziu apoptose em células com diferentes status de p53. Em paralelo, o tratamento com a doxo resultou na redução dos níveis proteicos e de RNAm de XIAP e Survivina, como avaliado por Western blotting e PCR em tempo real, respectivamente. Entretanto, a indução da superexpressão da Survivina, por transfecção plasmidial, não foi capaz de conferir resistência ao quimioterápico. Corroborando esses resultados, observamos que o silenciamento gênico por siRNA de XIAP e Survivina, isoladamente ou em combinação, não sensibilizou as células à morte celular induzida pela doxo, indicando que tais proteínas não desempenham papel na resistência à droga. Contrariando dados da literatura, a doxo foi capaz de induzir a fosforilação de Foxo3a e Akt e reduzir a expressão de seu alvo transcricional Bim e dos níveis de RNAm de FOXO3A. De maneira consistente, a droga promoveu a translocação de Foxo3a do núcleo para o citoplasma, como examinado por fracionamento subcelular, apontando para a inativação da sua função. Além disso, a expressão do fator de transcrição FoxM1 foi reduzida, mediante o estímulo apoptótico induzido pela doxo. A indução da superexpressão de FoxM1 foi capaz de reverter a sensibilidade das células MDA-MB-231 à doxo, processo que envolveu a indução dos níveis de Survivina e XIAP. O mesmo efeito não foi observado nas células MCF7 superexpressando FoxM1, uma vez que se mantiveram sensíveis ao quimioterápico e apresentaram inalterados níveis de Survivina e XIAP. O conjunto dos nossos dados indica que a via de sinalização oncogênica mediada pelo fator de transcrição FoxM1 é capaz de promover a resistência à doxo e sugere que a combinação clínica de inibidores de FoxM1 com a doxo tem o potencial de sobrepujar a quimiorresistência no câncer de mama, principalmente em tumores triplo-negativos.

Palavras-chave: Câncer de mama; quimiorresistência; Survivina; XIAP; Foxo3a; FoxM1



Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

"Evaluation of Survivin and XIAP antiapoptotic proteins and Foxo3a e FoxM1 transcription factors as potential biomarkers for chemoresistance in breast cancer"

ABSTRACT

Gabriela Nestal de Moraes

Breast cancer is the leading cause of deaths in women around the world, despite recent advances regarding novel therapeutic options and identification of prognostic factors. Resistance to therapy is the main cause of treatment failure and still there is no predictive biomarker for response to systemic therapy available. Increasing evidence shows that Survivin and XIAP antiapoptotic proteins and FoxM1 overexpression, as well as the inactivation of Foxo3a transcription factor, are closely associated with chemoresistance and poor prognosis in breast cancer. Thus, this study aimed to investigate Survivin, XIAP, Foxo3a and FoxM1 potential role on resistance to doxorubicin (dox), a chemotherapeutic agent widely used to treat breast cancer. Our data demonstrates that dox inhibited cell viability in the breast cancer derived cell lines MCF7 (non-invasive, Her2 and estrogen receptor positive) and MDA-MB-231 (invasive, triple-negative), as evaluated through the MTT assay. The drug induced loss of cell adhesion and DNA fragmentation, as examined by morphological analysis followed by quantification of non-adherent cells and flow cytometry DNA content analysis. Western blotting evaluation of caspases-3, -7 and -9 activation revealed that dox induced apoptosis in cells with different p53 activation status. In parallel, exposure to dox resulted in reduction in Survivin and XIAP protein and mRNA levels, as evaluated by Western blotting and real time PCR, respectively. However, when we transfected cells with a Survivin-encoding plasmid, we did not observe a cell death-resistant phenotype. Accordingly, XIAP and Survivin silencing through siRNA, individually or in combination, had little effect on breast cancer cells sensitivity towards dox, suggesting that the drug can induce apoptosis independently of their expression. Contrasting data in the literature, dox treatment induced Foxo3a and Akt phosphorylation and reduced the expression of its transcriptional target Bim and FOXO3A mRNA levels. In agreement, dox-exposed cells displayed Foxo3a expression in cytoplasm, differently from predominantly nuclear Foxo3a observed in untreated cells, as examined through subcellular localization. These data point to dox-induced Foxo3a inactivation in breast cancer cells. In addition, we observed that FoxM1 transcription factor expression was inhibited upon dox-mediated apoptotic stimuli. Importantly, FoxM1 overexpression could counteract apoptosis in MDA-MB-231 cells, along with induction of Survivin and XIAP expression. This effect was not observed in MCF7 cells, which remained similarly sensitive to dox and displayed Survivin and XIAP levels unaltered. Altogether, our results demonstrate that FoxM1 signaling pathway can promote dox resistance and suggest that combining FoxM1 inhibitors with dox has the potential to circumvent chemoresistance in breast cancer, specially in triple negative tumors.

Keywords: Breast cancer; chemoresistance; Survivin; XIAP; Foxo3a; FoxM1

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ABC Cassette ligador de ATP

AIF Fator indutor de apoptose

APAF1 Protease apoptótica ativadora do fator1

APC Complexo promotor da anáfase

APS Persulfato de amônio

ATCC American Type Culture Collection

ATP Adenosina -5'-trifosfato

BAK Matador/ antagonista de Bcl-2

BAX Proteína X ligada à Bcl-2

BCL-2 Proteína de linfoma de células B-2

BCL-XL Proteína do linfoma de células B extra grandes

BCRP Proteína de resistência do câncer de mama

BIR Baculoviral IAP repeat

BIRC Proteína contendo BIR

BRCA1 Gene de suscetibilidade ao câncer de mama1

BRUCE Enzima conjugada à ubiquitina contendo BIR

BSA Albumina sérica bovina

CARD Domínio de ativação e recrutamento de caspases

CDI Carcinoma ductal infiltrante

CDK Quinase dependente de ciclina

c-DNA DNA complementar

CENP Proteína associada ao centrômero

C-IAP1 Proteína celular inibidora da apoptose

CPC Chromossomal passenger complex

DBD Sítio de ligação ao DNA

DED Domínio efetor de morte

DIABLO Proteína de ligação direta à IAP com baixo PI (*Direct IAP binding with low PI*)

DIPAT Departamento de Patologia do INCA

DISC Complexo indutor de sinalização de morte

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido desoxirribonucléico

DOXO Doxorrubicina

DR Receptor de morte

ER Receptor de estrogênio

ERα Receptor de estrogênio α

FADD Domínio de morte associado a Fas

GADD45 Growth arrest and DNA-damage inducible

HBXIP Proteína de hepatite B ligada a X

HER2 Receptor de fator de crescimento epidermal humano 2

IAP Proteína inibidora da apoptose

IBM Motivo de ligação às IAPs

IKK Quinase IKB

INCA Instituto Nacional de Câncer

INCENP Proteína interna do centrômero

KDA Quilodáltons

LRR Repetições ricas em leucina

LHOCM Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular

MAPK Proteína quinase ativada por mitógenos

MCAK Cinesina associada ao centrômero mitótico

MCL-1 Proteína de leucemia de células mielóides-1

MDM2 Murine double minute 2

MEK MAP quinase quinase

MIN Minutos

ML-IAP IAP de melanoma

MnSOD Superóxido dismutase

MRP Proteína relacionada à multiresistência

MTT 3-(4,5-di-metiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio brometo

NAIP Proteína inibidora da apoptose neuronal

NES Sequência de exportação nuclear

NFkB Fator nuclear de cadeia leve kappa de células B ativadas

NLS Sequência de localização nuclear

NOD Domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo

PBS Solução salina de fosfato

PCR Reação de cadeia da polimerase

PGP Glicoproteína P

PI Iodeto de propídio

PI3K Fosfatidilinositol 3-quinase

PLK1 Polo-like kinase 1

PP2A Proteína fosfatase 2A

PR Receptor de progesterona

RAF Fibrosarcoma rapidamente acelerado

RB Retinoblastoma

RING Really interesting new gene

RNA Ácido ribonucleico

RNAi RNA de interferência

RNAm RNA mensageiro

SDS Dodecil sulfato de sódio

SFB Soro fetal bovino SG Sobrevida global

SGK Quinase regulada por glicocorticóide e soro

SKP2 Proteína associada à quinase de fase S 2

SLP Sobrevida livre de progressão

SMAC Segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria (Second mithocondrial-

derived activator of caspases)

STR Pequenas repetições em tandem (Short tandem repeats)

TAE Tris-acetato-EDTA

TEMED Tetrametiletilenodiamina

TBS Solução salina de Tris

TNF α Fator de necrose tumoral α

TOPO II Topoisomerase-II

TRADD Domínio de morte associado ao receptor TNF

TRAIL Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

TS-IAP IAP específica de testículo

UBC Conjugação à ubiquitina

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

XAF1 Fator associado à XIAP 1

XIAP IAP ligada ao cromossomo X

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura molecular da doxorrubicina.	4
Figura 1.2: Mecanismos de resistência às drogas no câncer de mama.	5
Figura 1.3: Estrutura básica das caspases envolvidas na apoptose em	8
mamíferos.	
Figura 1.4: Esquema das vias intrínseca e extrínseca de indução de apoptose.	9
Figura 1.5: Representação esquemática das proteínas da família das IAPs em	12
humanos.	
Figura 1.6: Modelo para a função da XIAP na inibição da apoptose.	15
Figura 1.7: Modelo para a função da Survivina na mitose.	19
Figura 1.8: Modelo para a função da Survivina no regulação da apoptose.	21
Figura 1.9: Estrutura dos fatores de transcrição Foxo.	24
Figura 1.10: Figura esquemática dos mecanismos envolvendo a ativação e a	27
degradação dos fatores de transcrição Foxo3a.	
Figura 1.11: Representação esquemática das vias de sinalização que regulam	29
FoxM1.	
Figura 1.12: Diagrama das interações entre as proteínas associadas à	32
resistência ou sensibilidade a agentes quimioterápicos no câncer de mama.	
Figura 3.1: Perfil de expressão de p53, procaspase-3, XIAP, Survivina,	39
Foxo3a e FoxM1 das linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231.	
Figura 3.2: Detecção de contaminação das linhagens celulares MCF7 e MDA-	42
MB-231 por micoplasma por PCR semi-quantitativo.	
Figura 3.3: Figura esquemática do tratamento das linhagens celulares MCF7	43
e MDA-MB-231 com a doxo.	5.0
Figura 3.4: Esquema da transfecção das linhagens celulares MCF7 e MDA- MB-231 com os vetores plasmidiais e posterior exposição à doxo.	50
Figura 3.5: Esquema da transfecção da linhagem celular MCF7 com o siRNA	52
rigara 5.5. Esquema da transfecção da minagem central Mer / com o situa	32

controle (scramble), siRNA para XIAP e/ou siRNA para Survivina e	
posterior exposição à doxo.	
Figura 4.1: Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo.	53
Figura 5.1: Perfil de sensibilidade das células MCF7 e MDA-MB-231 ao	55
tratamento com concentrações crescentes da doxorrubicina (doxo) por 24, 48	
e 72h, analisado através do ensaio de MTT.	
Figura 5.2: Perfil de indução de morte celular pela doxorrubicina (doxo) nas	56
células MCF7 e MDA-MB-231 através da análise da população em sub-	
G0/G1, por citometria de fluxo.	
Figura 5.3: Análise morfológica e quantitativa da indução de morte celular	58
após o tratamento das células MCF7 e MDA-MB-231 com concentrações	
crescentes de doxo por 24h.	
Figura 5.4: Indução de apoptose pela doxorrubicina (doxo) através da	59
avaliação dos níveis de procaspases nas células MCF7 e MDA-MB-231, por	
Western blotting.	
Figura 5.5: Estabilização da proteína p53 nas células MCF7 por citometria	60
de fluxo	
Figura 5.6: Expressão da proteína p53 nas células MCF7 e nas células MDA-	61
MB-231, por Western blotting.	
Figura 5.7: Perfil de expressão da Survivina nas células MCF7 e MDA-MB-	62
231, por Western blotting.	
Figura 5.8: Perfil de expressão dos níveis de RNAm da SURVIVINA, por	63
PCR em tempo real.	
Figura 5.9: Perfil de expressão da XIAP nas células MCF7 e MDA-MB-231,	64
por Western blotting.	
Figura 5.10: Perfil de expressão dos níveis de RNAm da XIAP, por PCR em	64
tempo real.	

Figura 5.11: Eficiência de transfecção das células MCF7 e MDA-MB-231	65
através da incorporação do vetor fluorescente pLIRES-EGFP, por	
Lipofectamina2000.	
Figure 5.12: Efeito da indução da superexpressão da Survivina na	68
sensibilidade das células MCF7 à doxorrubicina (doxo).	
Figure 5.13: Efeito da indução da superexpressão da Survivina na	69
sensibilidade das células MDA-MB-231 à doxorrubicina (doxo).	
Figure 5.14: Efeito do silenciamento da expressão da XIAP e/ou Survivina na	70
sobre a morte celular.	
Figure 5.15: Efeito do silenciamento da expressão da XIAP e/ou Survivina na	72
sensibilidade das células MCF7 à doxorrubicina (doxo).	
Figura 5.16: Níveis de Foxo3a total e fosforilada nas células MCF7 e MDA-	73
MB-231, por Western blotting.	
Figura 5.17: Níveis de Akt fosforilada nas células MCF7 e MDA-MB-231, por	74
Western blotting.	
Figura 5.18: Níveis de RNAm da FOXO3A, por PCR em tempo real.	75
Figura 5.19: Expressão de Bim nas células MCF7 e MDA-MB-231, por	76
Western blotting.	
Figura 5.20: Níveis de Foxo3a total e fosforilada e de Bim nas células MCF7,	77
por Western blotting.	
Figura 5.21: Expressão de Foxo3a total nas frações subcelulares antes e após	79
o tratamento com a doxorrubicina (doxo), por Western blotting.	
Figura 5.22: Perfil de expressão de FoxM1 nas células MCF7 e MDA-MB-	80
231, por Western blotting.	
Figura 5.23: Efeito da indução da superexpressão de FoxM1 na sensibilidade	81
de células MCF7 à doxorrubicina (doxo).	
Figura 5.24: Efeito da indução da superexpressão de FoxM1 na sensibilidade	83
de células MDA-MB-231 à doxorrubicina (doxo).	

Figura 5.25: Efeito da indução da superexpressão de FoxM1 na regulação de	84
Survivina e XIAP.	
Figure 6.1: Mecanismos desencadeados pelo tratamento com a doxorrubicina	96
(doxo) nas células MCF7 e MDA-MB-231.	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições dos experimentos realizados com as linhagens	38
celulares.	
Tabela 2: Perfil de polimorfismos STR das linhagens celulares MCF7 e	41
MDA-MB-231.	
Tabela 3: Painel de anticorpos primários utilizados na técnica de Western	46
blotting.	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer de Mama	1
1.1.1 Caracterização do problema	1
1.1.2 Tratamento	2
1.1.3 Quimioterápico doxorrubicina	3
1.2 Apoptose	ϵ
1.2.1 Caspases	7
1.2.2 Via extrínseca ou via ativada por receptores de morte	10
1.2.3 Via intrínseca ou via mitocondrial	10
1.3 Proteínas inibidoras da apoptose	11
1.3.1 XIAP	14
1.3.1.1 XIAP em Câncer de Mama	16
1.3.2 Survivina	17
1.3.2.1 Survivina em Câncer de Mama	21
1.4 Fatores de transcrição forkhead Box (Fox)	23
1.4.1 Fator de transcrição Foxo3a	24
1.4.1.1 Foxo3a em Câncer de Mama	25
1.4.2 Fator de transcrição FoxM1	28
1.4.2.1 FoxM1 em Câncer de Mama	30
1.5 Resistência multifatorial – Interação entre as moléculas	32
1.6 Justificativa para o estudo	35
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38

	xxiii
3.1 Cultura de células	38
3.2 Genotipagem das linhagens celulares	40
3.3 Detecção de micoplasma por PCR semi-quantitativo	40
3.4 Tratamento com a doxorrubicina (doxo)	42
3.5 Ensaio de MTT: avaliação da citotoxicidade induzida pela doxo	42
3.6 Análise morfológica da perda da adesão celular induzida pela doxo	44
3.7 Avaliação da fragmentação do DNA induzida pelo doxo, por citometria de fluxo	44
3.8 Marcação da proteína p53 por citometria de fluxo	45
3.9 Detecção da ativação de caspases por Western blotting	46
3.10 Detecção da expressão das proteínas por Western blotting	47
3.11 Análise da expressão gênica por PCRem tempo real	48
3.12 Fracionamento subcelular	49
3.13 Vetores plasmidiais	49
3.14 Transfecção plasmidial	50
3.15 Silenciamento gênico da XIAP e da Survivina por interferência de	51
RNA (RNAi)	
3.16 Análises Estatísticas	52
4. DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO	53
5. RESULTADOS	54
5.1 A doxo inibe a viabilidade celular nas linhagens MCF7 e MDA-MB- 231	54
5.2 A doxo induz fragmentação do DNA nas linhagens MCF-7 e MDA-MB- 231	55
5.3 A doxo induz alterações morfológicas nas linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231	57
5.4 A doxo induz apoptose nas linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231	57
5.5 A apoptose induzida pela doxo ocorre em células com diferentes status	59

de p53	
5.6 O tratamento das células MCF7 e MDA-MB-231 com a doxo resulta	61
na diminuição nos níveis da Survivina	
5.7 A doxo reduz os níveis de RNAm da Survivina nas células MCF7 e	62
MDA-MB-231	
5.8 A exposição das células MCF7 e MDA-MB-231 à doxo reduz os níveis	63
protéicos e de RNAm da XIAP	
5.9 A indução da superexpressão da Survivina nas células MCF7 e MDA-	65
MB-231 não confere resistência ao tratamento com a doxo	
5.10 O silenciamento da expressão da XIAP e da Survivina induz o	67
aumento da morte espontânea nas células MCF7	
5.11 A inibição simultânea da expressão da XIAP e da Survivina não	70
sensibiliza as células MCF7 à apoptose induzida pela doxo	
5.12 O tratamento com a doxo induz aumento nos níveis de expressão e de	71
fosforilação de Foxo3a nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231.	
5.13 O tratamento com a doxo induz aumento nos níveis de fosforilação	73
de Akt nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231	
5.14 O tratamento das células MCF7 e MDA-MB-231 com a doxo resulta	74
na redução dos níveis de RNAm de FOXO3A	
5.15 A doxo induz diminuição nos níveis da proteína proapoptótica Bim,	75
alvo transcricional de Foxo3a, nas células MCF7 e MDA-MB-231	
5.16 O aumento nos níveis de fosforilação da Foxo3a e redução nos níveis	76
de Bim podem ser observados até 72h de exposição à doxo	
5.17 O tratamento com a doxo reduz a expressão de Foxo3a no núcleo e	77
aumenta no citoplasma	
5.18 O tratamento com a doxo reduz a expressão do fator de transcrição	78
FoxM1 nas células MCF7 e MDA-MB-231	
5.19 A indução da superexpressão de FoxM1 confere resistência ao	80
tratamento com a doxo nas células MDA-MB-231, mas não na MCF7	
5.20 A indução da superexpressão de FoxM1 aumenta os níveis de	82
Survivina e XIAP nas células MDA-MB-231, mas não na MCF7	

	XXV
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÕES	97
8. PERSPECTIVAS	98
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
10. ANEXOS	119
10.1 Trabalhos científicos publicados, não relacionados à tese de doutorado	119
10.1.1 Survivin overexpression correlates with an apoptosis-resistant phenotype in chronic myeloid leukemia cells.	119
10.1.2 P-glycoprotein and survivin simultaneously regulate vincristine-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells.	119
10.1.3 The interface between BCR-ABL dependent and independent resistance signaling pathways in chronic myeloid leukemia.	120
10.2 Trabalhos científicos submetidos para publicação, não relacionados à tese de doutorado	120
10.2.1 XIAP and P-glycoprotein co-expression is related to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia.	120
10.2.2 Phosphorylated Crkl (pCrkl) levels in association with P-glycoprotein (Pgp) activity identifies imatinib sensitive chronic myeloid leukemia patients samples.	120
10.3 Trabalho científico publicado, relacionado à tese de doutorado	120
10.3.1 Immunodetection of caspase-3 by Western blot using glutaraldehyde.	
10.4 Trabalho científico submetido para publicação, relacionado à tese de doutorado	124

 ${\bf 10.4.1\ Doxorubic in\ duces\ cell\ death\ in\ breast\ cancer\ cells\ regardless}$

of Survivin and XIAP expression levels.

124

1.INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama

1.1.1 Caracterização do problema

No Brasil, o câncer de mama é o tipo de neoplasia com maior mortalidade e que apresenta a maior incidência entre mulheres, ficando atrás apenas dos tumores de pele não melanoma. De acordo com as estatísticas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que aproximadamente 52.680 mulheres foram acometidas por essa doença no ano de 2012. Para o estado do Rio de Janeiro, foram estimados 8.140 novos casos nesse mesmo período (Fonte: Ministério da Saúde, Estimativas 2012-2013: Incidência de Câncer no Brasil, 2011).

O câncer de mama é uma doença altamente heterogênea, no que diz respeito aos padrões de expressão gênica interindividuais (PEROU et al., 2000; CURTIS et al., 2012) e se desenvolve a partir de uma série de alterações genéticas que afetam oncogenes e genes supressores de tumor. Dentre os exemplos de genes supressores tumorais, cujas mutações são freqüentes e parecem desempenhar um papel importante no início e na progressão do câncer de mama, incluem-se o RB (retinoblastoma), BRCA1 (gene de suscetibilidade ao câncer de mama 1), BRCA2 (gene de suscetibilidade ao câncer de mama 2) e TP53 (HWANG-VERSLUES et al., 2008). Aproximadamente 30% dos casos de câncer de mama apresentam a mutação no gene TP53, associada a um prognóstico desfavorável, além do fato de que polimorfismos nesse gene aumentam o risco de desenvolvimento da doença (BORRESEN-DALE, 2003).

O prognóstico do câncer de mama é considerado relativamente bom quando diagnosticado no início da doença. Entretanto, no Brasil, cerca de 60% dos casos são

diagnosticados em estágio avançado, diminuindo razoavelmente as chances de cura (Ministério da Saúde). Os fatores prognósticos utilizados clinicamente para o carcinoma de mama permanecem como as tradicionais características histopatológicas de grau histológico, além do tamanho do tumor, acometimento de linfonodos axilares, idade inferior a 35 anos e presença de invasão linfovascular (ELSTON & ELLIS, 2002; LOONING, 2007). Além disso, a avaliação de expressão de receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR) e do receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (Her2) são marcadores úteis para decisões terapêuticas, uma vez que são preditivos de resposta à terapia hormonal adjuvante (tamoxifeno: inibidor de ER e PR) (FITZGIBBONS *et al.*, 2000) e a terapia-alvo com o transtuzumabe (anticorpo monoclonal que inibe Her2) (WOLFF *et al.*, 2007), respectivamente.

1.1.2 Tratamento

As modalidades terapêuticas para o câncer de mama incluem a cirurgia e a radioterapia para tratamento loco-regional e a quimioterapia, hormonioterapia e terapia-alvo para tratamento sistêmico. A definição das melhores opções terapêuticas depende das características biológicas do tumor, que incluem: a extensão de envolvimento dos linfonodos axilares, tipo histológico, idade da paciente, presença de receptores hormonais e de Her2 e o envolvimento dos espaços microvasculares (LONNING, 2007; CHARGARI *et al.*, 2009; MORENO-ASPITIA & PEREZ, 2009).

Atualmente, o esquema quimioterápico utilizado é baseado em regimes contendo antraciclinas (doxorrubicina) associadas aos taxanos (AT) ou à ciclofosfamida e fluorouracil (FAC e AC) (BURNELL *et al.*, 2010). No INCA, o esquema de quimioterapia proposto

também tem como referência protocolos baseados em taxanos e na doxorrubicina (CONDUTAS DO INCA/MS, 2001).

1.1.2 Quimioterápico doxorrubicina

A doxorrubicina (doxo) ou adriamicina é uma droga pertencente à família dos antibióticos antraciclinas, que são utilizadas no tratamento de tumores sólidos e hematológicos há mais de 40 anos (Figura 1.1). O principal mecanismo de ação da doxo é a intercalação ao DNA e inibição da atividade de religação da enzima topoisomerase II (topo II), que acabam interferindo com a síntese de DNA (GEWIRTZ, 1999; LOTHSTEIN et al., 2001). O dano ao DNA causado pela doxo pode levar à ativação da p53 – conhecido gene supressor tumoral e sensor de estresse intracelular e dano ao DNA (ZILFOU & LOWE, 2009) - com consequente superexpressão de p21 waf1/cip1, proteína inibidora de CDKs (quinases dependentes de ciclinas) (GEWIRTZ et al., 2000). Esse evento culmina com a inibição da síntese de DNA, uma vez que as ciclinas e CDKs formam um complexo que desempenha um papel central na regulação da progressão do ciclo celular (DE FALCO & DE LUCA, 2010). A citotoxicidade causada pela doxorrubicina também provém de sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (MIZUTANI et al., 2005), uma vez que sua estrutura quinona permite que essa droga funcione como uma aceptora de elétrons em reações de oxi-redução (GEWIRTZ, 1999). As espécies reativas de oxigênio também são capazes de ativar p53, que diretamente induz a ativação de Bax, mostrando que ambas as vias podem estar conectadas. (KALYANARAMAN et al., 2002).

Figura 1.1: Estrutura molecular da doxorrubicina.

Apesar da introdução da combinação de terapias mais específicas, como os inibidores de receptores hormonais e os anticorpos monoclonais, com a quimioterapia convencional, ter demonstrado maior eficácia no tratamento do câncer de mama, uma parcela de pacientes apresenta falha no tratamento. Essa falha pode estar associada aos mecanismos de resistência adquiridos após o início da terapia ou intrínsecos à própria célula tumoral. Vários mecanismos têm sido implicados na resistência ao tratamento quimioterápico do câncer de mama (Figura 1.2). Dentre eles destacam-se: i) a superexpressão de bombas de efluxo da família dos transportadores ABC (ATP-binding cassette) (WIND & HOLEN, 2011); ii) mutação do gene p53 (KNAPPSKOG & LONNING, 2012); iii) alterações no processo de reparo do DNA (DHILLON et al., 2011); iv) alterações em moléculas-alvo de quimioterápicos, como a topo II (KONECNY et al., 2010); v) mudanças na expressão de proteínas da família Bcl-2 (COLEY, 2008); vi) alterações na expressão das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) (FOSTER et al., 2009); e vii) desregulação dos fatores de transcrição da família forkhead box (Fox) (WILSON et al, 2011).

A resistência a apoptose está intimamente relacionada à quimioresistência, uma vez que a apoptose é capaz de mediar os efeitos induzidos pelos agentes quimioterápicos em células tumorais (CALL *et al.*, 2008). Defeitos nas vias de sinalização apoptóticas foram

detectados em diversos tipos de tumores, conferindo às células tumorais uma vantagem de sobrevivência (JOHNSTONE *et al.*, 2002).

O presente estudo tem como foco principal as alterações na expressão das IAPs – Survivina e XIAP - e nos fatores de transcrição Fox – Foxo3a e FoxM1 - como potenciais moléculas envolvidas na resistência à apoptose mediada pela doxo em câncer de mama.

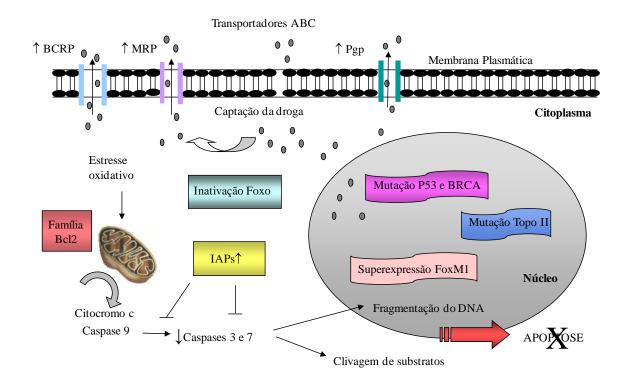


Figura 1.2: Mecanismos de resistência às drogas no câncer de mama. Agentes citotóxicos atravessam a membrana plasmática de células tumorais por difusão e tem seus efeitos citotóxicos reduzidos devido a alguns mecanismos de resistência. As bombas de efluxo BCRP (Proteína de resistência do câncer de mama), MRP (Proteína relacionada à multirresistência) e Pgp (Glicoproteína-P) podem transportá-los ativamente para o meio extracelular, diminuindo sua concentração intracelular. Outros fenótipos de quimioresistência correspondem a alterações nos alvos de drogas, como a topo II e mutações em proteínas envolvidas com o reparo e ativação dos pontos de checagem do ciclo celular, como BRCA e p53. Além disso, a ativação da apoptose pode ser bloqueada por um balanço desfavorável de expressão de membros da família Bcl-2, bem como pela superexpressão das IAPs e FoxM1 e inativação dos fatores de transcrição Foxo. BRCA: gene de suscetibilidade ao câncer de mama; Foxo: forkhead box O; FoxM1: forkhead box M1; Topo II: topoisomerase II.

1.2 Apoptose

A apoptose foi definida pela primeira vez em 1972 (KERR et al) como um fenômeno programado, iniciado por diversos estímulos, tanto patológicos quanto fisiológicos, e que tem como evento final a eliminação de células. Na ocasião, postulou-se que esse fenômeno estaria envolvido com a atrofia e involução de alguns tecidos e com a renovação de células em tecidos normais adultos (KERR et al., 1972), demonstrando sua função no desenvolvimento e na manutenção da homeostase tecidual através da eliminação de células alteradas, senescentes ou desnecessárias (MONDELLO & SCOVASSI, 2010). Apenas em 1999, foi descrito o controle genético da apoptose, a partir da investigação do desenvolvimento do nematodo *Caenorhabditis elegans* (HORVITZ, 1999). Esse trabalho mostrou que a apoptose envolve proteínas e genes específicos e que corresponde a um processo biologicamente ativo e conservado evolutivamente. De 1972 até os dias de hoje, os mecanismos envolvidos com a regulação da apoptose, bem como os processos bioquímicos e aspectos morfológicos observados têm sido elucidados (BURZ et al., 2009).

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada por uma série de alterações, como a fragmentação nuclear, condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e retração celular (GRIVICICH *et al.*, 2007; VERMEULEN *et al.*, 2005). Essas mudanças morfológicas diferem bastante da necrose, tipo de morte celular cujas características morfológicas são a dilatação das organelas citoplasmáticas e o rompimento da membrana plasmática, com perda das estruturas celulares e geração de respostas inflamatórias (GOLSTEIN & KROEMER, 2006). As características morfológicas observadas durante o processo apoptótico resultam de uma cascata complexa de eventos bioquímicos, que converge com a ativação de caspases (NUÑEZ *et al.*, 1998).

1.2.1 Caspases

As caspases agrupam uma família de cisteína-proteases que clivam proteínas celulares, através de um reconhecimento específico de uma seqüência tetrapeptídica em seu substrato, adjacente a um resíduo de ácido aspártico (DEMON *et al.*, 2009). Elas são sintetizadas sob a forma de zimogênios inativos (procaspases), mas podem ser ativadas por clivagem autoproteolítica ou por clivagem mediada por outras caspases (NUÑEZ *et al.*, 1998). Dentre os 14 membros da família já descritos, apenas 7 caspases então envolvidas no processo apoptótico: 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10. As caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14 participam de outros processos importantes como a diferenciação celular, a maturação de citocinas, a motilidade celular e o controle da proliferação e do ciclo celular (LAMKANFI *et al.*, 2007). As caspases 4 e 12 também estão indiretamente envolvidas com a apoptose, visto que são ativadas mediante indução de estresse de retículo endoplasmático, culminando com a regulação de caspases associadas à via canônica apoptótica (DI FAZIO *et al.*, 2012). As caspases relacionadas à indução de apoptose podem ser divididas em dois grupos, baseados no tamanho de seu domínio e na especificidade de substratos (VERMEULEN *et al.*, 2005) (Figura 1.3).

As caspases -2, -8, -9 e -10 são iniciadoras porque utilizam seus domínios N-terminais longos para interagir com as moléculas adaptadoras. As caspases -3, -6 e -7 são efetoras porque dependem da ativação por proteólise mediada pelas caspases iniciadoras, para que possam clivar seus substratos celulares (VERMEULEN *et al.*, 2005). Os substratos de caspases englobam uma variedade enorme de proteínas, principalmente com funções regulatórias e estruturais no núcleo, citoplasma e citoesqueleto, cuja clivagem leva à desmontagem da célula (FISCHER *et al.*, 2003). A expressão das caspases pode ser encontrada em níveis menores em células tumorais, quando comparada aos tecidos normais

adjacentes ao tumor (PHILCHENKOV *et al.*, 2004), mostrando que a deficiência em efetores da maquinaria apoptótica está associada ao desenvolvimento do câncer. A família das caspases apresenta uma freqüência razoável de mutações em seus genes em diferentes tipos de câncer (GHAVAMI *et al.*, 2009). No câncer de mama, foi mostrado que 75% das amostras estudadas não apresentavam a expressão da proteína, nem do transcrito da caspase-3, o que sugere que isso possa representar uma maneira de a célula tumoral evadir a apoptose (DEVARAJAN *et al.*, 2002).

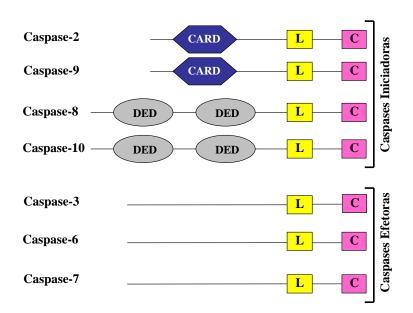


Figura 1.3: Estrutura básica das caspases envolvidas na apoptose em mamíferos. Baseado em suas funções e estruturas, as caspases podem ser divididas em dois grupos: caspases iniciadoras e caspases efetoras. A ativação das caspases iniciadoras depende de motivos conservados localizados próximos ao seu domínio longo. Os domínios CARD, presente nas caspases-2 e -9 e o domínio DED, presente nas caspases-8 e -10 medeiam a interação homofílica com as proteínas adaptadoras correspondentes: APAF e FADD, respectivamente. A atividade das caspases efetoras depende da ativação proteolítica mediada pelas caspases iniciadoras. L: domínio longo; C: domínio curto; CARD: domínio de ativação e recrutamento de caspases; DED: domínio efetor de morte; APAF1: protease apoptótica ativadora do fator1; FADD: domínio de morte associado a Fas. Adaptado de TESTA & RICCIONI, 2007.

A apoptose é iniciada quando as células recebem um estímulo externo, como uma sinalização extracelular (exemplo.: citocinas) ou interno, como a privação de fatores de

crescimento, dano ao DNA, estresse oxidativo, luz ultravioleta e tratamento com agentes quimioterápicos (OKADA & MAK, 2004; KIM *et al.*, 2006b). Dessa forma, a ativação da apoptose pode ser mediada tanto por uma via extrínseca – via mediada por receptor de morte – ou por uma via intrínseca – via mitocondrial (KIM, 2005) (Figura 1.4).

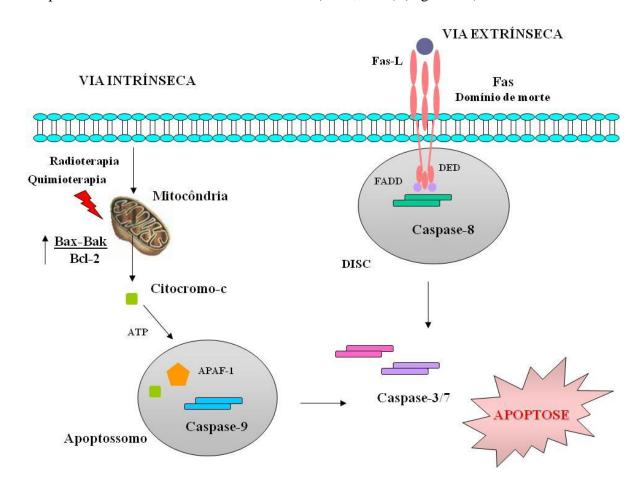


Figura 1.4: Esquema das vias intrínseca e extrínseca de indução de apoptose. A via intrínseca de morte celular é iniciada por estímulos como irradiação, tratamento com agentes quimioterápicos, dano ao DNA e privação de fatores de crescimento. Subsequentemente, a ativação dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, como Bax e Bak neutraliza as proteínas antiapoptóticas da família, levando à alteração do potencial de membrana mitocondrial e à liberação do citocromo-c da mitocôndria. No citosol, o citocromo-c forma um complexo denominado apoptossomo com a APAF-1 e a procaspase-9, levando à ativação da caspase-9 e, por fim, das caspases-3 e -7. A via extrínseca é disparada quando ocorre interação entre o ligante e seus receptores de morte, exemplificados pelo Fas. A ativação do DED leva ao recrutamento da FADD e procaspase-8, resultando na ativação da caspase-8 e, posteriormente, das caspases-3 e -7. A ativação das caspases efetoras -3 e -7 pela via intrínseca e pela via extrínseca é o evento final da cascata de sinalização que culmina com a indução da apoptose. APAF: protease apoptótica ativadora do fator 1; DED: domínio efetor de morte; DISC: complexo indutor de sinalização de morte; FasL: Ligante de Fas. Adaptado de VUCIC & FAIRBROTHER, 2007.

1.2.2 Via extrínseca ou via ativada por receptores de morte

A via extrínseca envolve a ativação de receptores de morte (DR) de superfície celular e é disparada após a ligação dos seus ligantes específicos: ligante Fas, fator de necrose tumoral α (TNFα) e ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) (HOLOCH & GRIFFITH, 2009) aos seus receptores. Os DRs apresentam domínios citoplasmáticos ricos em cisteína denominados domínios efetores de morte (DED), que desempenham uma função crucial na transmissão de sinais. Quando ativado, os DEDs são capazes de atrair moléculas adaptadoras como a proteína associada ao domínio de morte de Fas (FADD) e a proteína do domínio de morte associada ao TNFR (TRADD) (MAHMOOD & SHUKLA, 2009). Dessa forma, tais proteínas recrutam a procaspase-8 para a formação do complexo indutor de sinalização de morte (DISC), que leva à ativação autocatalítica da caspase-8 e propagação da sinalização de morte que culmina com a ativação das procaspases-3 e -7 e indução de apoptose (ELMORE, 2007; MAHMOOD & SHUKLA, 2009).

1.2.3 Via intrínseca ou via mitocondrial

A via intrínseca de morte é desencadeada quando as células sofrem um estresse que leva a mudanças na membrana externa mitocondrial, resultando na alteração da permeabilidade de membrana mitocondrial e consequente liberação do citocromo c (ELMORE, 2007). No citoplasma, o citocromo c forma um complexo protéico, denominado apoptossomo, com a protease apoptótica ativadora do fator 1 (APAF-1) e com a procaspase-9, na presença de ATP (adenosina-5'-trifosfato). Isso resulta na ativação da procaspase-9 e consequente clivagem e ativação das procaspases-3, -6 e -7 (KIM *et al.*, 2006a). A função e

integridade da membrana externa mitocondrial são reguladas pelas interações entre os membros pró e antiapoptóticos da família Bcl-2 (proteína de linfomas de células B-2) (CORY & ADAMS, 2002). A proteína proapoptótica Bax (proteína X ligada à Bcl-2), por exemplo, está presente no citoplasma das células e, sob um insulto de morte, transloca para a membrana externa da mitocôndria e colocaliza com Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer), formando um heterodímero e alterando o potencial de membrana mitocondrial (JEONG & SEOL, 2008). O balanço entre tais proteínas e os membros antiapoptóticos da família, como Bcl-2, Bcl-xl (proteína do linfoma de células B extra grandes) e Mcl-1 (proteína de leucemia de células mielóides-1), que são capazes de prevenir a interação Bax-Bak, é o que vai determinar se o estímulo mitocondrial de apoptose foi ativado (KIM *et al.*, 2006a).

Apesar de as proteínas da família Bcl-2 serem reguladoras importantes da apoptose, as proteínas inibidoras da apoptose assumem papel importante como inibidores endógenos da apoptose pelo fato de serem capazes de intermediar tanto estímulos da via intrínseca quanto da via extrínseca (DEVERAUX & REED, 1999; WRZESIEN-KUS *et al.*, 2004).

1.3 Proteínas inibidoras da apoptose

As proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) ou BIRC (proteína contendo BIR) foram primeiramente descritas em baculovírus (CROOK *et al*, 1993), quando foi demonstrado o seu envolvimento na inibição da morte celular da célula hospedeira em resposta a uma infecção viral. As IAPs são caracterizadas pela presença dos domínios BIR (*baculoviral IAP repeat*), que constituem domínios altamente conservados entre algumas espécies, cuja função primordial é promover interações entre proteínas (DE GRAAF *et al.*, 2004; SRINIVASULA & ASHWELL, 2008). Até o momento, existem oito membros da família

identificados em humanos: c-IAP1 (proteína celular inibidora da apoptose 1), c-IAP2 (proteína celular inibidora da apoptose 2), XIAP (IAP ligada ao cromossomo X), Survivina, Bruce/Apollon (enzima conjugada à ubiquitina contendo BIR), NAIP (proteína inibidora da apoptose neuronal), Livina/ML-IAP (IAP de melanoma) e ILP2 (proteína *IAP-like* 2), que são diferenciados por características funcionais e estruturais (FULDA & VUCIC, 2012) (Figura 1.5).

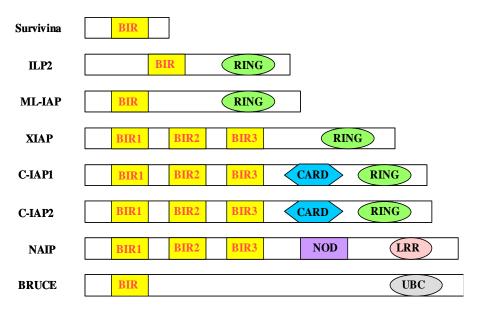


Figura 1.5: Representação esquemática das proteínas da família das IAPs em humanos. O esquema mostra os domínios presentes na estrutura das IAPs. O domínio BIR, que caracteriza os membros da família das IAPs, é capaz de promover as interações entre proteínas. Os domínios RING e UBC são responsáveis pelo processo de ubiquitinação. Por outro lado, CARD, NOD e LRR são domínios cuja relevância ainda não foi descrita para as IAPs. IAP: Proteínas inibidoras da apoptose. BIR: baculoviral IAP repeat; RING: really interesting new gene; CARD: domínio de ativação e recrutamento de caspases; NOD: domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo; LRR: repetições ricas em leucina; UBC: conjugação à ubiquitina. Adaptado de SRINIVASULA & ASHWELL, 2008.

Além dos domínios BIR, presentes em uma a três cópias em cada proteína, existem outros domínios presentes nas IAPs que, além de diversificar suas funções, promovem a regulação entre os membros dessa família (DEVERAUX & REED, 1999). Os domínios RING conferem a essas proteínas atividade ubiquitina ligase E2, que é responsável pelo recrutamento de enzimas conjugadas a E2 e catálise da transferência da ubiquitina para suas

proteínas alvo (YANG *et al.*, 2000). A presença dos domínios RING é importante para a regulação existente entre os membros da família, uma vez que a ubiquitinação encaminha, de maneira específica, proteínas para degradação pelo proteassoma ou induz alguma alteração na sua função (VAUX & SILKE, 2005). Apesar de não existirem evidências sólidas sobre a função do domínio UBC (conjugação à ubiquitina), presente na Bruce/Apollon, ele parece estar envolvido no processo de ubiquitinação de proteínas, porém sem a necessidade da E3 ligase como proteína intermediária (VAUX & SILKE, 2005). Para os domínios CARD (domínio de ativação e recrutamento de caspases), NOD (domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo) e LRR (repetições ricas em leucina), ainda não foi descrita uma função relevante para as IAPs (VAUX & SILKE, 2005).

O mecanismo tradicionalmente postulado de inibição da apoptose pelas IAPs é mediado pela ligação direta ou indireta às caspases e inibição da sua atividade proteolítica, que provocaria a degradação celular característica da fase final de execução da apoptose (DE GRAAF *et al.*, 2004; WRZESIEN-KUS *et al.*, 2004). Porém, atualmente se sabe que as IAPs regulam as caspases através de mecanismos distintos e que diferentes membros da família apresentam funções e maneiras distintas de atuar (SCHIMMER, 2004; SRINIVASULA & ASHWELL, 2008). Além disso, vem sendo demonstrado que as IAPs apresentam diversas outras funções fisiologicamente relevantes, como a participação na resposta imune inata, metabolismo do cobre, sinalização mediada por receptores, migração e divisão celular (DUBREZ-DALOZ *et al.*, 2008; SRINIVASULA & ASHWELL, 2008).

Os membros da família das IAPs têm sido investigados como alvos terapêuticos, pelo fato de estarem associados a um prognóstico desfavorável (NAKAGAWA *et al.*, 2006) e por se encontrarem superexpressos em diversos tipos de câncer (TAMM *et al.*, 2000). Inúmeros estudos pré-clínicos e ensaios clínicos de fase I e II se encontram em andamento e envolvem o uso de tecnologias antisenso para inibição das IAPs, bem como a administração de

pequenas moléculas que mimetizam a Smac, através da ligação às IAPs, prevenção da sua interação com as caspases e consequente sensibilização de células à apoptose (SCHIMMER, 2004; HUNTER *et al.*, 2007; VUCIC & FAIRBROTHER, 2007). A utilização dessas intervenções foi capaz de sensibilizar células à morte induzida por radiação e quimioterapia e tem demonstrado ser uma estratégia viável, principalmente se combinada com outros tipos de tratamento (HUNTER *et al.*, 2007).

Dentre os membros das IAPs, no presente estudo será dada uma atenção especial a XIAP e a Survivina como alvos de terapias antitumorais.

1.3.1 XIAP

A XIAP, ou BIRC4 foi primeiramente identificada após uma busca por sequências de IAPs em banco de dados de *Cydia pomonella* (LISTON *et al.*, 1996). A expressão de XIAP é amplamente encontrada em tecidos normais (VISCHIONI *et al.*, 2006), porém sua superexpressão nas neoplasias está normalmente associada a um prognóstico desfavorável. (LIU *et al.* 2001; CARTER *et al.* 2003; TAMM *et al.* 2004). Comparada às outras IAPs, a XIAP se destaca por ter a real capacidade de inibir as caspases, uma vez que é estável e exibe a maior potência de inibição (ECKELMAN *et al.*, 2006). Isso se deve ao fato de que somente a XIAP é capaz de se ligar e efetivamente inibir as caspases 3, 7 e 9, promovendo uma ligação que é mediada por dois sítios de interação distintos (SCOTT *et al.*, 2005). Nesse trabalho, foi mostrado que a XIAP interage com as caspases-3 e -7 através do domínio BIR2, diferentemente da interação com a caspase-9, que é mediada pelo domínio BIR3, evidenciando mecanismos estruturalmente diferentes de inibição das caspases (Figura 1.6).

Dano ao DNA Estresse RE Quimioterapia Mitocôndria XIAP Degradação Proteassoma APOPTOSE Caspase-3/7

Figura 1.6: Modelo para a função da XIAP na inibição da apoptose. A XIAP é capaz de inibir a apoptose através da ligação direta a caspase iniciadora 9 e às caspases efetoras 3 e 7, interação que é mediada por dois sítios distintos. Outro mecanismo de inibição da apoptose descrito para essa proteína é a ubiquitinação de moléculas envolvidas na maquinaria apoptótica, como Smac e AIF e conseqüente encaminhamento para degradação por proteassoma. A função antiapoptótica da XIAP pode ser antagonizada pelas proteínas Smac, Htra2/Omi e XAF. Smac e Htra2/Omi são liberadas da mitocôndria mediante um estímulo de estresse intracelular, como o dano ao DNA, estresse de RE e quimioterapia. Ub: ubiquitina; XIAP: proteína inibidora da apoptose ligada a X; RE: reticulo endoplasmático; Smac: Segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria; XAF: Fator associado a XIAP; AIF: fator indutor de apoptose).

As propriedades de inibição das caspases pela XIAP podem ser antagonizadas por interações com outras proteínas, como a Smac/DIABLO (Second mitochoncrial-derived activator of caspases/Direct IAP binding with low PI), HtrA2/Omi e XAF (fator associado à XIAP). As proteínas Smac/DIABLO (DUCKETT, 2005) e HtrA2/Omi (SUZUKI et al., 2001) estão normalmente localizadas na mitocôndria e são liberadas para o citoplasma juntamente com o citocromo-c, mediante um estímulo apoptótico e despolarização da membrana externa mitocondrial. No citoplasma, essas moléculas se ligam à XIAP através de um IBM (motivo de ligação às IAPs), atuando com um inibidor competitivo das caspases e

prevenindo sua função antiapoptótica. A XIAP também pode ser regulada pela proteína supressora de tumor XAF1, cujos efeitos proapoptóticos podem ser exercidos através da interação e ativação da função E3 ligase da XIAP, que culmina com a degradação da Survivina por ubiquitinação direta (ARORA *et al.*, 2007).

Outras funções relevantes da XIAP são o envolvimento no metabolismo do cobre (MUFTI et al., 2007) e a capacidade de auto-ubiquitinação e ubiquitinação de outros alvos envolvidos ou não no controle da morte celular (GALBÁN & DUCKETT, 2010), demonstrando sua versatilidade em processos fisiológicos. A proteína AIF (fator indutor de apoptose), cuja translocação nuclear se mostrou relevante para a indução de morte celular e fragmentação nuclear através de um mecanismo independente de caspases, constitui um alvo de ubiquitinação por essa proteína (WILKINSON et al., 2008). A XIAP também foi capaz de promover a ubiquitinação in vitro da Smac/DIABLO e encaminhá-la para degradação via proteassoma (MACFARLANE et al., 2002), reforçando os achados referentes à regulação negativa entre tais proteínas.

1.3.1.1 XIAP em Câncer de mama

Até o momento, existem poucos estudos que relatam o impacto da expressão da XIAP em pacientes com câncer de mama. Um estudo recente mostrou que a expressão de XIAP foi encontrada em 83% dos casos de pacientes com cancer de mama, sendo sua presença no núcleo um marcador independente de prognóstico desfavorável (ZHANG *et al.*, 2011). JAFFER *et al* (2007) reportaram uma prevalência de positividade para XIAP de 65% e observaram uma correlação positiva entre a intensidade de marcação para XIAP e o grau de invasividade do tumor. Contradizendo esses dados, HINNIS *et al* (2007) observaram uma frequência de expressão de XIAP em torno de 90% que não pode ser correlacionada com

parâmetros clinico-biológicos, nem com a expressão de Her-2 e ER, mostrando que mais estudos são necessários para entender o seu valor prognóstico no câncer de mama.

Apesar de não haver dados consistentes referentes ao valor prognóstico da expressão da XIAP em pacientes com câncer de mama, estudos in vitro demonstram que a diminuição nos níveis de XIAP (AIRD et al., 2008) e a utilização de miméticos de Smac (OOST et al., 2004; GONZÁLEZ-LÓPEZ et al., 2011) – moléculas que mimetizam a interação inibitória da proteína Smac/DIABLO com a XIAP - são capazes de sensibilizar células derivadas de câncer de mama a diferentes estímulos citotóxicos. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com tais moléculas levou a redução do tumor em um modelo de xenoenxerto de células MDA-MB-231 em camundongos, sem ocasionar a perda de peso dos animais, demonstrando uma eficácia satisfatória (FLYGARE et al., 2012). Corroborando esses dados, a atividade antitumoral de um oligonucleotídeo antisenso direcionado à XIAP foi avaliada em um estudo de fase I, onde foi observada a diminuição do crescimento tumoral em um paciente com câncer de mama e metástase para o fígado, que apresentava refratariedade ao tratamento convencional (DEAN et al., 2009). Em conjunto, tais achados apontam a XIAP como um alvo terapêutico promissor e sugerem que a combinação de agentes quimioterápicos com terapias direcionadas à XIAP parece representar uma estratégia promissora para sensibilização de células de câncer de mama.

1.3.2 Survivina

A Survivina, ou BIRC5, foi descrita em 1997 como um membro da família das IAPs, por apresentar um domínio similar ao domínio BIR e por ser capaz de inibir a apoptose induzida por privação de IL-3 em células pré-B dependentes dessa interleucina (AMBROSINI *et al.*, 1997). Apesar de ser detectada em baixos níveis na maioria dos tecidos

totalmente diferenciados, foi demonstrado que a Survivina se encontra altamente expressa em tecidos fetais e embrionários humanos e de camundongos (ADIDA *et al.*, 1998; FUKUDA & PELUS, 2006). Em uma busca genômica, a Survivina constituiu o quarto transcripto mais superexpresso em células tumorais, quando comparado a células normais (VELCULESCU *et al.*, 1999), mostrando que ela é uma das moléculas mais diferencialmente expressas entre tecido normal e neoplásico. O gene da Survivina humana apresenta cinco variantes de *splicing* alternativo, dando origem a cinco proteínas distintas que possuem funções apoptóticas antagônicas, porém são expressas em níveis mais baixos que a Survivina selvagem e não são muito abundantes em células tumorais (LI, 2005; ALTIERI, 2006; KNAUER *et al.*, 2007a).

Independentemente da expressão e localização das suas variantes de *splicing*, a Survivina selvagem pode ser encontrada no núcleo, no citoplasma (FORTUGNO *et al*, 2002) e na mitocôndria (DOHI & ALTIERI, 2005). O transporte núcleo-citoplasmático da Survivina depende de sinais de exportação nuclear (NES) (ENGELSMA *et al.*, 2007), que promovem a interação com o receptor de exportação nuclear Crm-1 e a sua exportação para o citoplasma (RODRÍGUEZ *et al.*, 2002), mediada pela atividade RanGTP/GDP. A interferência com o transporte da Survivina do núcleo para o citoplasma afeta tanto sua função no ciclo celular (KNAUER *et al.*, 2006), quanto seu papel citoprotetor (KNAUER *et al.*, 2007b). A fração mitocondrial é inexistente em tecidos normais e, mediante um estímulo apoptótico, é liberada da mitocôndria, se localizando no citosol, onde atua na inibição da apoptose (DOHI *et al.* 2004a), sendo considerada como um potencial alvo terapêutico.

A Survivina apresenta uma regulação ciclo-dependente extremamente fina, de forma que se encontra mais expressa nas fases G2 e M do que nas fases G1 e S do ciclo celular (LI *et al.*, 1998). Essa regulação da Survivina é modulada por um ciclo de síntese (LI & ALTIERI, 1999) e degradação via-proteassoma (ZHAO *et al.*, 2000), além de envolver

alterações transcricionais e pós-traducionais da proteína. Quando começa a mitose, a Survivina se localiza em 2 frações subcelulares distintas (MITA et al., 2008) (Figura 1.7). Uma das frações da Survivina interage com as proteínas aurora quinase B, INCENP (proteína interna do centrômero) e borealina no cinetocoro, formando o complexo chromossomal passenger complex (CPC) (KLEIN et al., 2006), que contribui para que a citocinese e segregação cromossômica ocorram adequadamente, a fim de manter a fidelidade genômica a cada duplicação. A função mitótica exercida pelo CPC envolve o estímulo da atividade serina-treonina quinase da aurora quinase B (BEARDMORE et al., 2004), que fosforila a MCAK (cinesina associada ao centrômero mitótico) e inibe sua atividade de despolimerização de microtúbulos (ALTIERI, 2006).

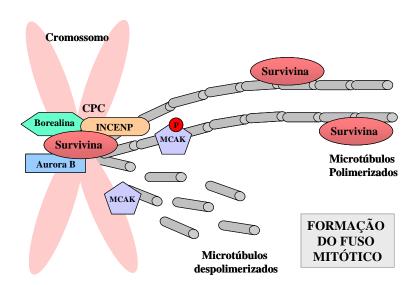


Figura 1.7: Modelo para a função da Survivina na mitose. A Survivina é um componente das CPCs, complexo formado também pela Borealina, INCENP e Aurora B quinase, que é essencial para que ocorra a segregação cromossômica e a citocinese. A fosforilação da MCAK pela Aurora B quinase inibe a atividade despolimerizadora de microtúbulos dessa cinesina, o que facilita a polimerização dos microtúbulos. Uma fração distinta da Survivina se encontra diretamente associada aos microtúbulos polimerizados, contribuindo para a regulação da dinâmica dos microtúbulos e formação do fuso mitótico. CPC: *chromossomal passenger complex*; INCENP: proteína interna do centrômero; MCAK: cinesica associada ao centrômero mitótico.

A outra fração da Survivina mitótica se encontra diretamente associada aos microtúbulos polimerizados e desempenha um papel na formação do fuso mitótico e no controle da dinâmica de microtúbulos, porém por uma via que ocorre independentemente da fosforilação pela aurora B (MITA *et al.*, 2008). Nesse contexto, a Survivina ligada aos microtúbulos é fosforilada pela quinase p34^{cdc2} (cdk1) em resíduos de treonina 34, alteração que é crucial para sua estabilização durante a mitose (O'CONNOR *et al.*, 2002).

No contexto da sua função na inibição da apoptose, hoje se sabe que a Survivina não dispõe de alguns domínios estruturais necessários para que a interação com as caspases seja inibitória (BANKS et al., 2000; VERDECIA et al., 2000). Evidências mostram que a inibição indireta das caspases ocorre através da ligação a cofatores e proteínas intermediárias, como a HBXIP (proteína da hepatite B ligada a X) (Figura 1.8). A Survivina requer a presença da HBXIP para a formação de um complexo que é capaz de interagir com a procaspase-9, prevenindo sua ligação ao APAF-1 e inibindo a via mitocondrial de morte (MARUSAWA et al., 2003). Assim como sua função no ciclo celular, a eficácia de ligação à HBXIP e inibição da apoptose são asseguradas pela fosforilação pela quinase p34^{cdc2} (MARUSAWA et al., 2003). Como proteína intermediária da atuação indireta da survivina, pode-se destacar a Smac/DIABLO. A Survivina tem a capacidade de se ligar à Smac, prevenindo sua ligação às outras IAPs e, conseqüentemente, liberando a XIAP para inibição das caspases (SONG et al., 2003). A Survivina também pode interagir com outros membros da família das IAPs, como a XIAP, estabilizando-a, impedindo sua degradação via proteassoma e inibindo a apoptose (DOHI et al., 2004b).

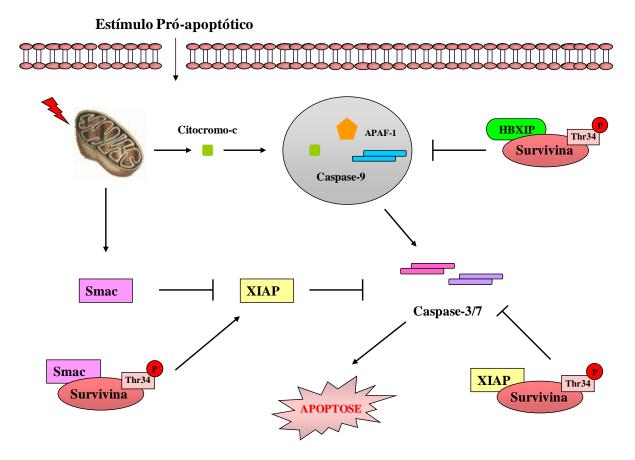


Figura 1.8: Modelo para a função da Survivina na regulação da apoptose. A inibição da apoptose pela Survivina ocorre através da ligação a cofatores e proteínas intermediárias, permitindo a regulação indireta das caspases. A Survivina pode interagir com HBXIP, inibindo a ativação da caspase-9 e, consequentemente, a proteólise e ativação das caspases efetores 3 e 7. A Survivina também facilita a atividade da XIAP, através da sua estabilização e prevenção de sua degradação via proteassoma e através da interação inibitória com a Smac, que libera a XIAP para inibir as caspases e impedir a apoptose. Assim como sua função no ciclo celular, a função citoprotetora da Survivina também é assegurada pela sua estabilização mediante fosforilação pela p34^{cdc2} em seus resíduos treonina (thr) 34. APAF: Protease apoptótica ativadora do fator 1; XIAP: IAP ligada a X; Smac: segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria; HBXIP: proteína de hepatite B ligada a X. Adaptado de ZANGEMEISTER-WITTKE & SIMON, 2004.

1.3.2.1 Survivina em Câncer de Mama

No câncer de mama, a taxa de expressão da Survivina varia de 55 a 90%, dependendo da seleção das amostras tumorais e da técnica utilizada em cada trabalho, porém não é detectada nos tecidos normais adjacentes ao tumor (TANAKA *et al.*, 2000; NASSAR *et al.*, 2008). Em relação às variantes de *splicing* alternativo, foi observado que a Survivina

selvagem foi o transcrito mais dominante em biópsias tumorais de mama (VÉGRAN et al., 2007). Sua expressão aumenta de acordo com os diferentes estágios da carcinogênese, sugerindo sua participação na progressão de lesões benignas a lesões malignas de mama (SINGH et al., 2004). Os níveis aumentados de Survivina estão associados a tumores de alto grau (NASSAR et al., 2008), altos índices de proliferação (HINNIS et al., 2007; NASSAR et al., 2008) e baixos de apoptose (TANAKA et al., 2000), padrão negativo de receptores hormonais (SPAN et al., 2004; RYAN et al., 2006) e superexpressão de Her2 (RYAN et al., 2006). Consequentemente, pacientes com altos níveis de Survivina apresentam uma sobrevida global (SPAN et al., 2004; HINNIS et al., 2007) e livre de doença (RYAN et al., 2006) menor do que os pacientes com baixos níveis dessa proteína. Na prática clínica, a avaliação da expressão da Survivina juntamente com outros 20 genes permite a composição de um painel molecular, capaz de predizer a resposta à terapia hormonal de pacientes com câncer de mama positivas para os receptores hormonais (SPARANO & PAIK, 2008). O conjunto dessas evidências experimentais fortemente aponta a Survivina como um biomarcador com potencial para estratificação de grupos de pacientes com câncer de mama que apresentem alto risco, prognóstico desfavorável e uma maior chance de resistir ao tratamento e que, assim, devam ser beneficiados de modalidades de tratamento diferenciadas.

Em modelos *in vitro*, já foi demonstrado que a superexpressão da Survivina está relacionada à resistência à terapia endócrina, visto que a transfecção de células derivadas de tumores de mama com o gene da Survivina é capaz de prevenir a apoptose induzida pelo inibidor de receptores hormonais tamoxifeno (MORIAI *et al.*, 2008). Além disso, a interferência na sua expressão em modelos *in vitro* e *in vivo* resulta na indução de apoptose, inibição da angiogênese e da formação de tumor (LI *et al.*, 2006) e do desenvolvimento de mestástases (PENG *et al.*, 2008). A utilização de estratégias para antagonizar a expressão da

Survivina, como oligonucleotídeos antisenso e repressores transcricionais, vem sendo testada em ensaios clínicos de fase I e II e tem demonstrado respostas clínicas satisfatórias acompanhadas de efeitos colaterais tolerados (ALTIERI, 2008). Um estudo recente demonstrou que um inibidor transcricional do promotor da Survivina – denominado YM155 - foi capaz de inibir a proliferação in vitro e induzir a regressão tumoral in vivo em um modelo de células de carcinoma metastático de mama triplo negativo (ER⁻, PR⁻ e Her⁻), que são tumores altamente agressivos que apresentam um prognóstico desfavorável e opções terapêuticas escassas (YAMANAKA et al., 2011). Além disso, a expressão da Survivina vem sendo utilizada como um "antígeno tumoral" para a criação de vacinas que estão sendo testadas isoladamente ou combinação com agentes quimioterápicos em (http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=survivin). O objetivo central desses estudos, que ainda se encontram em andamento, é avaliar se a inibição da expressão da Survivina induzida por essas vacinas é capaz de gerar uma resposta imune e potencializar os efeitos do tratamento convencional utilizado para o câncer de mama.

1.4 Fatores de transcrição forkhead Box (Fox)

Os fatores de transcrição Fox pertencem a uma família de reguladores transcricionais que podem ser definidos pela presença de um domínio de ligação ao DNA (DBD) comum, denominado *forkhead box* (KAESTNER *et al.*, 2000). Existem 17 subfamílias de genes Fox (FoxA-R) descritas, tendo sido identificados aproximadamente 41 genes em humanos (MYATT & LAM, 2007). Apesar do domínio DBD conservado entre os membros das subfamílias, suas funções e mecanismos de regulação variam consideravelmente. As proteínas Fox são capazes de regular transcricionalmente importantes processos biológicos como metabolismo, desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose, migração,

invasão e longevidade (MYATT & LAM, 2007). Dentre as subfamílias Fox, foi demonstrado que os membros Foxo3a e FoxM podem representar efetores diretos ou indiretos de terapias oncológicas, assim como a desregulação de sua função e expressão está intimamente associada à tumorigênese (WILSON *et al.*, 2011).

1.4.1 Fator de transcrição Foxo3a

O fator de transcrição Foxo3a (FKHRL1) pertence à subfamília Foxo, que é composta por quatro membros: Foxo1, Foxo3a, Foxo4 e Foxo6 (Figura 1.9), cuja expressão pode ser encontrada em diversos tipos diferentes de tecidos (GREER & BRUNET, 2005). A proteína Foxo3a está envolvida na regulação transcricional de funções celulares cruciais, como o ciclo celular, resposta ao estresse, metabolismo da glicose e apoptose (ZHANG *et al.*, 2011). Evidências sugerem que Foxo3a pode atuar como um supressor tumoral, inibindo o crescimento tumoral através da ativação de genes como Bim, TRAIL, FasL, p27kip1, ciclinaD, GADD45a (*growth arrest and DNA-damage inducible*), glicose-6-fosfatase e superóxido dismutase (YANG and HUNG, 2009).

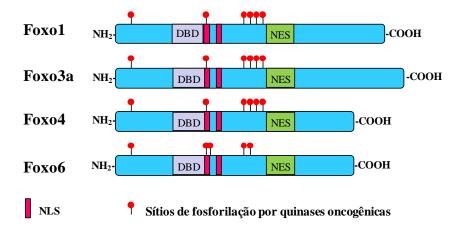


Figura 1.9: Estrutura dos fatores de transcrição Foxo. DBD: sítio de ligação ao DNA; NLS: sequência de localização nuclear; NES: sequência de exportação nuclear. Adaptado de TRAN *et al.*, 2003.

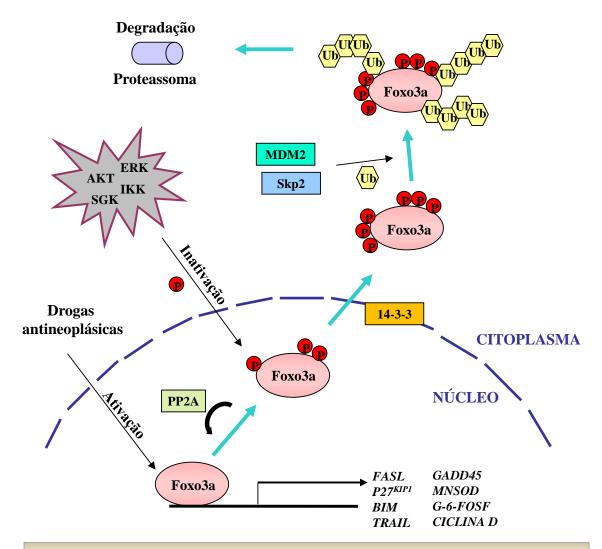
A fosforilação por quinases oncogênicas, principalmente Akt, Erk, IKK (quinase de IKB) e SGK (quinase regulada por glicocorticóide e soro) regula o transporte núcleocitoplasmático de Foxo3a, levando à exclusão nuclear e retenção no citoplasma (BRUNET et al., 1999; VAN DER HEIDE et al., 2004). A fosforilação facilita o reconhecimento de Foxo3a pelas E3 ligases Mdm2 (murine double minute 2) e Skp2 (proteína associada à quinase de fase S 2), levando a sua ubiquitinação, degradação via proteassoma e consequente inativação de sua função (HUANG and TINDALL, 2011) (Figura 1.10). A ligação de 14-3-3 à Foxo3a aumenta sua exportação nuclear porque altera a sua conformação, mascarando sítios NLS e expondo sítios NES (BRUNET et al., 2002). Recentemente, foi descrito que a reativação de Foxo3a é mediada pela fosfatase PP2A (proteína fosfatase 2A), que defosforila resíduos fosforilados pela Akt, dissocia Foxo3a de 14-3-3 e promove a sua translocação nuclear e ativação transcricional (SINGH et al., 2010). É importante ressaltar que o fator de transcrição Foxo3a também pode ser regulado por outros mecanismos pós-traducionais, como acetilação, metilação, ubiquitinação e glicosilação (ZHAO et al., 2011).

1.4.1.1 Foxo3a em Câncer de Mama

A avaliação dos níveis de fosforilação de Foxo3a em linhagens celulares de câncer de mama com diferentes graus de malignidade demonstrou que a inativação desses fatores de transcrição esteve associada a um maior grau de malignidade, apontando tal proteína como um biomarcador de risco para tumorigênese (KIM *et al.*, 2009). Em amostras de pacientes com câncer de mama, a localização citoplasmática da Foxo3a foi correlacionada a uma menor sobrevida global, sugerindo que a inativação da sua função seja um fator determinante na tumorigênese (HU *et al.*, 2004). Contradizendo esses dados, foi

demonstrado que a expressão nuclear de Foxo3a pode ser associada à presença de metástase linfonodal e a uma sobrevida global reduzida em pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama (CHEN et al., 2010). Em 2004, JIN et al já haviam mostrado que a expressão de Foxo3a é predominantemente nuclear no carcinoma infiltrante de mama, ao contrário de tumores benignos e tecidos não neoplásicos de mama, que apresentam a localização citoplasmática do fator de transcrição. Nesse estudo, também foi observado que a expressão nuclear de Foxo3a foi correlacionada à freqüência de metástase em linfonodos e a tumores de maior tamanho (JIN et al., 2004), sugerindo que a ativação dessa proteína possa estar associada a um prognóstico desfavorável no câncer de mama.

Em linhagens celulares derivadas de câncer de mama, diversos estudos têm demonstrado que o fator de transcrição Foxo3a pode atuar como um alvo para quimioterápicos, ativando genes relacionados a apoptose e parada no ciclo celular. A expressão de Foxo3a foi induzida em resposta ao tratamento de linhagens celulares de câncer de mama com lapatinibe (XIA et al, 2006), taxol (SUNTERS et al., 2003) e gefitinibe (KROL et al., 2007). O aumento da expressão de Foxo3a também foi observado em biópsias de pacientes com câncer de mama previamente expostos ao lapatinibe e gefitinibe em ensaios clínicos, indicando que a ativação desse fator de transcrição não é um efeito restrito a modelos in vitro (XIA et al, 2006; KROL et al., 2007). Esses trabalhos mostraram que o aumento da expressão de Foxo3a envolve a diminuição de sua fosforilação, translocação do citoplasma para o núcleo e ativação de genes como Bim e p27^{kip1} (SUNTERS et al., 2003; SUNTERS et al., 2003; XIA et al, 2006). Esses achados apontam Foxo3a como um potencial marcador preditivo da eficácia clínica de agentes antitumorais.



Regulação da apoptose, ciclo celular, resposta ao estresse e metabolismo da glicose

Figura 1.10: Figura esquemática dos mecanismos envolvendo a ativação e a degradação do fator de transcrição Foxo3a. O fator de transcrição Foxo3a é capaz de modular a apoptose, ciclo celular, metabolismo da glicose e resposta ao estresse oxidativo, através da regulação de genes como BIM, FASL, P27^{KIP1}, TRAIL, CICLINA D, GADD45, MNSOD e G-6-FOSF. A fosforilação de Foxo3a por quinases oncogênicas - AKT, IKK, ERK e SGK - permite sua interação com a chaperona 14-3-3 e exclusão nuclear, facilitando seu reconhecimento pelas E3 ligases Mdm2 e Skp2. A reativação transcricional de Foxo3a envolve a defosforilação pela fosfatase PP2A e dissociação de 14-3-3. A ubiquitinação de Foxo3a encaminha esses fatores de transcrição para degradação via proteassoma, inativando sua função. TRAIL: Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral; GADD45: growth arrest and DNA-damage inducible; G-6-fosf: Glicose-6-fosfatase; IKK: quinase de IKB; SGK: Quinase regulada por glicocorticóide e soro; Mdm2: Murine double minute 2 e Skp2: proteína associada à quinase de fase S 2; PP2A: proteína fosfatase 2A. Adaptado de YANG & HUNG, 2009.

1.4.2 Fator de transcrição FoxM1

O fator de transcrição FoxM1 – previamente conhecido como HFH-11, MPP2, Win, Trident e FKHL16 - também pertence à família Fox e sua expressão é encontrada em células proliferativas de mamíferos e linhagens celulares tumorais, mas não em tecidos normais totalmente diferenciados (KORVER et al., 1997). A expressão de FoxM1 é induzida na fase G1 do ciclo celular, permanece durante a fase S e atinge seus níveis máximos na fase G2/M (LEUNG et al., 2001), quando é degradada pela APC (complexo promotor da anáfase) via ubiquitinação (PARK et al., 2008). A FoxM1 se encontra predominantemente no citoplasma durante as fases G1 e S, porém é fosforilada e translocada para o núcleo antes da entrada em G2 e M, evento que depende de ativação por complexos ciclina/CDK (MAJOR et al., 2004) e pela via de sinalização RAF/MEK/MAPK (MA et al., 2005) (Figura 1.11). A superexpressão de FoxM1 já foi observada em diversas neoplasias, como carcinoma hepatocelular (LEE et al., 2004), câncer pancreático (WANG et al., 2007) e colorretal (DOUARD et al., 2006), glioblastoma (LIU et al., 2006) e leucemia mielóide aguda (NAKAMURA et al., 2010), sugerindo que terapias visando a sua inibição possam apresentar algum impacto no tratamento do câncer (RADHAKRISHNAN et al., 2006). De maneira consistente, resultados obtidos a partir de uma análise de microarranjo mostraram que FoxM1 é um dos genes mais comumente superexpressos na maioria dos tumores sólidos (PILARSKY et al., 2004).

A principal função de FoxM1 é a regulação transcricional da expressão gênica de proteínas reguladoras do ciclo celular, essenciais para a progressão para as fases G1/S e G2/M e manutenção da integridade genômica (WANG *et al.*, 2005). Dentre os genes-alvo para FoxM1 mais conhecidos, se encontram moléculas promotoras da fase S como *CDC25*, inibidores de CDKs, como *P21*^{CIP1} e *P27*^{KIP1} (regulação negativa) e reguladores mitóticos

como *AURORA B QUINASE*, *CENPA* (proteína associada ao centrômero A), *CENPB*, *PLK1* (*Polo-like kinase 1*), *SURVIVINA* (WANG *et al.*, 2005) e *CICLINA B1* (LEUNG *et al.*, 2001) (Figura 1.11).

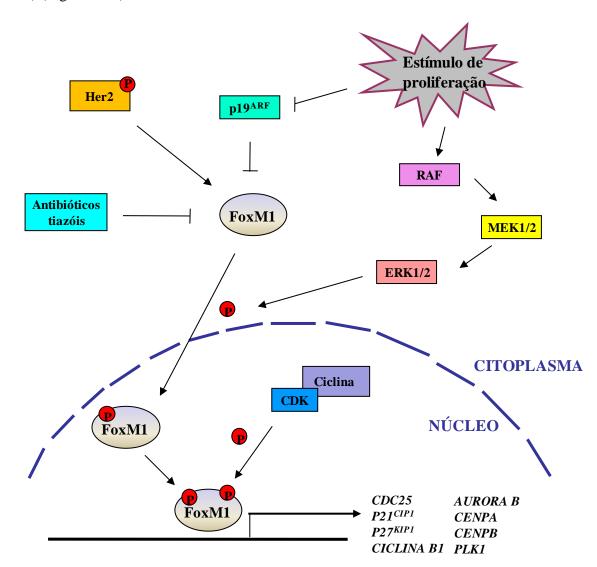


Figura 1.11: Representação esquemática das vias de sinalização que regulam FoxM1. O fator de transcrição FoxM1 participa na progressão nas fases do ciclo celular através da regulação de genes como *CDC25*, *P21^{CIP1}*, *P27^{KIP1}*, *AURORA B QUINASE*, *CENPA*, *CENPB*, *PLK1 e CICLINA B1*. Sua função é inibida por p19^{ARF} e antibióticos tiazóis e ativada por vias de sinalização associadas aos estímulos de proliferação como a via de Raf/MEK/ERK e de Her2. A translocação de FoxM1 para o núcleo depende de fosforilação mediada por ERK e pelo complexo Ciclina/CDK. CDK: quinase dependente de ciclina; PLK1: polo-like kinase 1; CENP: proteína associada ao centrômero.

Visto que FoxM1 é requerida para a viabilidade e progressão no ciclo celular, células depletadas para esse fator de transcrição apresentam uma formação do fuso mitótico aberrante, com consequente catástrofe mitótica e poliploidia (WONSEY & FOLLETTIE, 2005). Trabalhos mais recentes mostram que FoxM1 está envolvida não apenas na proliferação celular, mas também em outros aspectos da oncogênese, como o aparecimento de metástase (RAYCHAUDHURI & PARK, 2011). Foi demonstrado que FoxM1 estimula invasão e angiogênese em células tumorais através da indução de metaloproteinases de matrix e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e a inibição de sua expressão é capaz de inibir esses processos (AHMAD *et al.*, 2010).

1.4.2.1 FoxM1 em Câncer de Mama

Estudos realizados em amostras de pacientes mostraram expressão elevada de transcritos de FoxM1 em tumores primários de carcinoma ductal infiltrante em contraposição a tecidos normais de mama (WONSEY & FOLLETTIE, 2005). Além disso, pacientes com câncer de mama apresentando altos níveis de expressão gênica de FoxM1 tiveram um prognóstico desfavorável, principalmente os pacientes com tumores ER (MARTIN et al., 2008). Recentemente, FoxM1 foi identificada como um possível biomarcador molecular para detecção precoce do câncer de mama, visto que níveis elevados de sua expressão gênica podem ser observados desde estágios pré-invasivos da doença como o carcinoma ductal in situ (KRETSCHMER et al., 2011). Outro estudo realizado com amostras de câncer de mama mostrou que a expressão de FoxM1 é capaz de predizer o risco para metástase em pacientes com idade inferior a 40 anos e amostras tumorais positivas para ER (YAU et al., 2011). Diferentemente desses dados, BEKTAS et al. (2008) observaram que a superexpressão de FoxM1 em amostras derivadas de câncer de mama não pode ser

correlacionada com parâmetros clínico-biológicos, como estádio do tumor, status linfonodal e presença de ER e PR. Porém, esse trabalho encontrou uma correlação significativa entre a expressão de FoxM1 e o receptor Her2 (BEKTAS *et al.*, 2008), apontando um possível papel para o fator de transcrição em tumores positivos para Her2. Corroborando esses resultados, foi demonstrado que Her2 é capaz de regular a expressão de FoxM1 *in vitro* e *in vivo* (FRANCIS *et al.*, 2009).

Ensaios in vitro mostram que a superexpressão de FoxM1 é capaz de conferir resistência a quimioterápicos, como cisplatina, transtuzumabe e paclitaxel (CARR et al., 2010; KWOK et al., 2010). Linhagens celulares de câncer de mama resistentes à cisplatina apresentam níveis maiores de FoxM1 e a indução da superexpressão do fator de transcrição em células sensíveis é suficiente para conferir resistência e essa droga, através da ativação de vias envolvidas com o reparo ao DNA (KWOK et al., 2010). A expressão de FoxM1 também confere resistência ao transtuzumabe, visto que a interferência na sua expressão através de siRNA é capaz de sensibilizar as células ao anticorpo monoclonal, isoladamente ou em combinação com paclitaxel (CARR et al., 2010). O fator de transcrição FoxM1 parece ser promissor do ponto de vista terapêutico, visto que está envolvido em diversos pilares de sustentação da célula tumoral, como proliferação, evasão da apoptose, invasão, migração e metástase, além de apresentar inibidores químicos de sua expressão já descritos (HALASI & GARTEL, 2013). A modificação de um peptídeo derivado de p19^{ARF} – proteína supressora tumoral capaz de regular FoxM1 - é suficiente para interagir e inibir a expressão de FoxM1, limitando a proliferação e induzindo apoptose em células cancerosas in vitro (COSTA et al., 2005). Além disso, os antibióticos tiazóis siomicina A e tioestreptona foram identificados como potentes inibidores da atividade transcricional e expressão de FoxM1 e indutores de morte celular em células tumorais (GARTEL, 2010).

1.5 Resistência multifatorial – Interações entre as moléculas

Evidências crescentes demonstram que o desenvolvimento de um fenótipo de resistência às drogas resulta de uma rede de interações complexa que envolve múltiplos mecanismos celulares e moleculares (Figura 1.12). Trata-se de um processo multifatorial, que não ocorre como conseqüência de um mecanismo único e isolado, apontando para a necessidade de estratégias direcionadas a mecanismos diversos que sejam capazes de aumentar a sensibilidade à terapia antineoplásica. Dessa forma, diversos trabalhos têm mostrado a existência de uma regulação entre as proteínas Survivina, XIAP, Foxo3a e FoxM1, assim como uma interação de tais moléculas com proteínas conhecidamente relevantes no contexto do câncer de mama - ER e Her2 – e com vias de sinalização cujas alterações desempenham um papel central no processo de oncogênese como a via de p53 e PI3K/Akt.

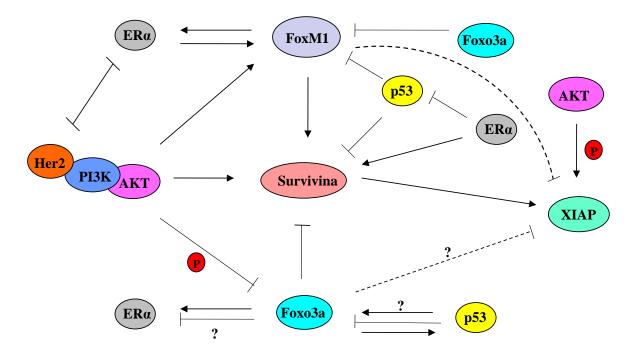


Figura 1.12: Diagrama das interações entre as proteínas associadas à resistência ou sensibilidade a agentes quimioterápicos no câncer de mama. Her2: receptor de fator de crescimento epidermal humano 2; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; ERα: receptor de estrogênio α;

Um exemplo dessas interações é o complexo IAP-IAP formado por XIAP e Survivina, onde a Survivina é capaz de aumentar a estabilidade de XIAP, impedindo sua degradação proteassomal e facilitando sua atividade de inibição de caspases (DOHI et al., 2004). A inibição simultânea de XIAP e Survivina, através da superexpressão de XAF e utilização de um mutante dominante negativo para Survivina (SurvivinaT34A) foi capaz de induzir apoptose espontânea de células tumorais, mas não em células normais de mama, mostrando a relevância de tais proteínas para a viabilidade celular (YANG et al., 2003). Além disso, a combinação de inibidores de IAPs com antagonistas de Her2 – transtuzumabe e lapatinibe - aumentou a sensibilidade de células superexpressando Her2 à apoptose (FOSTER et al., 2009). Em 2005, foi demonstrado que a expressão de Survivina pode ser regulada por Her2, por mecanismos dependentes da ativação da via PI3K/Akt, mas não de MAPK/ERK (ASANUMA et al., 2005), contribuindo para a resistência de células Her2⁺ a morte celular induzida pelo taxol (LU et al., 2009). Akt também é capaz de regular a expressão de XIAP, visto que a fosforilação em resíduos serina 87 previne sua autoubiquitinação e ubiquitinação por outras proteínas, estabilizando sua função e protegendo-a da degradação mediante tratamento com cisplatina (DAN et al., 2004). Até o presente momento, não existem evidências experimentais de que o promotor de XIAP sofra regulação direta pelos fatores de transcrição Foxo3a, FoxM1 e p53. Um trabalho recente encontrou uma correlação positiva entre a expressão de XIAP e FoxM1 em amostras de carcinoma de tireóide (AHMED et al., 2012) e outro, mostrou que a indução da expressão constitutivamente ativa de Foxo3a é capaz de levar a diminuição dos níveis de XIAP e indução de apoptose, sugerindo que existam mecanismos de regulação direta ou indireta de sua expressão (LEE et al, 2008). Por outro lado, já foi comprovado experimentalmente que o gene da SURVIVINA é inibido transcricionalmente por p53 (HOFFMAN et al., 2002, MIRZA et al., 2002) e Foxo3a (HILMI et al., 2008; GUHA et al., 2009; OBEXER et al.,

2009) em diversos modelos e que pode ser ativado por FoxM1 (WANG *et al.*, 2005). Também foi mostrado que a perda de *TP53* selvagem se correlaciona com o aumento da expressão de Survivina em amostras de pacientes com câncer de mama (TSUJI *et al.*, 2004). Corroborando com os trabalhos que descrevem a regulação negativa entre essas proteínas, foi mostrado em células de câncer de mama que ERα (receptor de estrogênio α) inibe o promotor de *TP53*, liberando a *SURVIVINA* da repressão transcricional mediada por p53 (SAYEED *et al.*, 2007).

Além de ser capaz de atuar inibindo TP53, ERα pode regular positivamente o gene de FOXM1. Um trabalho recente demonstrou que essa interação ocorre diretamente no promotor do gene ERa in vitro e in vivo e que influencia a resposta de células de câncer de mama à terapia hormonal (MILLOUR et al., 2010). Dados in vitro demonstram que a regulação inversa também pode ocorrer, visto que FoxM1 é capaz de se ligar diretamente ao promotor do gene $ER\alpha$, levando ao aumento dos níveis proteicos e de RNAm (MADUREIRA et al., 2006). Esse estudo mostrou que a ligação de FoxM1 a ERα envolve a interação concomitante de Foxo3a (MADUREIRA et al., 2006), corroborando os dados demonstrados por GUO & SONENSHEIN em 2004, referentes à regulação direta e positiva de Foxo3a no $ER\alpha$ e seus alvos em células derivadas de um tumor mamário. De maneira contraditória, foi observado que Foxo3a, quando ativada, é capaz de suprimir a proliferação de células MCF7 in vivo e in vitro através da inibição da atividade transcricional de $ER\alpha$ e seus alvos e redução dos níveis de FoxM1 (ZOU et al., 2008). Além disso, foi verificado em amostras de pacientes com câncer de mama tratadas com gefitinibe um aumento significativo da expressão da Foxo3a, que reprime a expressão de FOXM1 (MCGOVERN et al., 2009). Apesar de Foxo3a e FoxM1 parecerem atuar de forma antagônica, ambas são reguladas por p53. A inibição de p53 por short hairpin induz o aumento da expressão de FoxM1, indicando que o supressor tumoral, de alguma forma, é capaz de regular

negativamente a sua expressão (PANDIT *et al.*, 2009). Em relação à regulação de Foxo3a, um estudo em linhagens celulares não tumorais mostrou que p53 é capaz de interagir com Foxo3a e inibir sua expressão gênica e de seus alvos *BIM* e *BCL-6*, sem alterar os níveis de fosforilação de Foxo3a (MIYAGUCHI *et al.*, 2009). Contrastando esses dados, outro grupo demonstrou em fibroblastos que *FOXO3A* é um alvo de regulação positiva de p53 em resposta de agentes indutores de dano ao DNA (RENAULT *et al.*, 2011). Além disso, foi observado que Foxo3a pode levar a estabilização de p53, independentemente de sua função de transativação. A ativação de Foxo3a mantém p53 no citoplasma e induz apoptose de forma dependente de p53 e mediada por Puma e Bax (YOU *et al.*, 2006). Apesar da maioria dos trabalhos mostrarem que Foxo3a e p53 podem funcionar em conjunto, além das evidências relacionadas a vias de sinalização comuns aos fatores de transcrição e a funções muitas vezes sobrepostas, mais estudos ainda são necessários para entender os mecanismos de regulação entre tais proteínas.

1.6 Justificativa para o estudo

No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama são bastante elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%. Os avanços na identificação de novos marcadores de prognóstico e de novas modalidades terapêuticas nem sempre se traduzem no aumento da sobrevida global, principalmente em casos de tumores metastatizados. Uma das principais causas de óbitos em pacientes com essa neoplasia é a falha na resposta ao tratamento quimioterápico empregado atualmente. Nesse contexto, um aprofundamento dos estudos moleculares dos mecanismos de quimioresistência tem o potencial de identificar biomarcadores de prognósticos ou preditivos de resposta ao tratamento.

No câncer de mama, observamos um avanço terapêutico importante ao longo dos anos, com a descoberta de biomarcadores relacionados à predição de resposta à terapia hormonal e terapia biológica e, consequentemente, com o benefício clínico de pacientes que expressam os receptores hormonais e Her2. Contudo, pouco se sabe sobre os fatores preditivos de resposta aos agentes quimioterápicos utilizados no câncer de mama, como a doxo (LONNING, 2007). Isso se apresenta de forma mais relevante em pacientes com tumores que não expressam os receptores hormonais e Her2 (triplo-negativos), onde a única opção terapêutica permanece sendo a quimioterapia (DAWSON *et al.*, 2009). Até o presente momento, a influência das proteínas Survivina, XIAP, Foxo3a e FoxM1 no perfil de resistência de células derivadas de câncer de mama à doxo não foi investigado. Nesse contexto, se faz necessário um melhor entendimento dos mecanismos moleculares de quimioresistência no câncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel das proteínas antiapoptóticas Survivina e XIAP e dos fatores de transcrição Foxo3a e FoxM1 como potenciais biomarcadores de quimiorresistência no câncer de mama.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a capacidade da doxo em induzir morte celular nas linhagens celulares derivadas de câncer de mama.
- Avaliar se a doxo é capaz de modular a expressão das proteínas Survivina, XIAP,
 Foxo3a e FoxM1.
- Correlacionar a modulação das proteínas Survivina, XIAP, Foxo3a e FoxM1 com o perfil de sensibilidade à doxo.
- Analisar o papel de proteínas Survivina, XIAP, Foxo3a e FoxM1 na quimiorresistência através da avaliação do efeito da indução de sua superexpressão ou silenciamento na apoptose induzida pela doxo.
- Investigar o papel de Foxo3a e FoxM1 na regulação de Survivina e XIAP, através da avaliação do efeito da indução da superexpressão ou silenciamento dos fatores de transcrição na expressão de seus potenciais alvos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

As linhagens derivadas de carcinoma de mama MCF7 (ATCC[®], HTB-22[™]) e MDA-MB-231 (ATCC[®], HTB-26[™]) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) e DMEM (Gibco), respectivamente. Os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco). As células foram mantidas em estufa (Thermo Scientific) contendo 5% de CO₂ a 37°C e foram tripsinizadas (Tripsina 0.125%) duas vezes por semana para repique ou para o preparo dos experimentos, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Condições dos experimentos realizados com as linhagens celulares.

Experimento	Área (cm²)	N° células	Volume
Placa de 96 poços	0,32	1 x 10 ⁴	200 μl
Placa de 24 poços	1,88	5.8×10^4	500 μl
Placa de 12 poços	3,83	$1,2 \times 10^5$	1 ml
Placa de 6 poços	9,4	3×10^5	2 ml
Garrafa de 25	25	7.8×10^5	5 ml
Placa de petri 10	60,1	1.8×10^6	10ml
Garrafa de 75	75	$2,3 \times 10^6$	12 ml
Garrafa de 150	150	$4,7 \times 10^6$	20 ml

Densidade de células e volume de meio de cultura mais soro fetal bovino em relação à área da superfície para adesão celular.

A escolha dessas linhagens se deve ao fato de que a MDA-MB-231 apresenta um comportamento biológico mais agressivo e a MCF7, menos agressivo, no que diz respeito à invasividade e à capacidade de desenvolvimento de metástases (THOMPSON *et al.*, 1992; HENRIKSON *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2001; TAI *et al.*, 2003; NAGARAJA *et al.*, 2006),

além do fato de que ambas apresentam perfis diferentes de expressão de proteínas envolvidas no processo de apoptose, como a caspase-3 e a p53 (Figura 3.1). As células MCF7 não expressam a caspase-3 devido a uma deleção funcional de 47 pares de bases no éxon 3 do gene que codifica essa proteína (JANICKE *et al.*, 1998), Ao contrário, a MDA-MB-231 apresenta a expressão normal da caspase-3, cuja atividade proteolítica é capaz de mediar estímulos citotóxicos induzidos por agentes antitumorais (MANDLEKAR *et al.*, 2000). Enquanto a linhagem MCF7 tem a proteína p53 na sua forma selvagem, a MDA-MB-231 apresenta uma mutação missense no gene TP53 que gera uma proteína não-funcional (KATAYOSE *et al.*, 1995).

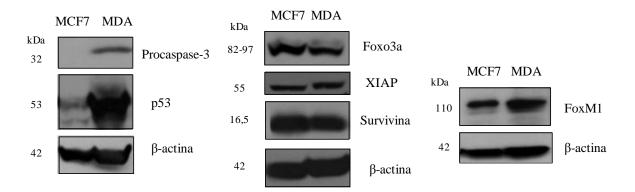


Figura 3.1: Perfil de expressão de p53, procaspase-3, XIAP, Survivina, Foxo3a e FoxM1 das linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231. As células MCF7 e MDA-MB-231 tiveram suas proteínas extraídas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. A expressão proteica foi avaliada por Western blotting.

As linhagens celulares também apresentam uma expressão diferente de ER e de Her2, que representam biomarcadores importantes para predição de resposta às terapias empregadas no tratamento do câncer de mama (FITZGIBBONS *et al.*, 2000). As células MCF7 são positivas para o ER e PR e expressam baixos níveis da proteína Her2. Por outro lado, a linhagem MDA-MB-231 não apresenta a expressão dessas moléculas, sendo um modelo para estudo de células triplo-negativas (GUO & SONENSHEIN, 2004;

KNUEFERMANN *et al.*, 2003). Além disso, as linhagens foram escolhidas por expressarem as proteínas de interesse para o presente estudo: XIAP, Survivina, Foxo3a e FoxM1 (Figura 3.1).

3.2 Genotipagem das linhagens celulares

As linhagens MCF7 e MDA-MB-231 tiveram seus genótipos determinados através da análise de seus perfis de polimorfismos STR (*short tandem repeats*) em locus humanos por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). As células foram centrifugadas e o DNA foi extraído pelo método DNAzol (DNAzol Reagent®, Invitrogen). As amostras de DNA foram enviadas ao Laboratório Sonda da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde todo o procedimento da genotipagem foi realizado. Nesse laboratório, foram avaliados dezesseis loci e comparados aos nove e onze loci previamente descritos no banco de dados do ATCC (*American Type Culture Collection*) para as linhagens MCF7 e MDA-MB-231, respectivamente. A Tabela 2 mostra que os perfis das linhagens obtidos após a genotipagem são compatíveis com os perfis descritos no banco de dados.

3.3 Detecção de contaminação por micoplasma por PCR semi-quantitativo

Como controle de qualidade dos cultivos celulares, as linhagens foram monitoradas quanto à infecção por micoplasma. As células foram centrifugadas e o DNA foi extraído pelo método DNAzol (DNAzol Reagent®, Invitrogen). A partir de 100ng do DNA derivado das linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231, foi realizado um PCR para detecção de micoplasma, como previamente descrito (UPHOFF & DREXLER, 2005). Posteriormente,

os amplicons foram submetidos a uma corrida em gel de agarose 1.5% para visualização e análise das bandas coradas com brometo de etídeo. Ao início do estudo, as linhagens apresentavam contaminação por micoplasma, como mostra a Figura 3.2. O antibiótico PlasmocinTM (InvivoGen) foi utilizado na concentração de 25μg/ml para descontaminação das culturas celulares positivas para micoplasma.

Tabela 2: Perfil de polimorfismos STR das linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231.

		MCF7		MDA-MB-231	
LOCUS	ALELO	ATCC	INCA	ATCC	INCA
D2S1338	1		23	21	21
	2		21	20	20
D19S433	1		14	11	11
	2		13		
CSF1PO	1	10	10	13	13
	2			12	12
TPOX	1	12	12	9	9
	2	9	9	8	8
TH01	1	6	6	9,3	9,3
	2			7	7
\mathbf{vWA}	1	15	15	18	18
	2	14	14	15	15
D16S539	1	12	12	12	12
	2	11	11		
D7S820	1	9	9	9	9
	2	8	8	8	8
D13S317	1	11	11	13	13
	2				
D5S818	1	12	12	12	12
	2	11	11		
FGA	1		25		23
	2		23		22
D3S1358	1		17		16
	2		16		
D18S51	1		14		16
	2				11
D8S1179	1		14		13
	2		10		
D21S11	1		30		33,2
	2				
Amelogenina	1	X	X	X	X
	2	X	X	X	X

As linhagens celulares tiverem seu DNA extraído e genotipado através da análise de seus perfis de polimorfismos STR em locus humanos por PCR. STR: *short tandem repeats*; PCR: reação de cadeia da polimerase.

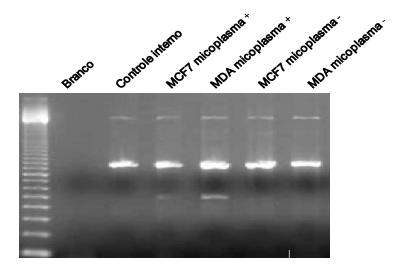


Figura 3.2: Detecção de contaminação das linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231 por micoplasma por PCR semi-quantitativo. O PCR para detecção do micoplasma foi realizado a partir de 100ng de DNA derivado das linhagens. As células positivas para micoplasma foram expostas ao antibiótico PlasmocinTM para descontaminação.

3.4 Tratamento com a doxorrubicina (doxo)

As linhagens celulares foram tratadas com o quimioterápico doxo (Rubidox®, Bergamo) em concentrações e tempos variados (Figura 3.3). Diluições seriadas da solução estoque da doxo, preparadas no momento da utilização, foram realizadas com o meio de cultura correspondente a cada linhagem. Com exceção da concentração de 5 μM que foi testada para fins mecanísticos, as células foram expostas a concentrações de doxo empregadas clinicamente (GEWIRTZ, 1999), de forma que os dados obtidos podem ser transpostos para o cenário clínico. Em todos os experimentos onde as células foram submetidas ao tratamento com a doxo, tanto o sobrenadante quanto a fração aderida foram coletados.

3.5 Ensaio de MTT: avaliação da citotoxicidade induzida pela doxo

Esse ensaio foi utilizado para avaliar as alterações na viabilidade celular mediada pelo quimioterápico doxo nas linhagens celulares escolhidas. O método mede a atividade da

enzima desidrogenase mitocondrial, baseando-se na capacidade de as células viáveis reduzirem o sal MTT 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio brometo em um produto formazana, formando um precipitado de coloração roxa (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma concentração de 10⁵/ml, utilizando triplicatas tanto para o controle (sem adição de droga) quanto para todas as concentrações da droga. O plaqueamento ocorreu no dia anterior à adição da droga, a fim de que houvesse tempo para que as células aderissem na placa. No dia seguinte, foram adicionados 200uL de droga mais meio suplementado com SFB e L-glutamina (2mM) e as placas foram mantidas na estufa a 37°C contendo 5% CO₂ por 24, 48 e 72h. Quatro horas antes do término desses tempos, foram adicionados 20μl de MTT (5mg/ml em PBS – solução salina de fosfato) e as placas voltaram para a estufa pelo tempo restante, protegidas de luz. Ao término da incubação, foram retirados 180μl do sobrenadante e depois, adicionados 150μl de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazana. A densidade ótica foi analisada por espectrofotometria (DTX 800 Multimode Detector; Beckman Coulter) no comprimento de onda de 492nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram calculados através das médias dos percentuais de viabilidade celular de cada concentração, obtidas nos três ensaios.

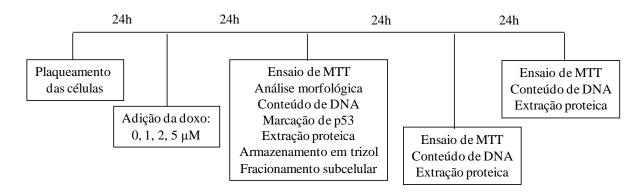


Figura 3.3: Figura esquemática do tratamento das linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231 com a doxo.

3.6 Análise morfológica da perda da adesão celular induzida pela doxo

Uma das características observadas quando células aderentes entram no processo de morte celular é a perda da adesão ao substrato (LING *et al.*, 2004). Dessa forma, a morte celular induzida pela doxo foi avaliada através da contagem de células não aderidas. Um total de 2,3 x 10⁶ células foi plaqueado em garrafas médias e deixadas aderir por 24h, quando então foi adicionada a doxo. A morfologia das células foi observada no microscópio ótico (Nikon Eclipse TS100) e fotografada por uma câmera acoplada ao microscópio (Digital Sight DS-2 Mv, Nikon). O sobrenadante foi retirado e centrifugado e as células presentes no sobrenadante foram contadas em uma Câmara de Neubauer, utilizando o microscópio ótico. Os experimentos foram realizados em triplicata e o percentual de células não aderidas foi quantificado, comparando-se a quantidade de células presentes no sobrenadante com a quantidade de células que foi inicialmente plaqueada.

3.7 Avaliação da fragmentação do DNA induzida pela doxo, por citometria de fluxo

Um total de 7,8 x 10⁵ células foi plaqueado 24h antes e incubado em garrafas pequenas com ou sem doxo. Após 24, 48 e 72h, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS, centrifugadas (750g, 5min, aceleração e desaceleração 5, Beckman Coulter) e transferidas para tubos de citômetro. Foram adicionados 500μl de RNAse (ribonuclease A 100 μg/ml diluída em tampão citrato 40mM) e 500μl da solução de iodeto de propídeo (PI) (50 μg/ml PI diluído em tampão citrato 4mM e 0,3% Triton X-100) ao pellet e os tubos foram incubados por 15 min à temperatura ambiente, protegidos de luz. Para avaliação do conteúdo de DNA, foram adquiridos 10.000 eventos por amostra em citômetro de fluxo

(Cyan ADP; Dako) e a análise dos dados foi realizada utilizando o software Summit v4.3. A fragmentação do DNA induzida pela doxo foi avaliada através do aparecimento da população em sub-G0/G1. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8 Marcação da proteína p53 por citometria de fluxo

As células MCF7 foram plaqueadas previamente à adição das drogas na quantidade de 7,8 x 10⁵ por garrafa. Após 24h de incubação com os quimioterápicos, foram tripsinizadas, lavadas com PBS, centrifugadas (750g, 5 min, aceleração e desaceleração 5, Beckman Coulter) e transferidas para os tubos de citômetro. Primeiramente, foram adicionados 500μl de solução de lise 10% (BD FACSTM Lysing Solution) aos tubos, para permeabilização das células. Após 10 min, as células foram lavadas com PBS/Tween20 0,5% e marcações inespecíficas foram bloqueadas por 15 min com PBS/SFB 2%. As células foram centrifugadas e aos tubos, foram adicionados 5μl do anticorpo anti-p53 (1:50; Dako), seguido de 5μl do anticorpo secundário anti-mouse Alexa488 (1:500; Invitrogen). Após 30 min de incubação, as células foram submetidas a duas lavagens com PBS/Tween 0,5%, seguidas de centrifugações. Por fim, as células foram fixadas com PBS/formaldeído 1% e a leitura, realizada no citômetro de fluxo (Cyan ADP; Dako). A análise dos dados adquiridos foi realizada através do software Summit v4.3 e a expressão de p53 foi estimada através do percentual de células com marcação positiva.

3.9 Detecção da ativação de caspases por Western blotting

Para verificar se a doxo seria capaz de ativar as caspases-3, -7 e -9 nas linhagens celulares, a técnica de Western blotting foi utilizada, como previamente descrito (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2011a). Os anticorpos primários utilizados se encontram dispostos na Tabela 3. A proteína β-actina foi utilizada como controle constitutivo dos experimentos. A ativação das caspases foi avaliada pela diminuição dos níveis das procaspases e/ou detecção das bandas referentes às caspases ativadas.

Tabela 3: Painel de anticorpos primários utilizados na técnica de Western blotting.

Anticorpo primário	Catálogo	Isotipo	(µl/ml TBS Leite)	Fabricante
Caspase-3	610322	Mouse	1:1000	BD Biosciences
Caspase-7	MAB823	Mouse	1:1000	R&D Systems
Caspase-9	MAB8301	Mouse	1:1000	R&D Systems
β -actina	A5441	Mouse	1:5000	Sigma-Aldrich
Survivina	AF886	Rabbit	1:1000	R&D Systems
XIAP	AF8221	Goat	1:2000	R&D Systems
P53	M 7001	Mouse	1:500	Dako
Foxo3a total	#9467	Rabbit	1:500	Cell Signaling
Fosfo-Foxo3a	#9466	Rabbit	1:500	Cell Signaling
Bim	Aap-330	Rabbit	1:1000	Stressgen
Akt total	#9272	Rabbit	1:500	Cell Signaling
Fosfo-Akt	#4058	Rabbit	1:500	Cell Signaling
Foxo1	#2880	Rabbit	1:500	Cell Signaling
FoxM1	#3948	Rabbit	1:500	Cell Signaling
Lamina B	NA12	Mouse	1:500	Calbiochen
Hsc70	Sc1059	Goat	1:5000	Santa Cruz Biotechnology

BD Bioscience: San Jose, CA, US; Cell Signaling: Danvers, MA, US; Dako: Glostrup, DK R&D Systems: Minneapolis, MN, US; Santa Cruz Biotechnology: Santa Cruz, CA, US;

Sigma-Aldrich: St Louis, MO, US; Stressgen: Brussels, BE

3.10 Detecção da expressão das proteínas por Western blotting

A expressão das proteínas Survivina, XIAP, p53, Foxo3a, Foxo3 fosforilada, Bim, Akt, Akt fosforilada, Foxo1, FoxM1, Lamina B e Hsc70 nas células MCF7 e MDA-MB-231 também foi avaliada pela técnica de Western blotting.

As linhagens foram plaqueadas em garrafas médias sem ou com a droga, em concentrações e tempos variados. Depois do término do tratamento, foram tripsinizadas, centrifugadas (750g, 5 min, aceleração e desaceleração 5, Beckman Coulter), lavadas 3x com PBS e tiveram suas proteínas extraídas (lisado). O lisado foi feito através da adição de 20µl de tampão de ressuspensão (40mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM EDTA) e 20µl de SDS (solução a 10%), além dos inibidores de protease (Roche) e fosfatase (PhosSTOP, Roche) e posterior incubação a 100°C por 15 min para desnaturação proteica. A quantificação das proteínas existentes em cada pellet foi realizada através do Kit BioRad®, baseado no método de Lowry (LOWRY et al, 1951). Depois de dosadas, foram adicionados 10µl de tampão loading (115mM Tris-HCl pH 6.8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100mM de 2-βmercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol) às amostras. Posteriormente, 80µg de proteínas foram submetidas a uma corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (Acrilamida/ Bis-Acrilamida 30%; 25% H₂O; 115mM tampão Tris-HCl pH 8.8; TEMED; APS). Após 18h de corrida a 80V com um tampão de corrida (Tris 25mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; pH 8,4) diluído 5x, as proteínas foram transferidas (Tampão de transferência: 25mM Tris, 0,2M Glicina, metanol 20%) para uma membrana de nitrocelulose (Hybond). A transferência ocorreu em uma cuba úmida a 100 V, de 1,5 a 3 horas (dependendo do tamanho da proteína de estudo) e o padrão de corrida foi visualizado com Ponceau Red (Ponceau Red 0,2%; ácido tricloroacético 3%). O bloqueio foi realizado por 2h com uma solução a 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-Tween (10mM Tris-HCl, pH 8,0;

150mM de NaCl; 0,2% Tween-20) por 1h e lavada 3 vezes com TBS-Tween 0,2% por 5 min. Depois, a membrana foi marcada com anticorpos primários (Tabela 3), individualmente e incubada a 4°C, *overnight*. A membrana, então, foi submetida a três lavagens com TBS-Tween 0,2% por 5 min e marcada com anticorpos secundários anti-goat (NB7362, Novus Technologies; Littleton, CO, US), anti-mouse ou anti-rabbit (RPN2108, GE Healthcare; Buckinghamshire, UK) conjugados a HorseRadish-Peroxidase à temperatura ambiente por 1h, sob agitação. Para revelação da quimioluminescência (Máquina Kodak X-OMAT), foi utilizado o kit de revelação ECL (ECL Western Blotting Analysis System; GE Healthcare), sendo a membrana exposta a um filme de mamografia (Kodak Diagnostic Film/Min-R 18x24 cm) ou a um filme ultrasensível (GE Healthcare). A proteína β-actina foi utilizada como controle constitutivo dos experimentos. A análise da densitometria das bandas foi realizada através do software VisionWorks.

3.11 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real pelo método Taqman (TaqMan[®] Gene Expression Assay - Applied Biosystems) foi utilizada para analisar os níveis de RNAm de Survivina, de XIAP e de Foxo3a nas linhagens celulares, antes e após o tratamento com a doxo. As células foram tripsinizadas, lavadas três vezes com PBS e tiveram seu RNA extraído por Trizol (Trizol® Reagent; Invitrogen) e quantificado (Nanodrop® ND-1000). Posteriormente, foi realizada a síntese de c-DNA pelo método Superscript (Superscript[®] II Reverse Transcriptase; Invitrogen) a partir de 2μg de RNA. As sondas específicas para Survivina (Hs000153353_m1), XIAP (Hs01597783_m1) e Foxo3a (Hs00921424_m1) utilizadas nos experimentos foram adquiridas pela Applied Biosystems. Como controle endógeno da

reação, foi utilizada a sonda para β -actina (Hs99999903_m1; Applied Biosystems) e a quantificação relativa foi baseada no método $\Delta\Delta$ Ct.

3.12 Fracionamento subcelular

O fracionamento subcelular foi realizado nas células expostas ou não à doxo para verificar se ocorria uma alteração na localização de Foxo3a mediante o estímulo apoptótico. A separação das frações nuclear e citoplasmática foi viabilizada pelo kit NE-PER (NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents; Thermoscientific) e os níveis de Foxo3a total foram avaliados em cada fração subcelular pela técnica de Western blotting. Para normalização da quantidade de proteínas na fração nuclear, foi utilizada a proteína Lamina-B e para a fração citoplasmática, a proteína Hsc70.

3.13 Vetores plasmidiais

Os vetores pcDNA3-myc e pcDNA3-myc-survivina foram cedidos pelo Dr. John Reed (Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA) (TAMM *et al.*, 1998). Os plasmídeos foram submetidos à eletroporação em bactérias *Escherichia coli* competentes. As bactérias eletroporadas foram mantidas em meio LB Broth Base (Invitrogen) por 1 hora a 37° C no agitador. A cultura de bactérias foi plaqueada em meio LB ágar com ampicilina (100 µg/mL). Após 16h, duas colônias formadas foram selecionadas a partir de cada vetor e crescidas em LB líquido com ampicilina. No dia seguinte, o DNA plasmidial foi extraído das respectivas colônias utilizando o kit de mini-prep (Plasmid Mini Kit, Qiagen). Os plasmídeos foram verificados através da digestão com enzimas de restrição específicas

(PvuII, EcoRI e XhoI) e corrida em gel de agarose 1% em TAE (Tris-Acetato-EDTA). O DNA plasmidial foi sequenciado 5'utilizando os primers TCGATCGTCGACATGGAACAG-3' e 5'-AAAGCATTCGTCCGGTTGC-3' sequência do gene da Survivina proveniente do sequenciamento foi alinhada à sequência depositada em banco de dados através do software BioEdit v7.1.3. As bactérias contendo os plasmídeos verificados foram expandidas em meio LB contendo ampicilina para extração dos plasmídeos por maxi-prep (Hispeed Plasmid Maxi Kit; Qiagen) e utilização nos experimentos de transfecção das culturas celulares. A clonagem molecular dos vetores pcDNA3 e pcDNA3-FoxM1 foi realizada no laboratório do Dr. Kwok-Ming Yao (The University of Hong Kong, Hong Kong, China) (MA et al., 2005).

3.14 Transfecção plasmidial

Após confirmação da identidade e expansão dos plasmídeos, as células MCF7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de petri de 10 cm de forma que houvesse 90% de confluência pós-adesão (Figura 3.4).

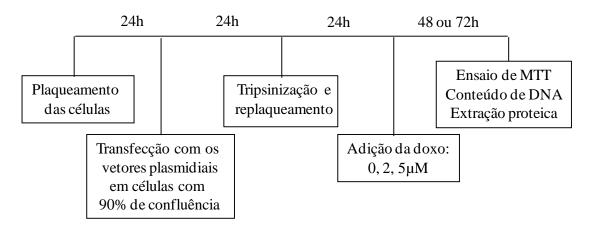


Figura 3.4: Esquema da transfecção das linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231 com os vetores plasmidiais e posterior exposição à doxo.

No dia seguinte, as células foram transfectadas com 20μg dos vetores plasmidiais em presença de meio OPTI-MEM (OPTI-MEM[®] I Reduced Serum Media, Invitrogen), mediante uma razão de 1:1 de DNA para Lipofectamina2000 (Invitrogen). Depois de 24h de transfecção, foram tripsinizadas e replaqueadas para adesão e exposição à doxo por 48 ou 72h. A eficiência de transfecção foi avaliada por citometria de fluxo, através da quantificação do percentual de células transfectadas com o vetor pLIRES-EGFP. As diferenças no perfil de sensibilidade à doxo entre as células transfectadas com o vetor controle ou com o vetor codificando a Survivina e FoxM1 foram avaliadas pelo ensaio de MTT, por citometria de fluxo e através da ativação de caspases por Western blotting.

3.15 Silenciamento gênico da XIAP e da Survivina por interferência de RNA (RNAi)

A fim de investigar o efeito da inibição de XIAP e da Survivina na sensibilidade à doxo em células de câncer de mama, a técnica de RNAi foi utilizada. As células MCF7 foram transfectadas com o siRNA controle negativo – scramble (4390843; Ambion), com o siRNA para XIAP (4392420; ID:s1459; Ambion) e/ou com o siRNA para Survivina (4392420; ID:s1455; Ambion), utilizando a Lipofectamina RNAimax (Invitrogen). Para análise da eficácia do silenciamento, foi utilizada a técnica de Western blotting. Os complexos para a transfecção foram preparados em placas de 6 poços, onde foram adicionadas as células MCF7, de acordo com o modelo de transfecção reversa proposto para essa linhagem pelo fabricante (Figura 3.5). Em cada poço, foram adicionados 3x 10⁵ células em 2,5mL, 5μL de Lipofectamina RNAimax, 3μL de siRNA (30pmol) e OPTI-MEM em quantidade suficiente para 3mL finais (concentração final de siRNA: 10nM). Após 24h de transfecção, a doxo foi adicionada ao meio e mantida na cultura celular por mais 24 e 48h.

As diferenças no perfil de sensibilidade à doxo entre as células transfectadas com o siRNA para XIAP e/ou Survivina e com o scramble foram avaliadas pelo ensaio de MTT, por citometria de fluxo e através da ativação de caspases por Western blotting.

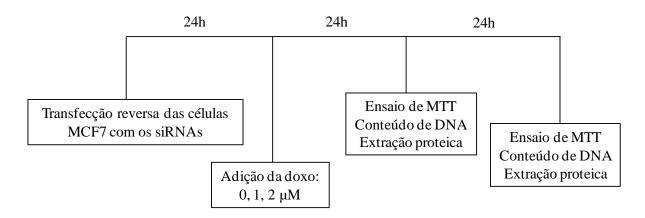


Figura 3.5: Esquema da transfecção da linhagem celular MCF7 com o siRNA controle (scramble), siRNA para XIAP e/ou siRNA para Survivina e posterior exposição à doxo.

3.16 Análises Estatísticas

O teste t *student* foi utilizado para avaliar as diferenças entre os dados obtidos com as células tratadas e não tratadas, utilizando o *software* Graph Pad Prism 4.0. Para todas as análises foi utilizado o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando p<0.05.

4. DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO

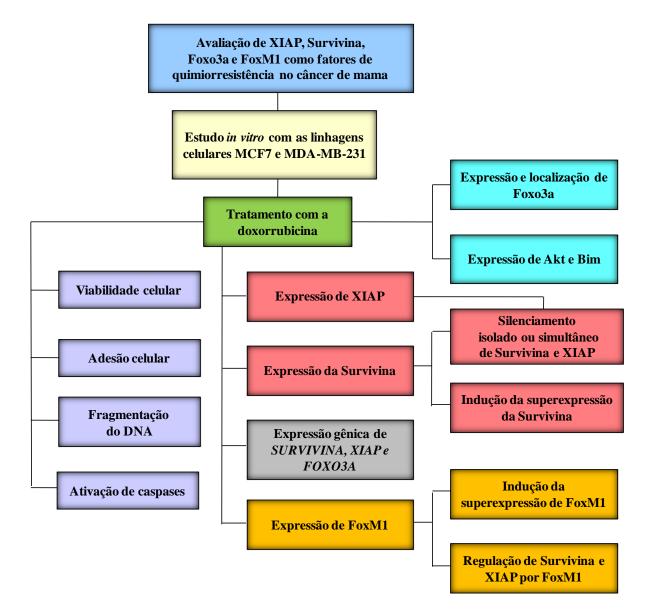


Figura 4.1: Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo.

5. RESULTADOS

5.1 A doxo inibe a viabilidade celular nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231

O primeiro passo do trabalho foi avaliar como as linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231 respondiam ao tratamento com a doxo. A linhagem MCF7 apresenta caracteristicas de células não-invasivas, ao passo que a MDA-MB-231, de células invasivas (THOMPSON et al., 1992; HENRIKSON et al., 1999; CHEN et al., 2001; TAI et al., 2003; NAGARAJA et al., 2006), o que poderia conferir a elas diferentes sensibilidades ao quimioterápico. As células foram expostas a uma faixa de concentração da droga que engloba doses empregadas clinicamente, bem como doses que conhecidamente induzem apoptose (GEWIRTZ, 1999; KNUEFERMANN et al., 2003). A Figura 5.1 mostra que a doxo diminuiu a viabilidade celular (p<0.05) de maneira tempo-dependente nas células MCF7 (A) e de maneira tempo e dose-dependente nas células MDA-MB-231 (B). Comparando com o controle de células não tratadas, o percentual máximo de inibição da viabilidade atingido foi de 70% nas células MCF7 e 90% nas células MDA-MB-231, sendo que as duas linhagens exibiram um perfil similar de sensibilidade à doxo em 24h de exposição. Esses dados mostram que a doxo é capaz de diminuir a viabilidade celular em ambas as linhagens.

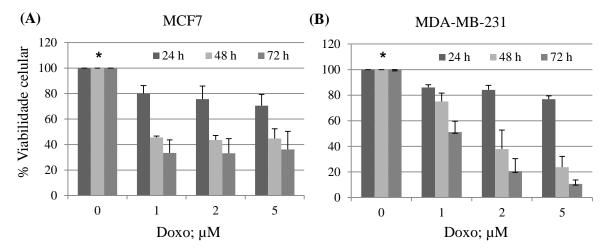


Figura 5.1: Perfil de sensibilidade das células MCF7 e MDA-MB-231 ao tratamento com concentrações crescentes da doxorrubicina (doxo), analisado através do ensaio de MTT. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram colocadas para aderir por 24 h e expostas à doxo por 24, 48 e 72h. As células tratadas foram comparadas às não expostas ao quimioterápico. Os resultados estão expressos através da média ± desvio padrão de três experimentos independentes.*p<0.05, Teste t student.

5.2 A doxo induz fragmentação do DNA nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231

Devido à possibilidade de a diminuição da viabilidade celular, observada após o tratamento das células com a doxo, ser devido à morte celular ou à inibição do crescimento celular, a morte celular foi analisada através da avaliação da fragmentação do DNA. As Figuras 5.2A e 5.2B mostram que a doxo foi capaz de induzir fragmentação no DNA, como avaliado através do aumento do percentual de células na fase sub-G0/GI. A morte celular ocorreu de forma tempo-dependente em ambas as linhagens e dose-dependente apenas nas células MDA-MB-231, assim como observado pelo ensaio de MTT. Esses resultados sugerem que a doxo induz morte celular nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231.

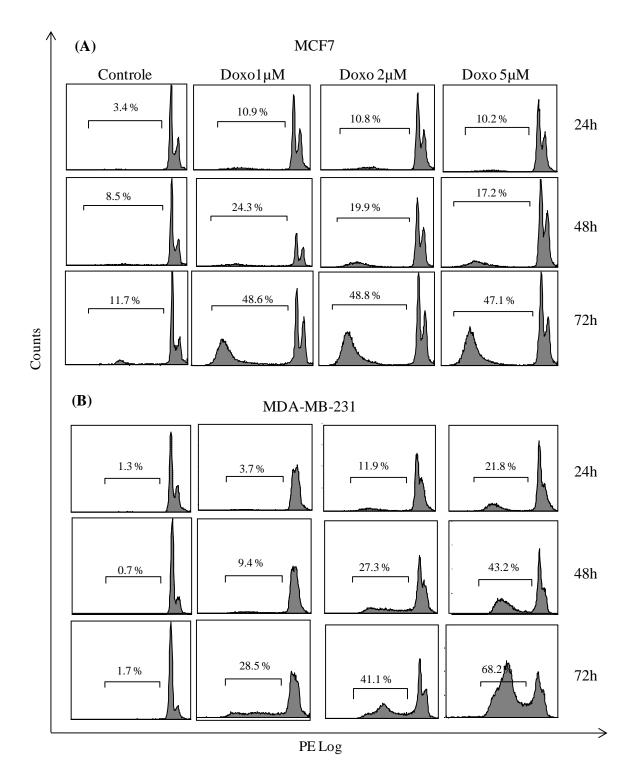


Figura 5.2: Perfil de indução de morte celular pela doxorrubicina (doxo) nas células MCF7 e MDA-MB-231 através da análise da população em sub-G0/G1, por citometria de fluxo. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas a concentrações crescentes da doxorrubicina (doxo) 24, 48 e 72h e tiveram seus conteúdos de DNA avaliados. Os histogramas sãoo representativos de três experimentos independentes.

5.3 A doxo induz alterações morfológicas nas linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231

O próximo passo do estudo foi avaliar as alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com a doxo nas células derivadas de câncer de mama. Dessa forma, as células foram fotografadas após o tratamento com a doxo por 24h e foi realizada a quantificação do percentual de células não aderidas, visto que a perda da adesão à garrafa é um dos efeitos indicativos de indução de morte celular em células aderentes (LING *et al.*, 2004). As Figuras 5.3A e 5.3B mostram que a exposição das células à doxo induziu a retração celular, alteração morfológica característica de morte celular por apoptose (GRIVICICH *et al.*, 2007). Além disso, a doxo levou ao aumento do percentual de células não aderidas à garrafa, efeito que foi bem menos pronunciado nas células MCF7 do que na MDA-MB-231 (Figura 5.3C e 5.3D). Esses dados indicam que o tratamento com a doxo induz alterações morfológicas importantes nas linhagens celulares.

5.4 A doxo induz apoptose nas linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231

O próximo passo do trabalho foi investigar se a morte induzida pela doxo era por apoptose. Assim, a expressão das caspases-3, -7 e -9 foi avaliada por Western blotting e sua ativação foi identificada através da diminuição nos níveis das procaspases-3, -7 e -9. A Figura 5.4 mostra que, após o tratamento com concentrações crescentes da doxo por 24, 48 e 72h, houve a diminuição das procaspases-7 e -9 nas células MCF7 (A) e das procaspases-3 - 9 na MDA-MB-231 (B). Esses resultados indicam que a doxo induz apoptose mediada por caspases em ambas as linhagens celulares de câncer de mama.

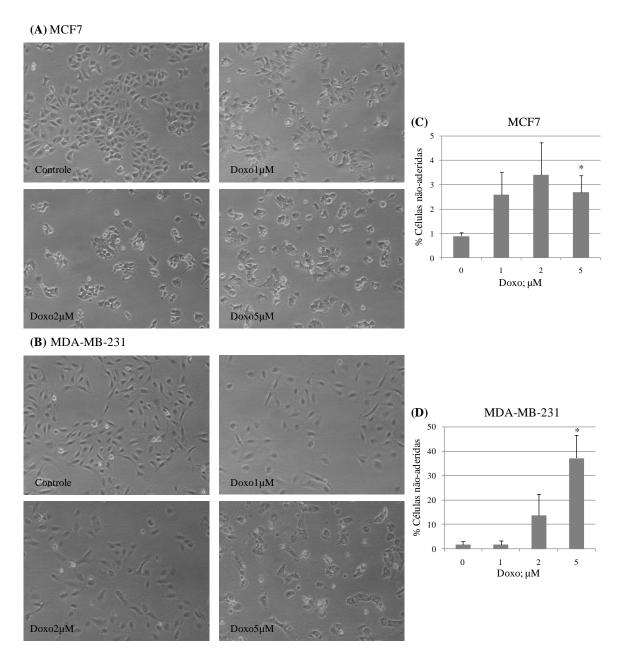


Figura 5.3: Análise morfológica e quantitativa da indução de morte celular após o tratamento das células MCF7 e MDA-MB-231 com concentrações crescentes de doxo por 24h. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram fotografadas com uma objetiva de 20x. As células presentes no sobrenadante antes e após o tratamento com a doxo foram quantificadas. Os resultados estão expressos através da média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *p< 0.05; Teste t student.

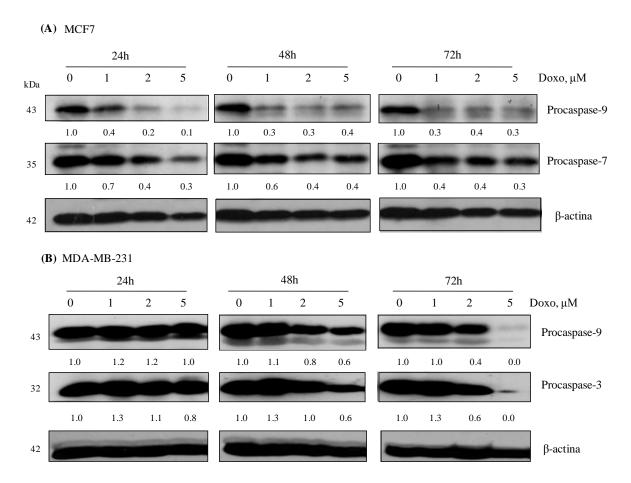


Figura 5.4: Indução de apoptose pela doxorrubicina (doxo) através da avaliação dos níveis de procaspases nas células MCF7 e MDA-MB-231, por Western blotting. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas às concentrações de 1, 2 e 5μ M de doxo por 24, 48 e 72h e tiveram suas proteínas extraídas para corrida eletroforética e análise por Western blotting. Os valores situados abaixo dos blots indicam os níveis de expressão das proteínas de interesse, analisados através da densitometria das bandas e normalizados em relação aos níveis de β -actina. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

5.5 A apoptose induzida pela doxo ocorre em células com diferentes status de p53

Considerando que o acúmulo da proteína p53 é um dos mecanismos de ação da doxo (ZILFOU & LOWE, 2009), nós investigamos se a p53 poderia ser ativada pela droga. A análise realizada por citometria de fluxo revelou que a doxo induziu a estabilização da expressão da proteína p53 nas células MCF7, que apresentam a p53 na sua forma selvagem (KATAYOSE *et al.*, 1995). Em 24h, 27 e 44% das células apresentaram níveis maiores

dessa proteína após exposição às concentrações de doxo de 1 e 5μM, respectivamente (Figura 5.5).

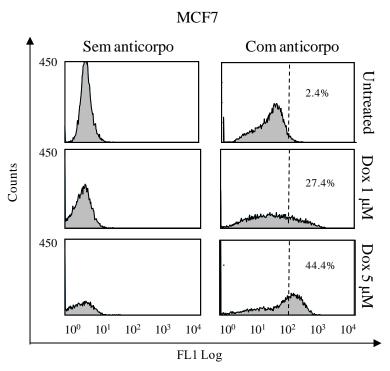


Figura 5.5: Estabilização da expressão da proteína p53 nas células MCF7 por citometria de fluxo. As células foram expostas a concentrações crescentes de doxo por 24h e foram submetidas ao protocolo de marcação de proteínas intracelulares, como descrito em "Materiais e Métodos". A figura é representativa de três experimentos independentes.

Para confirmação desse resultado, o mesmo experimento foi realizado por Western blotting, técnica padrão-ouro para expressão de proteínas. A Figura 5.6A mostra que houve o aumento da expressão da proteína p53 nas células MCF7 em todos os tempos de exposição e concentrações testadas da droga. Como mostrado na Figura 5.6B, esse mesmo efeito não foi observado nas células MDA-MB-231, que apresentam a forma mutada e não-funcional da proteína, que se acumula na célula (KATAYOSE *et al.*, 1995). Esses resultados sugerem que a doxo é capaz de induzir apoptose em linhagens celulares com diferentes *status* de expressão da proteína p53.

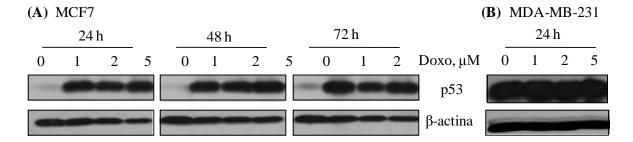


Figura 5.6: Expressão da proteína p53 nas células MCF7 e nas células MDA-MB-231, por Western blotting. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas a concentrações crescentes de doxorrubicina (doxo) por 24, 48 e 72h e tiveram suas proteínas extraídas e submetidas à corrida eletroforética. A figura é representativa de três experimentos independentes.

5.6 O tratamento das células MCF7 e MDA-MB-231 com a doxo resulta na diminuição nos níveis da Survivina

Estudos publicados pelo nosso grupo (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2011b; SOUZA *et al.*, 2011) e por outros (CHANDELE *et al.*, 2004; AZUHATA *et al.*, 2006) mostraram que a expressão da Surviviva é capaz de proteger células tumorais de estímulos apoptóticos, prevenindo a ação citotóxica de agentes quimioterápicos. Dessa forma, o próximo objetivo do trabalho foi investigar se ocorria a modulação da expressão da Survivina mediante o estímulo apoptótico induzido pela doxo. A exposição das células MCF7 à doxo diminuiu os níveis da Survivina nas concentrações de 2 e 5μM, porém não alterou sua expressão na concentração de 1μM (Figura 5.7A). Nas células MDA-MB-231, a redução nos níveis da Survivina ocorreu somente após 72h de exposição à doxo (Figura 5.7B). A diminuição dos níveis da Survivina ocorreu principalmente nas concentrações e tempos de exposição à doxo onde ocorre a diminuição de caspases e citotoxicidade mais pronunciada. Diferentemente das células MCF7, foi observado um aumento na expressão da Survivina, quando as células MDA-MB-231 foram expostas à concentração de 1μM de doxo, principalmente no tempo de 48h (Figura 5.7B). Esses dados mostram que a expressão

da Survivina pode ser modulada negativamente ou positivamente, dependendo da concentração da droga, e que está associada ao perfil de sensibilidade das células a apoptose induzida pela droga.

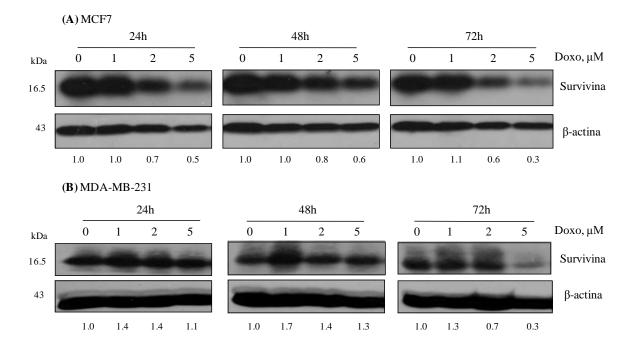


Figura 5.7: Perfil de expressão da Survivina nas células MCF7 e MDA-MB-231, por Western blotting. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas a concentrações crescentes de doxorrubicina (doxo) por 24, 48 e 72h e tiveram suas proteínas submetidas à corrida eletroforética. Os valores situados abaixo dos blots indicam os níveis de expressão da proteína de interesse, analisados através da densitometria das bandas e normalizados em relação aos níveis de β -actina. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

5.7 A doxo reduz os níveis de RNAm da Survivina nas células MCF7 e MDA-MB-231

Visto que a regulação da expressão da Survivina é modulada por mecanismos transcricionais e pós-traducionais (ZHANG *et al.*, 2006), nós avaliamos se a doxo seria capaz de alterar os níveis de RNAm da Survivina. Como mostrado nas Figuras 5.8A e 5.8B, o tratamento das linhagens celulares com a doxo resultou na redução estatisticamente significativa dos níveis de RNAm da *SURVIVINA* (p< 0.05). Esses dados sugerem que a

Survivina seja modulada por algum mecanismo de regulação transcricional, frente ao tratamento com a doxo.

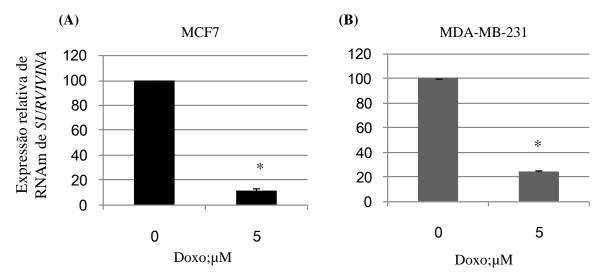


Figura 5.8: Perfil de expressão dos níveis de RNAm da *SURVIVINA*, por PCR em tempo real. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas à doxorrubicina (doxo) por 24h, quando tiveram seu RNA extraído por Trizol e o cDNA sintetizado pelo método Superscript. A expressão do RNAm para β -ACTINA foi utilizada como controle interno para normalização dos níveis do RNAm para *SURVIVINA*. Os resultados estão expressos através da média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *p< 0.05; Teste t *student*.

5.8 A exposição das células MCF7 e MDA-MB-231 à doxo reduz os níveis protéicos e de RNAm da XIAP

Considerando que a Survivina é capaz de estabilizar a expressão de XIAP (DOHI *et al.*, 2004), o próximo passo foi investigar se ocorria modulação da XIAP quando as células eram expostas à doxo. A expressão proteica de XIAP foi modulada negativamente em todas as concentrações de doxo às quais as linhagens celulares foram expostas (Figura 5.9A e 5.9B). De maneira consistente, os níveis de RNAm da *XIAP* também foram reduzidos em ambas as linhagens (Figura 5.10A e 5.10B). Esses achados revelam uma regulação negativa da expressão da XIAP, modulada, pelo menos em parte, por mecanismos transcricionais.

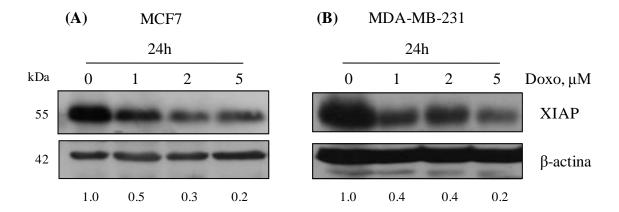


Figura 5.9: Perfil de expressão da XIAP nas células MCF7 e MDA-MB-231 por Western blotting. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas a concentrações crescentes de doxorrubicina (doxo) por 24h e tiveram suas proteínas extraídas e submetidas à corrida eletroforética. Os valores situados abaixo dos blots indicam os níveis de expressão da proteína de interesse, analisados através da densitometria das bandas e normalizados em relação aos níveis de β -actina. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

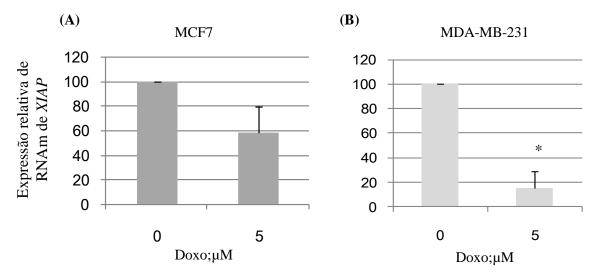


Figura 5.10: Perfil de expressão dos níveis de RNAm da XIAP, por PCR em tempo real. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas à doxorrubicina (doxo) por 24h e tiveram seu RNA extraído por Trizol e cDNA sintetizado pelo método Superscript. A expressão do RNAm para β -ACTINA foi utilizada como controle interno para normalização dos níveis do RNAm para XIAP. Os resultados estão expressos através da média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *p< 0.05; Teste t student.

5.9 A indução da superexpressão da Survivina nas células MCF7 e MDA-MB-231 não confere resistência ao tratamento com a doxo

Evidências mostram que a superexpressão da Survivina é capaz de proteger células derivadas de câncer de mama da apoptose induzida por agente antitumorais, como o tamoxifeno (MORIAI et a., 2008). Dessa forma, o próximo objetivo do nosso estudo foi investigar se a indução da superexpressão da Survivina poderia conferir resistência das células MCF7 e MDA-MB-231 aos estímulos mediados pela doxo. Inicialmente, avaliamos a eficiência de transfecção das linhagens celulares através da incorporação do plasmídeo fluorescente pLIRES-EGFP e posterior análise por citometria de fluxo. A observação dos histogramas permite sugerir que houve incorporação do plasmídeo fluorescente em 87% das células MDA-MB-231 e 94% das células MCF7 após 24h de transfecção, utilizando uma razão 1:1 de DNA para Lipofectamina2000 (Figura 5.11).

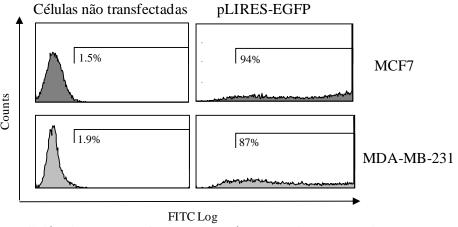


Figura 5.11: Eficiência de transfecção das células MCF7 e MDA-MB-231 através da incorporação do vetor fluorescente pLIRES-EGFP, por Lipofectamina2000. As células foram tripsinizadas após 24h de transfecção e adquiridas em citômetro de fluxo para estimativa do percentual de incorporação do vetor. Os histogramas são representativos de dois experimentos independentes.

Mediante uma eficiência de transfecção satisfatória, realizamos uma cinética de transfecção com o vetor pcDNA3-myc-Survivina e com o vetor vazio (pcDNA3-myc) e verificamos que a superexpressão da Survivina é mantida ao longo de uma exposição à droga por 72h (dados não mostrados), o que implica em cinco dias de manutenção da sua superexpressão pós-transfecção (ver esquema da Figura 3.4). Diante desses resultados, o próximo passo foi avaliar o impacto da superexpressão da Survivina na resposta de linhagens celulares de câncer de mama ao tratamento com a doxo. Considerando que a Survivina tem uma regulação ciclo-dependente e que sua expressão varia conforme a progressão no ciclo celular (Li et al., 1998), primeiramente nós comparamos as células transfectadas com ambos os vetores quanto ao perfil de ciclo celular. Quando comparadas às transfectadas com o vetor vazio, as células superexpressando Survivina (Figuras 5.12A e 5.13A) não apresentaram alterações no perfil de distribuição de fases no ciclo celular, indicando que a superexpressão da Survivina não interferiu na progressão das linhagens celulares no ciclo celular (Figuras 5.12B e 5.13B). Após o tratamento com a droga, observamos que as células superexpressando Survivina apresentaram níveis de caspase-9 clivada mais atenuados que as células transfectadas com o vetor vazio (Figuras 5.12C e 5.13C). Porém, não observamos diferença entre as células transfectadas com o vetor vazio ou com o pcDNA3-myc-Survivina, no que diz respeito à diminuição das caspases-3 e -7 (Figuras 5.12C e 5.13C), inibição da viabilidade celular (Figuras 5.12D e 5.13D) e à indução de fragmentação do DNA (Figuras 5.12E e 5.13E), que representa o evento final da cascata apoptótica. Além disso, a superexpressão da Survivina não foi capaz de estabilizar a expressão da XIAP (Figuras 5.12C e 5.13C), indicando que a XIAP possa ser regulada por mecanismos independente da Survivina. O conjunto desses dados mostra que, apesar de influenciar de alguma forma a clivagem de caspase-9 induzida pela doxo, a superexpressão

da Survivina nas células MCF7 e MDA-MB-231 não apresenta um efeito citoprotetor, capaz de conferir resistência à morte celular induzida pela doxo.

5.10 O silenciamento da expressão da XIAP e Survivina induz o aumento de morte celular espontânea nas células MCF7

Considerando que células derivadas de câncer de mama apresentam níveis basais de Survivina e XIAP elevados, o próximo passo foi verificar o efeito da inibição de XIAP e Survivina sobre a viabilidade celular. Para isso, nós transfectamos as células MCF7 com o scramble, com o siRNA para XIAP, com o siRNA para Survivina ou com o siRNA para XIAP e Survivina simultaneamente e comparamos tais condições quanto à fragmentação de DNA. Após 72h de transfecção com os siRNAs específicos, podemos constatar que a inibição da expressão da Survivina, isoladamente ou em combinação com a inibição de XIAP, resultou em maior citotoxicidade, como evidenciado pelo aumento do percentual de células em sub-G0 (Figura 5.14). Ao contrário dos efeitos bem pronunciados observados nas células silenciadas para Survivina, o efeito citotóxico induzido pela silenciamento da XIAP isoladamente se apresentou de forma mais discreta, induzindo um aumento de 13% no percentual de morte celular. Esses dados mostram que a inibição de XIAP e, principalmente, Survivina, é capaz de induzir morte celular espontânea de células derivadas de câncer de mama.

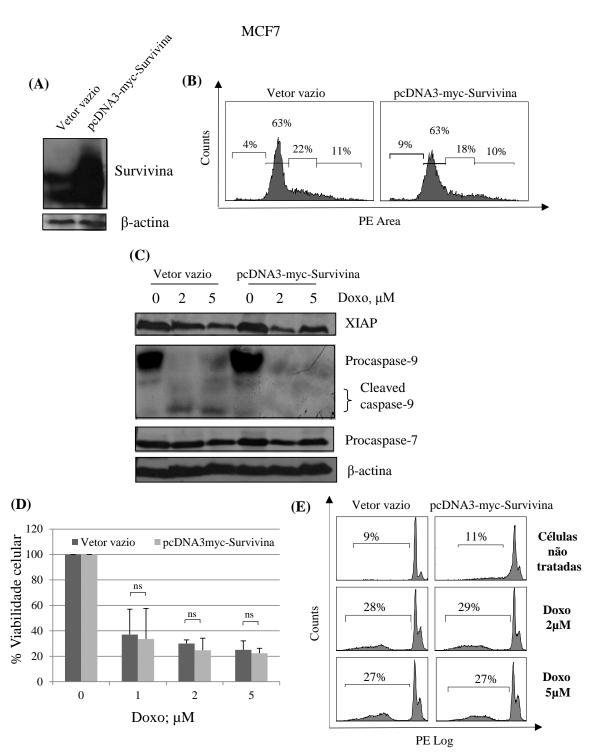


Figure 5.12: Efeito da indução da superexpressão da Survivina na sensibilidade das células MCF7 à doxorrubicina (doxo). As células foram transfectadas com o vetor vazio (pcDNA3-myc) ou com o vetor pcDNA3-myc-Survivina (A), utilizando o reagente Lipofectamina 2000 e expostas à doxo por 72h. Após a transfecção, elas foram comparadas quanto à distribuição de fases do ciclo celular (B), ativação de caspases (C), alterações na viabilidade celular (D) e fragmentação no DNA (E) em resposta ao tratamento com a doxo. As figuras são representativas de três experimentos independentes. Os resultados do ensaio de MTT estão expressos através da média ± desvio padrão de três experimentos. Ns: valor de p não significativo; Teste t student.

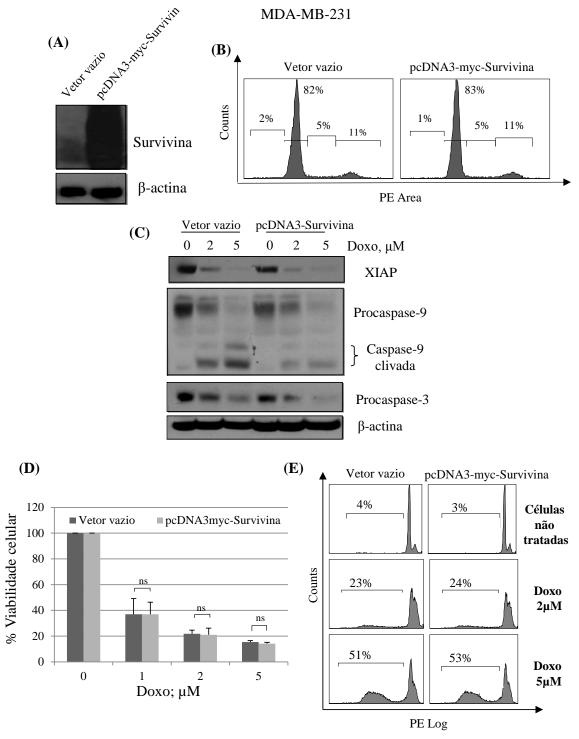


Figure 5.13: Efeito da indução da superexpressão da Survivina na sensibilidade das células MDA-MB-231 à doxorrubicina (doxo). As células foram transfectadas com o vetor vazio (pcDNA3-myc) ou com o vetor pcDNA3-myc-Survivina (A), utilizando o reagente Lipofectamina 2000 e expostas à doxo por 72h. Após a transfecção, elas foram comparadas quanto à distribuição de fases do ciclo celular (B), ativação de caspases (C), alterações na viabilidade celular (D) e fragmentação no DNA (E) em resposta ao tratamento com a doxo. As figuras são representativas de três experimentos independentes. Os resultados do ensaio de MTT estão expressos através da média ± desvio padrão de três experimentos. Ns: valor de p não significativo; Teste t student.

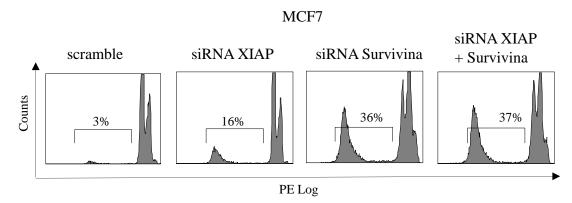


Figure 5.14: Efeito do silenciamento da expressão da XIAP e/ou Survivina sobre a morte celular. As células MCF7 foram transfectadas com o scramble, com o siRNA para XIAP e com o siRNA para Survivina, isoladamente ou simultaneamente, utilizando o reagente Lipofectamina RNAimax. Após 72h de transfecção, as células foram avaliadas quanto à presença de DNA fragmentado. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes.

5.11 A inibição simultânea da expressão da XIAP e da Survivina não sensibiliza as células MCF7 à apoptose induzida pela doxo

O próximo passo do trabalho foi investigar se a inibição de XIAP e Survivina, simultaneamente, poderia aumentar a sensibilidade à doxo. Para isso, transfectamos as células MCF7 com os siRNAs específicos e comparamos os perfis de sensibilidade ao tratamento com a doxo por 24 e 48h. De maneira interessante, o silenciamento de XIAP e Survivina estimulou a diminuição das procaspases-7 e -9 mediada pela doxo em 24h, tanto 1μM quanto 2μM (Figura 5.15A). Porém, esse efeito de sensibilização não foi observado quando as células silenciadas para as proteínas antiapoptóticas foram comparadas ao scramble quando à indução de fragmentação de DNA pela doxo (Figura 5.15B). Confirmando os resultados obtidos em 24h, não houve potencialização dos efeitos citotóxicos da doxo com a inibição de XIAP e/ou Survivina, após 48 de tratamento com a droga (dados não mostrados). Esses dados indicam que o silenciamento da expressão de XIAP e Survivina, de forma isolada ou em combinação, é capaz de influenciar o perfil de

regulação de caspases, porém isso não resulta na sensibilização de células MCF7 ao tratamento com a doxo. O conjunto desses resultados sugere que a XIAP e Survivina não desempenham um papel crucial na resistência à doxo, visto que a manipulação de seus níveis não afeta a capacidade de o quimioterápico induzir morte celular.

5.12 O tratamento com a doxo induz aumento nos níveis de expressão e de fosforilação de Foxo3a nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231

Até o presente momento, nossos dados mostram que a doxo é capaz de diminuir a expressão de Survivina e XIAP, porém a regulação dessas proteínas não é um evento crucial para a morte celular induzida pelo quimioterápico. Esse achado sugere que Survivina e XIAP podem estar sendo reguladas por vias de sinalização ascendentes, comuns ou não a ambas as proteínas, cujo papel na resistência à doxo seja mais relevante. Recentemente, foi descrito que o fator de transcrição Foxo3a pode se ligar ao promotor da Survivina e inibir sua expressão (GUHA *et al.*, 2009), bem como regular negativamente, direta ou indiretamente, a expressão da XIAP (LEE *et al.*, 2008). Além disso, Foxo3a é capaz de mediar estímulos citotóxicos de drogas antitumorais, como o taxol (SUNTERS *et al.*, 2003), gefitinibe (KROL *et al.*, 2007) e lapatinibe (XIA *et al.*, 2006) em células de câncer de mama.

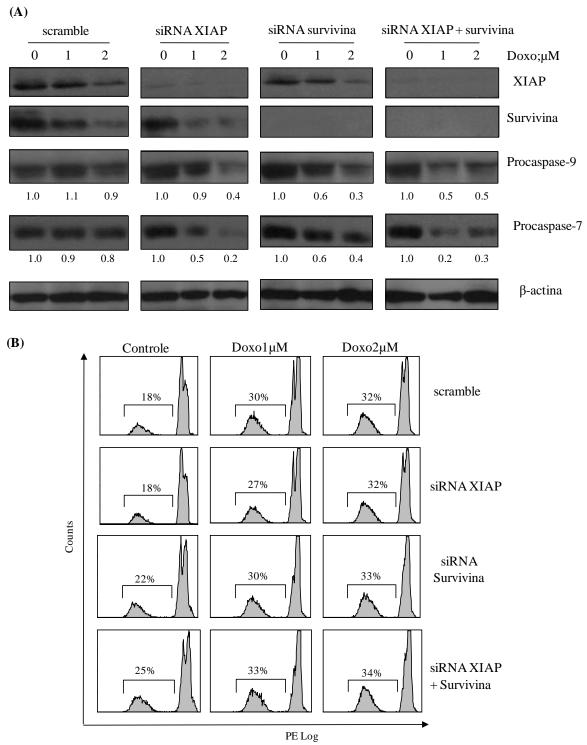


Figure 5.15: Efeito do silenciamento da expressão da XIAP e/ou Survivina na sensibilidade das células MCF7 à doxorrubicina (doxo). As células foram transfectadas com o scramble, com o siRNA para XIAP e com o siRNA para Survivina, isoladamente ou simultaneamente, utilizando o reagente Lipofectamina RNAimax. Após 24h de exposição à doxo, foram comparadas quanto aos níveis das procaspases-7 e -9 (A) e de fragmentação do DNA (B). Os valores situados abaixo dos blots indicam os níveis de expressão das proteínas de interesse, analisados através da densitometria das bandas e normalizados em relação aos níveis de β-actina.

Então, o próximo objetivo do estudo foi avaliar se haveria modulação da expressão da Foxo3a mediante o tratamento com a doxo. Observamos que houve a indução dos níveis de Foxo3a total, bem como de Foxo3a fosforilada, após a exposição das células MCF7 e MDA-MB-231 a doxo por 24h, principalmente nas concentrações de 1 e 2μM, que representam as mais clinicamente relevantes (Figuras 5.16A e 5.16B). Além disso, realizamos uma cinética de tempo com a concentração de 1μM e observamos que o aumento dos níveis de Foxo3a fosforilada é um efeito bem precoce induzido pelo doxo (Figuras 5.16C). Esses dados sugerem que a doxo induz algum mecanismo de inativação da expressão de Foxo3a.

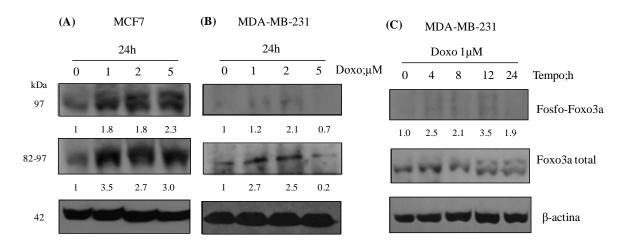


Figura 5.16: Níveis de Foxo3a total e fosforilada nas células MCF7 e MDA-MB-231, por Western blotting. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas a uma cinética de concentração e de tempo (C) de exposição à doxo. Os valores situados abaixo dos blots indicam os níveis de expressão das proteínas de interesse, analisados através da densitometria das bandas e normalizados em relação aos níveis de β -actina. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

5.13 O tratamento com a doxo induz aumento nos níveis de fosforilação de Akt nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231

Visto que a expressão de Foxo3a pode ser modulada pela fosforilação por quinases oncogênicas, como a Akt (BRUNET *et al.*, 1999), nós investigamos o papel de Akt no contexto da resistência à doxo e regulação da Foxo3a. As Figuras 5.17A e 5.17B mostram que o tratamento com a doxo por 24h resultou no aumento dos níveis de fosforilação de Akt nas duas linhagens celulares. Esse efeito também foi observado quando as células MDA-MB-231 foram expostas a 1μM de doxo por até 24h de exposição (Figura 5.17C). Esses dados sugerem que a doxo induz a ativação de Akt e que tal ativação possa ser um mecanismo de regulação da expressão e inativação de Foxo3a.

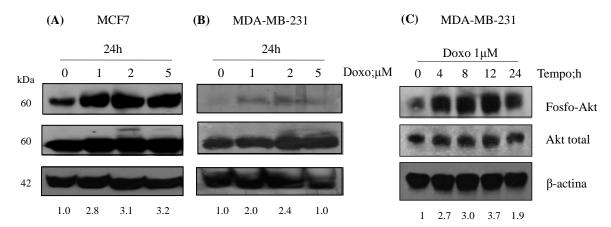


Figura 5.17: Níveis de Akt fosforilada nas células MCF7 e MDA-MB-231, por Western blotting. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas a uma cinética de concentração e de tempo (C) de exposição à doxo. Os valores situados abaixo dos blots indicam os níveis de fosforilação de Akt, analisados através da densitometria das bandas e normalizados em relação aos níveis de β -actina. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

5.14 O tratamento das células MCF7 e MDA-MB-231 com a doxo resulta na redução dos níveis de RNAm de *FOXO3A*

A fim de investigar se a doxo seria capaz de modular a expressão gênica da *FOXO3A*, avaliamos os níveis de RNAm antes e após o tratamento com o quimioterápico.

As Figuras 5.18A e 5.18B mostram que a exposição das células à doxo por 24h resultou na diminuição significativa da expressão do RNAm da *FOXO3A* em todas as concentrações testadas. Esse resultado aponta para um mecanismo de regulação transcricional da Foxo3a, induzida pelo tratamento com a doxo, adicionalmente à modulação pós-traducional tradicionalmente conhecida.

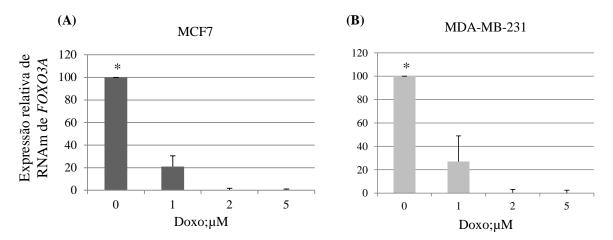


Figura 5.18: Níveis de RNAm da *FOXO3A*, **por PCR em tempo real.** As células MCF7 (**A**) e MDA-MB-231 (**B**) foram expostas à doxorrubicina (doxo) por 24h e comparadas ao controle de células não tratadas. As linhagens tiveram seu RNA extraído por Trizol e cDNA sintetizado pelo método Superscript. A expressão do RNAm para *β-ACTINA* foi utilizada como controle interno para normalização dos níveis do RNAm para *FOXO3A*. Os resultados estão expressos através da média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *p< 0.05; Teste t *student*.

5.15 A doxo induz diminuição nos níveis da proteína proapoptótica Bim, alvo transcricional de Foxo3a, nas células MCF7 e MDA-MB-231

Estudos desenvolvidos em modelos de câncer de mama (SUNTERS *et al.*, 2003) e de neuroblastoma (OBEXER *et al.*, 2007) demonstraram que a proteína proapoptótica Bim é um alvo transcricional direto de Foxo3a, capaz de mediar estímulos da via intrínseca apoptótica. Dessa forma, analisamos a expressão de Bim após o tratamento com a doxo e observamos que, exceto pela concentração de 1µM de doxo, que induziu o aumento da

expressão de Bim nas células MDA-MB-231, houve uma modulação negativa de seus níveis de expressão após 24h de exposição das células MCF7 e MDA-MB-231 às outras concentrações da droga (Figura 5.19A e 5.19B). Esses dados sugerem uma possível diminuição na atividade transcricional de Foxo3a e indicam que a apoptose induzida pela doxo ocorre independentemente da indução da proteína pró-apoptótica Bim.

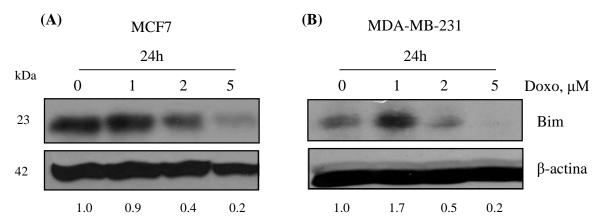


Figura 5.19: Expressão de Bim nas células MCF7 e MDA-MB-231, por Western blotting. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas a concentrações crescentes de doxorrubicina (doxo) por 24h. Os valores situados abaixo dos blots indicam os níveis de expressão da proteína de interesse, analisados através da densitometria das bandas e normalizados em relação aos níveis de β-actina. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

5.16 O aumento nos níveis de fosforilação da Foxo3a e redução nos níveis de Bim podem ser observados até 72h de exposição à doxo

Considerando que a doxo apresenta um efeito citotóxico tempo-dependente nas linhagens celulares estudadas (Figuras 5.1, 5.2 e 5.4), a indução da fosforilação de Foxo3a em 24h (Figura 5.16) poderia ser um evento precoce e reversível conforme o aumento do tempo de exposição. Para avaliar essa hipótese, nós expusemos as células MCF7 à doxo por 24, 48 e 72h e observamos que os níveis elevados de fosforilação, comparados ao controle de células não tratadas, são sustentados até 72h (Figura 5.20A), quando a citotoxicidade

induzida pela droga já é bem mais pronunciada. Corroborando nossos achados em 24h, a expressão de Bim permaneceu inibida pela droga após tempos mais tardios de exposição (Figura 5.20B). Esses resultados mostram que a inativação de Foxo3a por fosforilação não é um evento precoce e permanece durante todo o processo de morte celular induzida pela doxo.

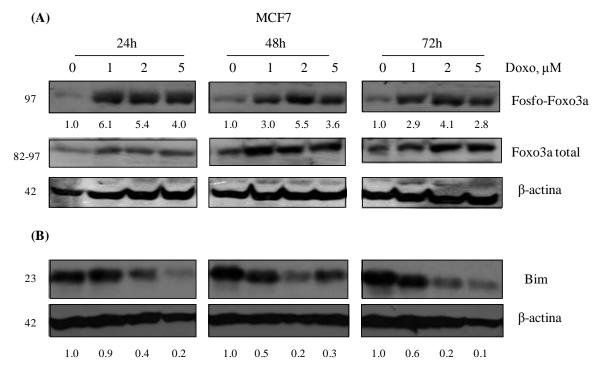


Figura 5.20: Níveis de Foxo3a total e fosforilada e de Bim nas células MCF7, por Western blotting. As células MCF7 foram expostas a concentrações crescentes de doxorrubicina (doxo) por 24, 48 e 72h e tiveram a expressão de Foxo3a (A) e Bim (B) avaliada. Os valores situados abaixo dos blots indicam os níveis de expressão das proteínas de interesse, analisados através da densitometria das bandas e normalizados em relação aos níveis de β-actina. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

5.17 O tratamento com a doxo reduz a expressão de Foxo3a no núcleo e aumenta no citoplasma

A fosforilação de Foxo3a é uma modificação pós-traducional que promove a sua exclusão nuclear e acúmulo no citoplasma, com subsequente degradação e inativação da sua função (HUANG & TINDALL, 2011). O próximo passo do estudo foi avaliar a localização

subcelular de Foxo3a, mediante o tratamento com a doxo. Os blots mostram que a exposição das células MCF7 (Figura 5.21A) à doxo por 24h e da MDA-MB-231 (Figura 5.21B) à 1μM de doxo por diferentes tempos de incubação promoveu o aumento dos níveis de Foxo3a total no citoplasma e a redução de sua expressão no núcleo, principalmente na concentração de 5μM. Esse dado sugere que a doxo induz a translocação de Foxo3a do núcleo para o citoplasma, corroborando nossos dados referentes à inativação do fator de transcrição mediada pelo quimioterápico.

5.18 O tratamento com a doxo reduz a expressão do fator de transcrição FoxM1 nas células MCF7 e MDA-MB-231

Até o momento, o conjunto dos dados obtidos nesse trabalho mostra que a doxo é capaz de regular a expressão de Survivina e XIAP por um processo que envolve a regulação transcricional dessas moléculas. Entretanto, essa modulação não parece ocorrer com a participação de Foxo3a, cuja translocação para o citoplasma induzida pela droga não favorece a hipótese de uma regulação de seus alvos transcricionais. Dessa forma, o próximo objetivo do estudo foi investigar o envolvimento de FoxM1 no processo de resistência à doxo, bem como na regulação da expressão de Survivina e XIAP. FoxM1 é um fator de transcrição associado aos diferentes aspectos da oncogênese, como proliferação, angiogênese, invasão e metástase (WANG et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que FoxM1 pode regular positivamente a expressão de Survivina, no contexto da sua função de controle do ciclo celular (WANG et al., 2005) e que sua expressão se correlaciona com os níveis de XIAP em amostras de carcinoma de tireóide (AHMED et al., 2012), apontando para uma possível interação entre as moléculas.

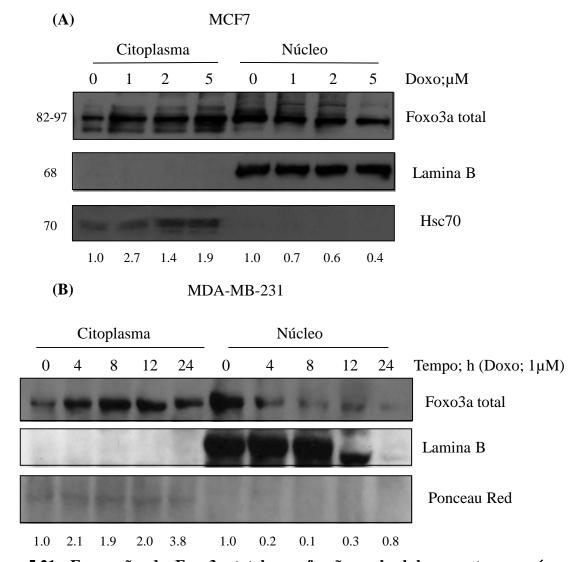


Figura 5.21: Expressão de Foxo3a total nas frações subcelulares antes e após o tratamento com a doxorrubicina (doxo), por Western blotting. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas a diferentes concentrações de doxo por 24h e à 1μM de doxo por diferentes tempos de incubação, respectivamente. Posteriormente, foram submetidas ao protocolo de fracionamento subcelular utilizando o kit NE-PER. Os valores situados abaixo dos blots indicam os níveis de expressão Foxo3a, analisados através da densitometria das bandas e normalizados em relação aos níveis das proteínas constitutivas referentes a cada fração subcelular. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

Assim, avaliamos se FoxM1 poderia ter sua expressão modulada pelo tratamento com a doxo e observamos que a doxo inibiu a expressão de FoxM1 nas células MCF7 em todas as concentrações testadas e nas células MDA-MB-231, em 2 e 5µM (Figuras 5.22A e 5.22B). Verificamos que houve um aumento nos níveis de FoxM1 após a exposição das

células MDA-MB-231 à 1µM de doxo (Figura 5.22B), concentração cujos efeitos citotóxicos são menos pronunciados. Esses dados sugerem que a redução dos níveis de FoxM1 nas linhagens celulares está associada a um perfil de maior sensibilidade à doxo.

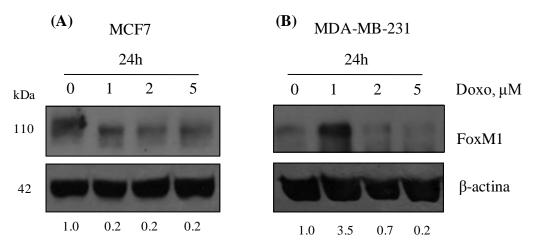


Figura 5.22: Expressão de FoxM1 nas células MCF7 e MDA-MB-231, por Western blotting. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram expostas à doxorrubicina (doxo) por 24h e tiveram suas proteínas extraídas e submetidas a eletroforese. Os valores situados abaixo dos blots indicam os níveis de expressão da proteína de interesse, analisados através da densitometria das bandas e normalizados em relação aos níveis de β-actina. As figuras são representativas de três experimentos independentes.

5.19 A indução da superexpressão de FoxM1 confere resistência ao tratamento com a doxo nas células MDA-MB-231, mas não na MCF7

A fim de avaliarmos o papel da FoxM1 na resistência a apoptose induzida pela doxo, conduzimos experimentos de indução da superexpressão de FoxM1 por transfecção plasmidial. Após comparação das células MCF7 transfectadas com o vetor vazio ou com o vetor codificando o gene para FoxM1 (Figura 5.23A), podemos observar que não houve diferença quanto ao processamento de caspase-7 (Figura 5.23B) e quanto ao percentual de fragmentação de DNA (Figura 5.23C) induzidos pela doxo.

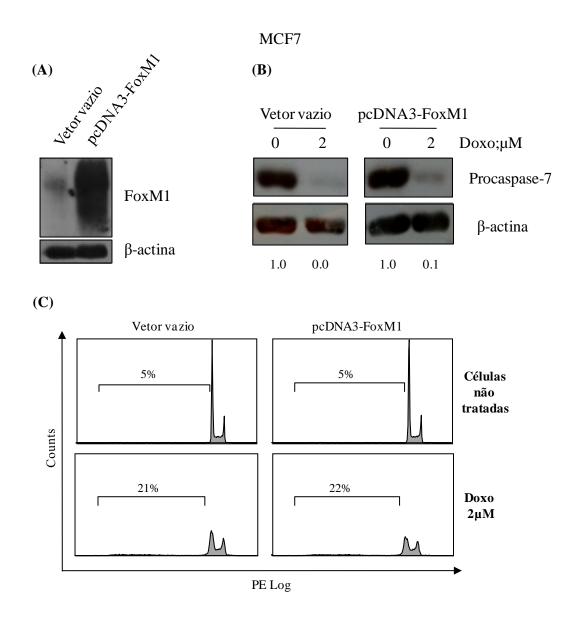


Figure 5.23: Efeito da indução da superexpressão de FoxM1 na sensibilidade das células MCF7 à doxorrubicina (doxo). As células foram transfectadas com o vetor vazio (pcDNA3) ou com o vetor pcDNA3-FoxM1 (A), utilizando o reagente Lipofectamina 2000 e expostas à doxo por 72h. Após a transfecção, elas foram comparadas quanto à ativação de caspases (B) e indução de fragmentação no DNA (C). As figuras são representativas de três experimentos independentes.

Porém, quando às células MDA-MB-231 foram transfectadas com o gene para FoxM1 (Figura 5.24A), observamos níveis de procaspase-3 mais elevados nas células expostas à doxo que superexpressam FoxM1 (Figura 5.24A). Esse resultado foi confirmado por citometria de fluxo, onde as células transfectadas com o vetor vazio apresentaram 26% de DNA fragmentado após o tratamento com a doxo, ao contrário das células

superexpressando FoxM1, cujo percentual foi de 11% de indução de morte celular. Esses resultados mostram que a indução da superexpressão de FoxM1 é capaz de promover a resistência à doxo nas células MDA-MB-231, porém esse mesmo efeito não é observado nas células MCF7. Esse achado indica que o influência do fator de transcrição na quimiorresistência depende do tipo celular, sendo mais relevante em células invasivas triplonegativas do que em células não-invasivas, expressando Her e os receptores hormonais.

5.20 A indução da superexpressão de FoxM1 aumenta os níveis de Survivina e XIAP nas células MDA-MB-231, mas não na MCF7

O próximo passo do estudo foi investigar o papel da FoxM1 na regulação da expressão de Survivina e XIAP, a fim de compreender como as células superexpressando FoxM1 se tornam resistentes à doxo. Para isso, as células transfectadas com o vetor vazio e com o pcDNA3-FoxM1 foram analisadas e comparadas quanto à expressão de Survivina e XIAP. As Figuras 5.25A e B mostram que os níveis de Survivina e XIAP se encontram aumentados nas células MDA-MB-231 superexpressando FoxM1, o que não é observado nas células MCF7, onde os níveis das proteínas antiapoptóticas permanecem inalterados mediante a indução da superexpressão do fator de transcrição. Consistente com esses dados, as células MDA-MB-231 suprexpressando FoxM1 apresentam níveis de RNAm de SURVIVINA (Figuras 5.25C e 5.25D) e XIAP maiores que as células transfectadas com o vetor vazio. Diferentemente do aumento dos níveis de RNAm para XIAP (p=0.0147), o aumento na expressão do RNAm para Survivina não ocorreu de maneira estatisticamente significativa (p=0.0564), apesar de termos observado a indução de sua expressão nos três experimentos realizados.

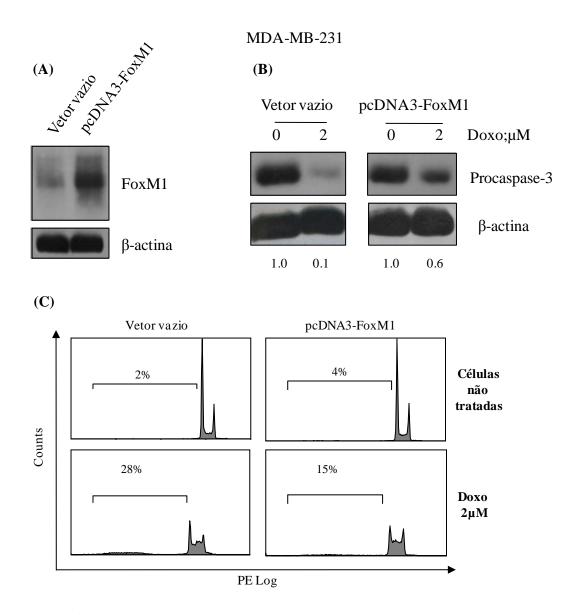


Figure 5.24: Efeito da indução da superexpressão de FoxM1 na sensibilidade das células MDA-MB-231 à doxorrubicina (doxo). As células foram transfectadas com o vetor vazio (pcDNA3) ou com o vetor pcDNA3-FoxM1 (A), utilizando o reagente Lipofectamina 2000 e expostas à doxo por 48h. Após a transfecção, elas foram comparadas quanto à ativação de caspases (B) e indução de fragmentação no DNA (C). As figuras são representativas de três experimentos independentes.

Em conjunto, esses resultados mostram que o fator de transcrição FoxM1 é capaz de regular a expressão de Survivina e XIAP apenas nas células MDA-MB-231. A associação entre o aumento da expressão de Survivina e XIAP e a indução de resistência à doxo em células superexpressando FoxM1 sugerem a participação dessas proteínas na processo de indução do fenótipo de quimiorresistência pelo fator de transcrição.

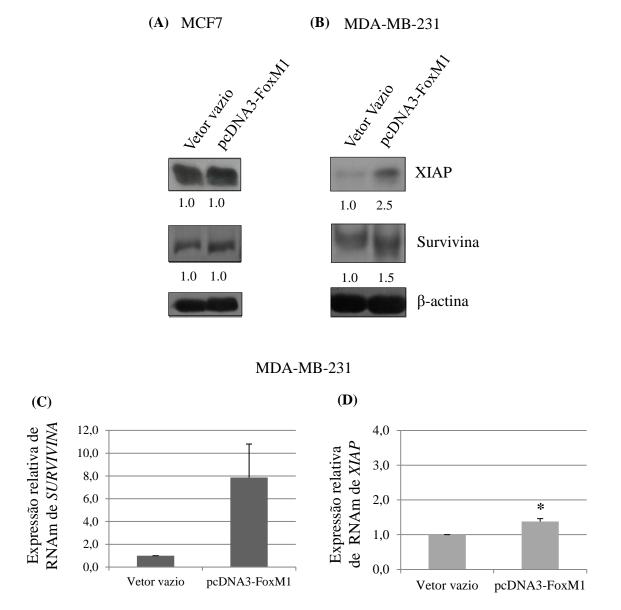


Figure 5.25: Efeito da indução da superexpressão de FoxM1 na regulação de Survivina e XIAP. As células MCF7 (A) e MDA-MB-231 (B) foram transfectadas com o vetor vazio (pcDNA3) ou com o vetor pcDNA3-FoxM1, utilizando o reagente Lipofectamina 2000. Após 24h de transfecção, elas foram comparadas quanto aos níveis expressão de Survivina e XIAP, por Western blotting. As células MDA-MB-231 transfectadas com ambos os vetores tiverem seus níveis de RNAm de *SURVIVINA* (C) e *XIAP* (D) acessados por PCR em tempo real. As figuras são representativas de três experimentos independentes. Teste *t student*; *p<0.05.

6. DISCUSSÃO

O câncer de mama é a maior causa de morte por câncer em mulheres brasileiras e a segunda neoplasia mais incidente, ficando atrás, em termos de incidência, dos tumores de pele não-melanoma (Fonte: Ministério da Saúde, Estimativas 2012-2013: Incidência de Câncer no Brasil, 2011). Apesar dos avanços no tratamento do câncer de mama com o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas e com a identificação de fatores prognósticos e preditivos de resposta, a resistência à quimioterapia ainda representa o maior obstáculo para o sucesso no tratamento dessa neoplasia. Em pacientes com doença metastática recebendo quimioterapia, o percentual de resistência é em torno de 90% (COLEY, 2008). Consequentemente, a busca por moléculas que, conhecidamente, sejam capazes de conferir a quiomiorresistência tem o potencial de evitar que pacientes sejam expostos a efeitos tóxicos e pouco eficazes da terapia. A avaliação do perfil de expressão gênica por microarranjo de DNA vem crescendo como uma estratégia para classificar pacientes de acordo com a sua assinatura molecular e possivalmente identificar os pacientes que podem ser beneficiados por uma determinada terapia. Entretanto, ainda existem limitações para sua incorporação na prática clínica como uma ferramenta diagnóstica, como o custo, a complexidade e a exigência de expertise técnica (DAWOOD et al., 2011; LAVASANI & MOINFAR, 2012). Dessa forma, uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela quimiorresistência pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que sejam capazes de burlar tais mecanismos.

A doxo é considerada um dos quimioterápicos mais eficazes no tratamento do câncer de mama e, apesar de ter sido utilizada pela primeira vez há muitos anos (FISHER *et al.*, 1990), a droga ainda permanece em protocolos quimioterapêuticos para essa neoplasia. Em modelos *in vitro*, foi demonstrado que a doxo é capaz de reduzir a viabilidade de células

derivadas de câncer de mama através da indução de apoptose (DI et al., 2009). Nesse estudo, através da avaliação de características predominantemente apoptóticas, demonstramos que a doxo foi capaz de induzir fragmentação de DNA, inibir a viabilidade celular e alterar os níveis das procaspases-3, -7 e -9 tanto nas células invasivas MDA-MB-231 quanto nas células não-invasivas MCF7, indicando que ocorre o desencadeamento da via intrínseca de morte celular. Em 24h de exposição, as duas linhagens exibiram um perfil similar de sensibilidade à doxo, corroborando relatos na literatura que observaram sensibilidades semelhantes para essas linhagens celulares aos agentes antitumorais trióxido de arsênico (BAJ et al., 2002) e estaurosporina (VASATURO et al., 2005). Os efeitos citotóxicos da doxo ocorreram em células com diferentes status de p53 e de maneira tempo-dependente. O nosso estudo mostra que a doxo induziu a expressão de p53 nas células MCF7, que apresentam a forma selvagem da proteína, confirmando dados de outros trabalhos que reportaram o aumento da fosforilação de p53 mediada pela doxo (YEH et al., 2004) e a modulação diferencial da expressão de p53 entre a doxo e o paclitaxel, um taxano também amplamente utilizado no tratamento do câncer de mama (SRIVASTAVA et al., 1998). Por outro lado, os níveis de p53 mutante se mantiveram inalterados nas células MDA-MB-231, onde foi demonstrado que as vias de sinalização associadas à sensibilidade às drogas são mediadas pelo fator de transcrição p73 (WONG et al., 2011). De forma consistente, VAYSSADE et al demonstraram que p73 pode assumir algumas funções de p53 em células deficientes em p53 expostas à doxo (2005). O achado de que o status de p53 não influencia na resposta dessas células à doxo pode prover informações clínicas relevantes, visto que aproximadamente 30% dos casos de câncer de mama apresentam mutações no gene TP53 (BØRRESEN-DALE, 2003).

Nosso próximo passo foi investigar se a Survivina poderia conferir resistência à doxo e proteger as células derivadas de câncer de mama da apoptose. Observamos que a doxo foi

capaz de reduzir os níveis de Survivina e XIAP, concomitantemente com a cinética de indução de apoptose, apontando para uma possível correlação entre a expressão das IAPs e a resistência à doxo. Apesar de nunca ter sido relatada em câncer de mama, a inibição da Survivina mediada pela doxo é um evento que já havia sido observado em células derivadas de câncer de pulmão – A549 – onde o restabelecimento da expressão dessa proteína foi capaz de resgatar as células, reduzindo os níveis de apoptose induzidos pela doxo (MIRZA et al., 2002). Quando transfectamos as células com o plasmídeo codificando a Survivina, observamos que o processamento de caspase-9 foi atenuado, sugerindo que, pelo menos em parte, a superexpressão de Survivina pode interferir com a apoptose mediada pela doxo. Todavia, não observamos alterações na sensibilidade à doxo no que diz respeito à viabilidade celular e indução de fragmentação no DNA. Esse achado contrasta com dados na literatura que consideram a Survivina como um potente fator de quimiorresistência no câncer de mama. Conduzindo experimentos semelhantes aos nossos, MORIAI et al (2008) observaram a diminuição no número de células apoptóticas induzidas pelo tratamento com o inibidor de ER – tamoxifeno – após a superexpressão da Survivina. Um estudo recente demonstrou que a Survivina atua downstream à via de Her2/PI3K, sendo requerida para a promoção de resistência ao paclitaxel em células de câncer de mama superexpressando Her (WANG et al., 2010). Outros pesquisadores mostraram que células superexpressando Survivina apresentaram poucas alterações em sua viabilidade quando expostas ao inibidor de Her2 – transtuzumabe – indicando que a Survivina seja capaz de reverter a inibição de crescimento tumoral causada pelo transtuzumabe (ZHU et al., 2010). Por fim, foi demonstrado que o silenciamento de Survivina por siRNA aumentou a sensibilidade de células de câncer de mama à radiação (PAPANIKOLAOU et al., 2011). O conjunto desses dados mostra que o papel da Survivina na resistênca no câncer de mama parece depender da terapia em questão.

Nosso grupo também questionou se a diminuição na expressão da Survivina e XIAP poderia alterar a viabilidade celular e sensibilizar as células à doxo, visto que foi previamente demonstrado que tais proteínas podem agir como um complexo para inibir a apoptose (DOHI et al., 2004). Para isso, inibimos a expressão das IAPs, isoladamente ou simultaneamente, e observamos que a inibição de XIAP, mas principalmente de Survivina, foi capaz de induzir o aumento espontâneo de fragmentação de DNA nas células MCF7. Esse achado era esperado, uma vez que a Survivina é uma molécula essencial para o controle e a progressão do ciclo celular (LI et al., 1998) e a inibição da sua expressão invariavelmente causa alterações no ciclo celular (LI et al., 1999; ALTIERI, 2006). Em resposta à doxo, houve o aumento do processamento das procaspases-7 e -9, apesar de não haver alterações no perfil de fragmentação do DNA. Um estudo recente mostrou que a superexpressão de XIAP foi capaz de conferir resistência a uma série de quimioterápicos, tais como etoposide, estaurosporina, vincristina e doxo, apenas quando foi associada à inibição de seu regulador negativo - Smac (SEEGER et al., 2010). Assim como a Survivina, a inibição de XIAP também foi capaz de reduzir a resistência de células de câncer de mama ao transtuzumabe (FOSTER et al., 2009). Porém, no nosso estudo, os dados mostram que a expressão de Survivina e XIAP, não conjugada a outros fatores, não é capaz de modificar a resposta das células à doxo, não podendo considerar essas IAPs como fatores de resistência a esse quimioterápico. Juntamente com os resultados obtidos com os experimentos de superexpressão da Survivina, nossos achados mostram que a manipulação molecular dos níveis de Survivina e XIAP pode afetar os níveis de apoptose induzidos pela doxo, mas não a capacidade de a droga induzir morte celular. Isso sugere que, através da inibição da apoptose, a superexpressão de IAPs pode favorecer a indução de outros tipos de morte celular pela doxo. De fato, já foi reportado que a doxo pode inibir a viabilidade de células de câncer de mama através da indução não apenas de apoptose, mas também de senescência e

autofagia (DI *et al.*, 2009). Além disso, a modulação dos níveis de caspases em resposta à doxo nas células silenciadas para XIAP e Survivina sugere que a manipulação da expressão de tais proteínas possa alterar o limiar para indução de apoptose pela doxo e apontam a utilização da combinação de inibidores das IAPs com outros quimioterápicos.

Até então, nossos dados mostram que a expressão de Survivina e XIAP é reduzida durante o processo de morte celular induzida pela doxo, mas isso não impacta na resistência ao quimioterápico. Essa conclusão permite especular qual mecanismo poderia estar envolvido com a regulação negativa dessas proteínas. De fato, Survivina e XIAP são moléculas reguladas por inúmeras vias de sinalização oncogênicas ascendentes e sabe-se que a sua regulação também ocorre no nível transcricional como consequência da desregulação de fatores de transcrição (para revisão: GÁLBAN & DUCKETT, 2010; GUHA & ALTIERI, 2009). No presente estudo, também demonstramos que a Survivina e XIAP têm seus níveis de RNAm reduzidos, reforçando nossa hipótese de que tais moléculas podem ser transcricionalmente reprimidas mediante o tratamento com a doxo. Dessa forma, o próximo passo do estudo foi explorar quais fatores de transcrição poderiam estar envolvidos na regulação dessas IAPs em resposta ao estresse induzido pela doxo. O primeiro fator de transcrição investigado foi Foxo3a, visto que inúmeros trabalhos o apontam como um alvo para quimioterápicos. Em modelos in vitro e in vivo, foi reportado que ocorre a translocação de Foxo3a para o núcleo mediante o estímulo apoptótico induzido pelo lapatinibe (XIA et al, 2006), taxol (SUNTERS et al., 2003; SUNTERS et al., 2003) e gefitinibe (KROL et al., 2007), resultando na regulação positiva de genes pró-apoptóticos e relacionados à parada no ciclo celular. Adicionalmente, estudos relataram a regulação direta ou indireta de Survivina (HILMI et al., 2008; GUHA et al., 2009; OBEXER et al., 2009) e XIAP (LEE et al, 2008) por Foxo3a, porém essa associação ainda foi estabelecida em modelos de câncer de mama.

Nossos dados mostram que ocorre o aumento da expressão de Foxo3a no citoplasma e redução no núcleo, com indução dos níveis de fosforilação de Foxo3a e seu regulador Akt, após o tratamento com doxo. A ativação de Akt pela doxo em células derivadas de câncer de mama foi observada em um trabalho de LI et al., 2005, que atribuiu esse efeito a um mecanismo de defesa das células tumorais como tentativa de transpor os efeitos citotóxicos induzidos pela doxo. Porém, nesse trabalho não foram realizados ensaios de citotoxicidade para estabelecer uma correlação entre os níveis de fosforilação de Akt e a sensibilidade das células à doxo. Comparando os dados da Figura 5.17 com os das Figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4, verificamos que a ativação de Akt ocorre concomitantemente com estímulos da maquinaria apoptótica, como fragmentação do DNA e ativação de caspases, mostrando que a doxo pode ativar vias de sinalização direcionadas a diferentes "destinos" que a célula possa ter: proliferação ou apoptose. Além disso, observamos a diminuição nos níveis da proteína antiapoptótica Bim, indicando uma possível diminuição na atividade transcricional de Foxo3a. Vale ressaltar que, diferentemente do que foi observado nas mesmas linhagens tumorais de mama expostas ao quimioterápico taxol, onde a proteína Bim está envolvida na cascata de indução apoptótica (SUNTERS et al., 2003), a apoptose induzida pela doxo parece ocorrer sem a participação de Bim. Correlacionando esses dados com a diminuição dos níveis de RNAm de Foxo3a, nossos achados permitem inferir que o tratamento com a doxo promove a translocação citoplasmática e inativação de parte da função transcricional de Foxo3a, contrariando dados da literatura referentes à capacidade de Foxo3a de translocar para o núcleo e mediar efeitos citotóxicos induzidos por outras drogas utilizadas no tratamento do câncer de mama. Ainda não sabemos se esse achado exclui a nossa hipótese inicial de que as IAPs poderiam estar sendo reguladas por Foxo3a mediante o estímulo apoptótico induzido pela doxo ou se a fração residual de Foxo3a que permanece no núcleo após o tratamento com o quimioterápico seria capaz de exercer tal função. Experimentos de silenciamento gênico de Foxo3a, por siRNA, serão realizados no sentido de investigar o seu efeito na expressão das IAPs e na regulação da apoptose. Além disso, seria bastante interessante explorar se existe alguma função de Foxo3a que ocorra no citoplasma, independentemente de seu papel na transcrição gênica, assim como foi descrito para o fator de transcrição p53 (GREEN &. KROEMER, 2009; SPEIDEL, 2010). É importante ressaltar que, em amostras de pacientes com câncer de mama, a inativação de Foxo3a, avaliada pela sua presença no citoplasma, está associada a um desfecho clínico desfavorável (HU *et al.*, 2004).

O próximo passo do estudo foi investigar o papel do fator de transcrição FoxM1 na regulação da apoptose e da expressão de Survivina e XIAP. A função de FoxM1 tradicionalmente postulada é a regulação de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular (WANG et al., 2005), sendo essencial para a progressão na mitose. Porém, evidências crescentes indicam que FoxM1 pode interagir com uma imensa gama de moléculas relacionadas à carcinogênese (WANG et al., 2010), bem como modular genes envolvidos com a proliferação celular, evasão da apoptose, angiogênese, invasão, metástase e resposta ao dano de DNA (AHMAD et al., 2010; RAYCHAUDHURI & PARK, 2011, KARADEDOU et al., 2012, ALVAREZ-FERNÁNDEZ & MEDEMA, 2013). Nossos dados mostram que o tratamento das células MCF7 e MDA-MB-231 com a doxo resulta na redução da expressão de FoxM1, estando associada ao perfil de morte celular induzido pela droga. A indução da superexpressão do fator de transcrição, por transfecção plasmidial, foi capaz de reverter o fenótipo de sensibilidade em 15% das células MDA-MB-231, bem como atenuar o processamento de caspase-3 induzido pela doxo. O mesmo efeito não ocorreu nas células MCF7, onde foram observados níveis semelhantes de ativação de caspases e indução de fragmentação do DNA pela doxo entre as células transfectadas com o plasmídeo codificando FoxM1 e o vetor vazio. Um trabalho que foi publicado ao longo do

desenvolvimento do nosso estudo demonstrou que o silenciamento gênico de FoxM1 foi capaz de sensibilizar as células MDA-MB-231 ao tratamento com a doxo, sendo esse efeito bem menos pronunciado nas células MCF7 (PARK et al., 2012). Esses resultados confirmam os nossos achados relacionados a um papel diferencial do fator de transcrição na resistência ao quimioterápico nessas células. No estudo de PARK et al. (2012), os autores demonstraram que a resistência promovida por FoxM1 envolve a interação com o fator de transcrição co-ativador NFkB (fator nuclear de cadeia leve kappa de células B ativadas) e a regulação direta de genes envolvidos com o reparo do DNA. A associação dos nossos dados com os de PARK et al (2012) demonstra que o fator de transcrição FoxM1 contribui para a resistência à doxo em células invasivas triplo-negativas, mas não em células não-invasivas expressando ER e Her2. Reforçando os achados in vitro mencionados acima, foram encontrados altos níveis de FoxM1 em pacientes triplo-negativos, o que foi correlacionado a taxas mais altas de recorrência da doença (PARK et al., 2012). Além disso, um estudo recente investigou uma coorte de 14 pacientes de câncer de mama triplo-negativos e revelou que a maioria dos casos apresentou um perfil de expressão gênica enriquecido em genes envolvidos no controle do ciclo celular e regulação dos pontos de checagem em G2/M e mitose, dentre os quais FoxM1 foi um dos genes mais superexpressos, comparando com as amostras de tecido não maligno de mama (CRAIG et al., 2013). Diferentemente de trabalhos que demonstraram que a expressão de FoxM1 se correlaciona com Her2 no câncer de mama, atuando de forma descendente à via de sinalização mediada pelo receptor (BEKTAS et al., 2008; FRANCIS et al., 2009), esses resultados indicam que FoxM1 pode exercer sua função e promover a resistência mesmo em células que não expressam Her2. Para pacientes com câncer de mama triplo-negativo, a quimioterapia permanece como a única terapia disponível, diferentemente dos casos expressando ER e Her2, que são beneficiados pela utilização de terapias-alvo direcionadas a esses receptores. Dessa forma, tais pacientes apresentam um curso clínico agressivo e um prognóstico bastante desfavorável, principalmente devido à recorrência da doença e ao desenvolvimento de resistência ao longo do tratamento (DAWSON *et al.*, 2009). Diante desse panorama, é de fundamental importância a melhor compreensão dos mecanismos de quimiorresistência e como isso pode auxiliar na busca de biomarcadores de predição de resposta à terapia sistêmica para esse subgrupo.

A fim de entender melhor os mecanismos envolvidos na aquisição de resistência das células superexpressando FoxM1, avaliamos a expressão de Survivina e XIAP nas células transfectadas com ambos os vetores plasmidiais. A indução da superexpressão de FoxM1 foi acompanhada pelo aumento dos níveis proteicos e de RNAm de Survivina e XIAP nas células MDA-MB-231, mas não na MCF7. A regulação de Survivina por FoxM1 foi relatada em linhagens celulares de osteosarcoma, onde os autores descreveram que o fator de transcrição é capaz de ativar o promotor da Survivina no contexto da sua função de regulação de genes envolvidos com o controle do ciclo celular (WANG et al., 2005; RADHAKRISHNAN et al., 2006). Posteriormente, a associação entre essas proteínas foi identificada em células de hepatocarcinoma (GUSAROVA et al, 2007), câncer colorretal (YOSHIDA et al., 2007), leucemia mielóide aguda (NAKAMURA et al., 2010), linfoma e sarcoma (WANG et al., 2013) e até mesmo, foi demonstrado estar envolvida na transformação de astrócitos normais (DAÍ et al., 2010). Em 2011, foi feito o primeiro relato em células de câncer de mama, onde a expressão de Survivina e FoxM1 foi correlacionada à resistência endócrina e à uma assinatura molecular associada a um desfecho clínico desfavorável em pacientes com essa doença (BERGAMASCHI et al., 2011). Diferentemente da Survivina, até o presente momento não há trabalhos que tenham demonstrado uma regulação da expressão de XIAP por FoxM1. Um trabalho recente encontrou uma correlação positiva entre a expressão de XIAP e FoxM1 em amostras de carcinoma de tireóide de alto

grau (AHMED et al., 2012), porém o fato de que ambas proteínas geralmente estão superexpressas em tumores avançados sugere que, não necessariamente elas estejam interagindo nesse modelo. Nesse contexto, o nosso trabalho é o primeiro a relatar a regulação de XIAP por FoxM1, bem como sua associação ao fenótipo de resistência à doxo. Em conjunto, nossos dados indicam que a regulação de Survivina e XIAP está associada ao fenótipo de resistência à doxo mediado pela indução da superexpressão de FoxM1 em células invasivas triplo-negativas. Esses achados indicam que FoxM1 pode cooperar com as proteínas antiapoptóticas Survivina e XIAP para promover a quimorresistência e apontam o eixo FoxM1-Survivina/XIAP como uma via de sinalização que possa ser explorada para intervenções terapêuticas futuras.

O conjunto dos nossos dados indica que o fator de transcrição FoxM1 pode ser um alvo terapêutico promissor para quimioterápicos. Um estudo publicado em 2008 (Kwok et al), identificou o antibiótico tiazol tioestreptona como um agente antitumoral em potencial, visto que foi capaz de induzir morte celular e inibir a proliferação, migração e transformação de células derivadas de câncer de mama através da inibição de FoxM1. Além disso, esse estudo demonstrou que a tioestreptona atua de forma seletiva, visto que seus efeitos citotóxicos não são observados em células normais de mama, indicando que a toxicidade do composto para células neoplásicas esteja dentro dos limites toleráveis para células nãotumorais (KWOK *et al.*, 2008). A junção dos nossos achados com os da literatura sugere que a combinação de inibidores de FoxM1 com quimioterápicos convencionais, como a doxo, tem o potencial de sobrepujar a resistência de células tumorais de mama à droga. Nesse contexto, seria importante explorar mais profundamente essa questão, principalmente em tumores triplo-negativos, onde grande parte dos pacientes adquire resistência ao tratamento, o que resulta em taxas elevadas de recidiva da doença.

Outro ponto importante a ser ressaltado é que nossos experimentos foram baseados em linhagens celulares totalmente diferentes e, exceto pelos dados obtidos com FoxM1, os resultados foram bastante semelhantes para ambas. Diferente da MCF7 que é uma linhagem não-invasiva e que expressa ER e Her, a MDA-MB-231 apresenta um fenótipo triplonegativo, altamente invasivo e é geralmente considerada um modelo de linhagem celular resistente. Além disso, foram reportadas lesões moleculares distintas para as linhagens, como KRAS e BRAF: as células MDA-MB-231 apresentam mutações ativadoras, enquanto a MCF7 apresenta sua forma selvagem (SIMI *et al.*, 2008). Apesar das diferenças na expressão de KRAS e BRAF, além de moléculas-chave como ER e Her2, nós observamos que ambas as linhagens celulares foram semelhantes no que diz respeito à sensibilidade à doxo. Tendo em vista que o câncer de mama é uma doença altamente heterogênea (CURTIS *et al.*, 2012), resultados obtidos a partir de experimentos *in vitro* baseados em apenas uma linhagem celular não refletem totalmente a biologia do câncer de mama.

Em resumo, demonstramos que a doxo é capaz de atuar por diferentes mecanismos e desencadear a regulação de múltiplas vias de sinalização (Figura 6.1). Algumas vias, como a da Survivina e da XIAP, participam na cascata de sinalização mediada pela doxo, porém representam o resultado de um efeito global induzido pela droga, não desempenhando um papel essencial na determinação de um fenótipo de resistência. Além disso, o tratamento com a doxo induz a inativação do fator de transcrição Foxo3a e a redução de FoxM1, porém a superexpressão de FoxM1 é capaz de reverter a sensibilidade de células triplo-negativas.

Como conclusão final, nosso estudo demonstrou que as IAPs XIAP e Survivina isoladamente não desempenham papel na resistência à doxo, porém quando são reguladas pelo fator de transcrição FoxM1, uma molécula ascendente nessa via da sinalização, elas compõem um painel multifatorial de promoção de resistência à droga em células triplonegativas. Além disso, nosso estudo é o primeiro a relatar a regulação de XIAP por FoxM1

e como essa cooperação pode contribuir para a quimiorresistência. O conjunto desses achados sugere que essa via de sinalização possa ser explorada para intervenções terapêuticas futuras, principalmente em tumores triplo-negativos, onde grande parte dos pacientes adquire resistência ao tratamento, o que resulta em taxas elevadas de recidiva da doença.

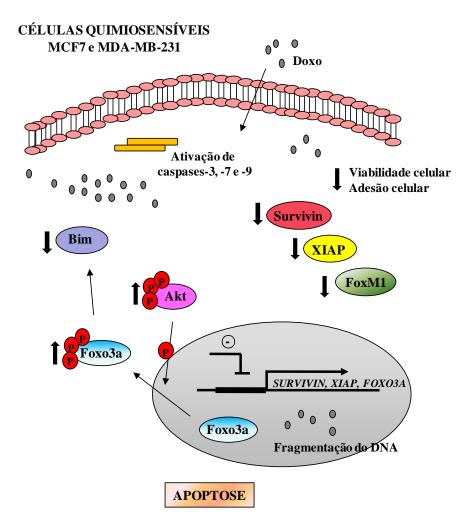


Figure 6.1: Mecanismos desencadeados pelo tratamento com a doxorrubicina (doxo) nas células MCF7 e MDA-MB-231. A exposição das linhagens celulares à doxo foi capaz de inibir a viabilidade e adesão celular, induzir fragmentação do DNA e ativação das caspases-3, -7 e -9, culminando com a morte celular por apoptose. Mediante o estímulo apoptótico, houve diminuição dos níveis das proteínas antiapoptóticas Survivina e XIAP e do fator de transcrição FoxM1. Além disso, foi observado o aumento dos níveis de fosforilação de Akt e Foxo3a, translocação de Foxo3a do citoplasma para o núcleo e inibição da expresão da proteína proapoptótica Bim. Os níveis de RNAm da Survivina, XIAP e Foxo3a também foram reduzidos após a exposição à doxo, sugerindo sua regulação por mecanismos transcricionais. Adaptado de NESTAL DE MORAES *et al.*, 2012.

7. CONCLUSÕES

- A doxo induz a diminuição da viabilidade celular, fragmentação de DNA, perda da adesão celular e ativação das caspases-3, -7 e -9 nas linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231.
- A apoptose induzida pela doxo ocorre em células com diferentes *status* de p53.
- Os níveis proteicos e de RNAm de Survivina e XIAP são reduzidos após a exposição das células à doxo.
- A indução da superexpressão da Survivina não é capaz de conferir resistência à morte celular induzida pela doxo em ambas as linhagens.
- A inibição isolada ou simultânea da expressão de XIAP e Survivina não potencializa os efeitos citotóxicos da doxo, confirmando que as proteínas não desempenham papel na resistência a esse quimioterápico.
- O tratamento das células com a doxo resulta no aumento da fosforilação de Foxo3a e de
 Akt, redução dos níveis de RNAm de Foxo3a, diminuição da expressão de Bim e
 translocação de Foxo3a do núcleo para o citoplasma, apontando para a inativação de sua
 função transcricional.
- A expressão de FoxM1 é reduzida mediante o estímulo apoptótico induzido pela doxo e a indução de sua superexpressão é capaz de reverter o fenótipo de sensibilidade nas células MDA-MB-231.
- A indução da superexpressão de FoxM1 aumenta a expressão de Survivina e XIAP,
 sugerindo que essa via de sinalização seja relevante para promover a quimiorresistência
 no câncer de mama.

8. PERSPECTIVAS

Em amostras de pacientes com câncer de mama:

- Avaliar a expressão das proteínas Survivina, XIAP, Foxo3a e FoxM1 em pacientes com câncer de mama, por imunohistoquímica em TMA. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o nº 153/09 e se encontra em fase de finalização.
- Avaliar o papel de tais proteínas como biomarcadores de prognóstico, correlacionando sua expressão com as características clínico-biológicas das pacientes com câncer de mama (fase de finalização).
- Analisar a expressão de possíveis alvos transcricionais de FoxM1 em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama, por imunohistoquímica em TMA (em andamento).
- Investigar se há uma correlação entre a expressão do fator de transcrição FoxM1 com os seus possíveis alvos transcricionais, associando às características clinico-biológicas.

Em linhagens celulares derivadas de câncer de mama:

- Induzir o silenciamento gênico da Foxo3a, por siRNA, para investigar a sua possível relevância na regulação da apoptose induzida pela doxo e da expressão de Survivina e XIAP.
- Investigar se FoxM1 pode contribuir para a resistência à apoptose mediada por outros quimioterápicos utilizados no câncer de mama, como o docetaxel (em andamento).
- Avaliar outros alvos transcricionais de FoxM1 que possam estar contribuindo para a resistência à doxo em células MDA-MB-231 superexpressando o fator de transcrição.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIDA C., CROTTY P.L., MCGRATH J., *et al.* **Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation.** Am J Pathol. 1998 Jan;152(1):43-9.

AHMAD A, WANG Z, KONG D, *et al.* FoxM1 down-regulation leads to inhibition of proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through the modulation of extra-cellular matrix degrading factors. Breast Cancer Res Treat. 2010 Jul;122(2):337-46.

AHMED M, UDDIN S, HUSSAIN AR, *et al.* **FoxM1 and its association with matrix metalloproteinases (MMP) signaling pathway in papillary thyroid carcinoma.** J Clin Endocrinol Metab. 2012 Jan;97(1):E1-E13. doi: 10.1210/jc.2011-1506. Epub 2011 Nov 2.

AIRD KM, DING X, BARAS A, *et al.* Trastuzumab signaling in ErbB2-overexpressing inflammatory breast cancer correlates with X-linked inhibitor of apoptosis protein expression. Mol Cancer Ther. 2008 Jan;7(1):38-47.

ALTIERI D.C. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. Curr Opin Cell Biol. 2006 Dec;18(6):609-15.

ALTIERI D.C. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. Nat Rev Cancer. 2008 Jan;8(1):61-70.

ALVAREZ-FERNÁNDEZ M & MEDEMA RH. Novel functions of FoxM1: from molecular mechanisms to cancer therapy. Front Oncol. 2013;3:30.

AMBROSINI G., ADIDA C., ALTIERI D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med. 1997 Aug;3(8):917-21.

ARORA V., CHEUNG H.H., PLENCHETTE S., et al. Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. J Biol Chem. 2007 Sep 7;282(36):26202-9.

ASANUMA H., TORIGOE T., KAMIGUCHI K., *et al.* Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. Cancer Res. 2005 Dec 1;65(23):11018-25.

AZUHATA T., SCOTT D., GRIFFITH T.S., *et al.* **Survivin inhibits apoptosis induced by TRAIL, and the ratio between survivin and TRAIL receptors is predictive of recurrent disease in neuroblastoma.** J Pediatr Surg. 2006 Aug;41(8):1431-40.

BAJ G, ARNULFO A, DEAGLIO S, *et al.* **Arsenic trioxide and breast cancer: analysis of the apoptotic, differentiative and immunomodulatory effects.** Breast Cancer Res Treat. 2002 May;73(1):61-73.

BANKS D.P., PLESCIA J, ALTIERI D.C., *et al.* **Survivin does not inhibit caspase-3 activity.** Blood. 2000 Dec 1;96(12):4002-3.

BEARDMORE V.A., AHONEN L.J., GORBSKY G.J., *et al.* Survivin dynamics increases at centromeres during G2/M phase transition and is regulated by microtubule-attachment and Aurora B kinase activity. J Cell Sci. 2004 Aug 15;117(Pt 18):4033-42.

BEKTAS N, HAAF A, VEECK J, et al. Tight correlation between expression of the Forkhead transcription factor FOXM1 and HER2 in human breast cancer. BMC Cancer. 2008 Feb 6;8:42.

BERGAMASCHI A, CHRISTENSEN BL, KATZENELLENBOGEN BS. Reversal of endocrine resistance in breast cancer: interrelationships among 14-3-3ζ, FOXM1, and a gene signature associated with mitosis. Breast Cancer Res. 2011 Jun 29;13(3):R70.

BØRRESEN-DALE A.L. **TP53 and breast cancer.** Hum Mutat. 2003 Mar;21(3):292-300.

BRUNET A, BONNI A, ZIGMOND MJ, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell. 1999 Mar 19;96(6):857-68.

BRUNET A, KANAI F, STEHN J, *et al.* **14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport.** J Cell Biol. 2002 Mar 4;156(5):817-28.

BURZ C., BERINDAN-NEAGOE I., BALACESCU O., *et al.* **Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets.** Acta Oncol. 2009;48(6):811-21.

BURNELL, M., LEVINE, M. N., CHAPMAN *et al.* Cyclophosphamide, Epirubicin, and Fluorouracil Versus Dose-Dense Epirubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel Versus Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel in Node-Positive or High-Risk Node-Negative Breast Cancer. J. Clin Oncol. 2010 Jan 1;28(1):77-82.

CALL J.A., ECKHARDT S.G., CAMIDGE D.R. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. Lancet Oncol. 2008 Oct;9(10):1002-11.

CAMP RL, CHARETTE LA, RIMM DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. Lab Invest. 2000 Dec;80(12):1943-9.

CARR JR, PARK HJ, WANG Z, et al. FoxM1 mediates resistance to herceptin and paclitaxel. Cancer Res. 2010 Jun 15;70(12):5054-63.

CARTER BZ, KORNBLAU SM, TSAO T, *et al.* Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis. Blood. 2003; 102: 4179–86.

CHANDELE A., PRASAD V., JAGTAP J.C., *et al.* Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. Neoplasia. 2004 Jan-Feb;6(1):29-40.

CHARGARI C., TOILLON R.A., Macdermed D., *et al.* Concurrent hormone and radiation therapy in patients with breast cancer: what is the rationale? Lancet Oncol. 2009 Jan;10(1):53-60.

CHEN J., BASKERVILLE C., HAN Q., *et al.* **Alpha(v) integrin, p38 mitogen-activated protein kinase, and urokinase plasminogen activator are functionally linked in invasive breast cancer cells.** J Biol Chem. 2001 Dec 21;276(51):47901-5.

CHEN J, GOMES AR, MONTEIRO LJ, et al. Constitutively nuclear FOXO3a localization survival and promotes Akt phosphorylation in breast cancer. PLoSOne. 2010 Aug20;5(8):e12293.

COLEY HM. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. Cancer Treat Rev. 2008 Jun;34(4):378-90.

CONDUTAS DO INCA/MS. **Câncer de Mama.** Revista Brasileira de Cancerologia, 2001, 47(1): 9-19.

CORY S. & ADAMS J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer. 2002 Sep;2(9):647-56.

COSTA RH, KALINICHENKO VV, MAJOR ML, et al. New and unexpected: forkhead meets ARF. Curr Opin Genet Dev. 2005 Feb;15(1):42-8.

CRAIG DW, O'SHAUGHNESSY JA, KIEFER JA, *et al.* Genome and transcriptome sequencing in prospective metastatic triple-negative breast cancer uncovers therapeutic vulnerabilities. Mol Cancer Ther. 2013 Jan;12(1):104-16.

CROOK N.E., CLEM R.J., MILLER L.K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. J Virol. 1993 Apr;67(4):2168-74.

CULMSEE C. & PLESNILA N. **Targeting Bid to prevent programmed cell death in neurons.** Biochem Soc Trans. 2006 Dec;34(Pt 6):1334-40.

CURTIS C, SHAH SP, CHIN SF *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of **2,000** breast tumours reveals novel subgroups. Nature 2012 486: 346-352.

DAI B, PIEPER RO, LI D, *et al.* FoxM1B regulates NEDD4-1 expression, leading to cellular transformation and full malignant phenotype in immortalized human astrocytes. Cancer Res. 2010 Apr 1;70(7):2951-61.

DAN HC, SUN M, KANEKO S, et al. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). J Biol Chem. 2004 Feb 13;279(7):5405-12

DAWOOD S, HU R, HOMES MD, *et al.* Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study. Breast Cancer Res Treat. 2011 Feb;126(1):185-92.

DAWSON SJ, PROVENZANO E, CALDAS C. **Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications.** Eur J Cancer. 2009 Sep;45 Suppl 1:27-40.

DE FALCO M. & DE LUCA A. Cell Cycle as a Target of Antineoplastic Drugs. Curr Pharm Des. 2010 Feb 18.

DE GRAAF A.O., DE WITTE T., JANSEN J.H. Inhibitor of apoptosis proteins: new therapeutic targets in hematological cancer? Leukemia. 2004 Nov;18(11):1751-9.

DEAN E, JODRELL D, CONNOLLY K, et al. Phase I trial of AEG35156 administered as a 7-day and 3-day continuous intravenous infusion in patients with advanced refractory cancer. J Clin Oncol. 2009 Apr 1;27(10):1660-6.

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.

DEVARAJAN E., SAHIN A.A., CHEN J.S, *et al.* **Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance.** Oncogene. 2002 Dec 12;21(57):8843-51.

DEVERAUX Q.L. & REED J.C. **IAP family proteins--suppressors of apoptosis.** Genes Dev. 1999 Feb 1;13(3):239-52.

DHILLON KK, SWISHER EM, TANIGUCHI T. Secondary mutations of BRCA1/2 and drug resistance. Cancer Sci. 2011 Apr;102(4):663-9.

Di FAZIO P, OCKER M, MONTALBANO R. New drugs, old fashioned ways: ER stress induced cell death. Curr Pharm Biotechnol. 2012 Sep 1;13(11):2228-34

DI X, SHIU RP, NEWSHAM IF, *et al.* **Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin.** Biochem Pharmacol. 2009 77: 1139-1150.

DOHI T. & ALTIERI D.C. Mitochondrial dynamics of survivin and "four dimensional" control of tumor cell apoptosis. Cell Cycle. 2005 Jan;4(1):21-3.

DOHI T., OKADA K., XIA F., *et al.* **An IAP-IAP complex inhibits apoptosis.** J Biol Chem. 2004 Aug 13;279(33):34087-90.

DOUARD R, MOUTEREAU S, PERNET P, *et al.* Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. Surgery. 2006 May;139(5):665-70.

DUBREZ-DALOZ L, DUPOUX A, CARTIER J. **IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins.** Cell Cycle. 2008 Apr 15;7(8):1036-46.

DUCKETT C.S. IAP proteins: sticking it to Smac. Biochem J. 2005 Jan 1;385(Pt 1):e1-2.

ECKELMAN B.P., SALVESEN G.S., SCOTT F.L. **Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family.** EMBO Rep. 2006 Oct;7(10):988-94.

ELSTON C.W. & ELLIS I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. Histopathology 1991; 19; 403-410. Histopathology. 2002 Sep;41(3A):151-2, discussion 152-3.

ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

ENGELSMA D., RODRIGUEZ J.A., FISH A., *et al.* **Homodimerization antagonizes nuclear export of survivin.** Traffic. 2007 Nov;8(11):1495-502.

FISHER B, BROWN AM, DIMITROV NV, *et al.* Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. J Clin Oncol. 1990 8: 1483-1496.

FISCHER U., JÄNICKE R.U., SCHULZE-OSTHOFF K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. Cell Death Differ. 2003 Jan;10(1):76-100.

FITZGIBBONS P.L., PAGE D.L., WEAVER D., *et al.* **Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999**. Arch Pathol Lab Med. 2000 Jul;124(7):966-78.

FLYGARE JA, BERESINI M, BUDHA N, *et al.* Discovery of a Potent Small-Molecule Antagonist of Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins and Clinical Candidate for the Treatment of Cancer (GDC-0152). J Med Chem. 2012 Mar 28. [Epub ahead of print]

FORTUGNO P., WALL N.R., GIODINI A., *et al.* Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. J Cell Sci. 2002 Feb 1;115(Pt 3):575-85.

FOSTER F.M., OWENS T.W., TANIANIS-HUGHES J., *et al.* **Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer.** Breast Cancer Res. 2009;11(3):R41.

FRANCIS RE, MYATT SS, KROL J, *et al.* **FoxM1 is a downstream target and marker of HER2 overexpression in breast cancer.** Int J Oncol. 2009 Jul;35(1):57-68.

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

FULDA S & VUCIC D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. Nat Rev Drug Discov. 2012 Feb 1;11(2):109-24. doi: 10.1038/nrd3627. Review. Erratum in: Nat Rev Drug Discov. 2012 Apr;11(4):331.

GALBÁN S & DUCKETT CS. **XIAP** as a ubiquitin ligase in cellular signaling. Cell Death Differ. 2010; 17: 54-60.

GARTEL AL. A new target for proteasome inhibitors: FOXM1. Expert Opin Investig Drugs. 2010 February; 19(2): 235–242.

GEWIRTZ D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochem Pharmacol. 1999 Apr 1;57(7):727-41.

GEWIRTZ D.A., SUNDARAM S., MAGNET K.J. Influence of topoisomerase II inhibitors and ionizing radiation on growth arrest and cell death pathways in the breast tumor cell. Cell Biochem Biophys. 2000;33(1):19-31.

GHAVAMI S., HASHEMI M., ANDE S.R., *et al.* **Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes.** J Med Genet. 2009 Aug;46(8):497-510.

GOLSTEIN P. & KROEMER G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends Biochem Sci. 2007 Jan;32(1):37-43.

GONZÁLEZ-LÓPEZ M, WELSH K, FINLAY D, *et al.* Design, synthesis and evaluation of monovalent Smac mimetics that bind to the BIR2 domain of the anti-apoptotic protein XIAP. Bioorg Med Chem Lett. 2011 Jul 15;21(14):4332-6.

GOWN AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. Mod Pathol. 2008 May;21 Suppl 2:S8-S15.

GREEN D.R &. KROEMER G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. Nature. 2009 Apr 30;458(7242):1127-30.

GREER EL, BRUNET A. **FOXO** transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. Oncogene. 2005 Nov 14;24(50):7410-25.

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

GUHA M., PLESCIA J., LEAV I., *et al.* **Endogenous tumor suppression mediated by PTEN involves survivin gene silencing.** Cancer Res. 2009 Jun15;69(12):4954-8.

GUO S. & SONENSHEIN G.E. Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. Mol Cell Biol. 2004 Oct;24(19):8681-90.

GUSAROVA GA, WANG IC, MAJOR ML, *et al.* **A cell-penetrating ARF peptide inhibitor of FoxM1 in mouse hepatocellular carcinoma treatment.** J Clin Invest. 2007 Jan;117(1):99-111.

HALASI M & GARTEL AL. **Targeting FOXM1 in cancer.** Biochem Pharmacol. 2013 Mar 1;85(5):644-52.

HENRIKSON K.P., SALAZAR S.L., FENTON J.W. 2nd, *et al.* **Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness**. Br J Cancer. 1999 Feb;79(3-4):401-6.

HILMI C., LARRIBERE L., DECKERT M., *et al.* **Involvement of FKHRL1 in melanoma cell survival and death.** Pigment Cell Melanoma Res. 2008 Apr;21(2):139-46.

HINNIS A.R., LUCKETT J.C. & WALKER R.A. 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.

HOFFMAN W.H., BIADE S., ZILFOU J.T., *et al.* **Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53.** J Biol Chem. 2002 Feb 1;277(5):3247-57.

HOLOCH P.A. & GRIFFITH T.S. **TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies**. Eur J Pharmacol. 2009 Dec 25;625(1-3):63-72.

HORVITZ H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans. Cancer Res. 1999 Apr 1;59(7 Suppl):1701s-1706s.

HU MC, LEE DF, XIA W, et al. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. Cell. 2004 Apr 16;117(2):225-37.

HUANG H & TINDALL DJ. Regulation of FOXO protein stability via ubiquitination and proteasome degradation. Biochim Biophys Acta. 2011 Nov;1813(11):1961-4.

HUNTER A.M., LACASSE E.C., KORNELUK R.G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. Apoptosis. 2007 Sep;12(9):1543-68.

HWANG-VERSLUES W.W., CHANG K.J., LEE E.Y., *et al.* **Breast cancer stem cells and tumor suppressor genes.** J Formos Med Assoc. 2008 Oct;107(10):751-66.

JAFFER S, ORTA L, SUNKARA S, *et al.* Immunohistochemical detection of antiapoptotic protein X-linked inhibitor of apoptosis in mammary carcinoma. Hum Pathol. 2007 Jun;38(6):864-70.

JAHNKE U., HIGGINBOTTOM K., NEWLAND A.C., *et al.* Cell death in leukemia: passenger protein regulation by topoisomerase inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Oct 5;361(4):928-33.

JÄNICKE R.U., SPRENGART M.L., WATI M.R., *et al.* Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. J Biol Chem. 1998 Apr 17;273(16):9357-60.

JEONG S.Y. & SEOL D.W. The role of mitochondria in apoptosis. BMB Rep. 2008 Jan 31;41(1):11-22.

JIN GS, KONDO E, MIYAKE T, *et al.* Expression and intracellular localization of **FKHRL1** in mammary gland neoplasms. Acta Med Okayama. 2004 Aug;58(4):197-205.

JOHNSTONE R.W., RUEFLI A.A., LOWE S.W. **Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy.** Cell. 2002 Jan 25;108(2):153-64.

KAESTNER KH, KNOCHEL W, MARTINEZ DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. Genes Dev. 2000 Jan 15;14(2):142-6.

KALYANARAMAN B., JOSEPH J., KALIVENDI S., *et al.* **Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity.** Mol Cell Biochem. 2002 May-Jun;234-235(1-2):119-24.

KARADEDOU CT, GOMES AR, CHEN J, et al. **FOXO3a represses VEGF expression through FOXM1-dependent and -independent mechanisms in breast cancer.** Oncogene. 2012;31:1845-58.

KATAYOSE D., GUDAS J., NGUYEN H., *et al.* Cytotoxic effects of adenovirus-mediated wild-type p53 protein expression in normal and tumor mammary epithelial cells. Clin Cancer Res. 1995 Aug;1(8):889-97.

KERR J.F., WYLLIE A.H., CURRIE A.R. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** Br J Cancer. 1972 Aug;26(4):239-57.

KIM H., RAFIUDDIN-SHAH M., TU H.C., *et al.* **Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies.** Nat Cell Biol. 2006a Dec;8(12):1348-58.

KIM R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. Cancer. 2005 Apr 15;103(8):1551-60.

KIM R., EMI M., TANABE K. **Role of mitochondria as the gardens of cell death.** Cancer Chemother Pharmacol. 2006b May;57(5):545-53.

KIM SH, MILLER FR, TAIT L, *et al.* **Proteomic and phosphoproteomic alterations in benign, premalignant and tumor human breast epithelial cells and xenograft lesions: biomarkers of progression.** Int J Cancer. 2009 Jun 15;124(12):2813-28.

KLEIN U.R., NIGG E.A., Gruneberg U. Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP. Mol Biol Cell. 2006 Jun;17(6):2547-58.

KNAPPSKOG S, Lønning PE. **P53 and its molecular basis to chemoresistance in breast cancer.** Expert Opin Ther Targets. 2012 Mar;16 Suppl 1:S23-30.

KNAUER S.K., BIER C., HABTEMICHAEL N., *et al.* **The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function.** EMBO Rep. 2006 Dec;7(12):1259-65.

KNAUER S.K., BIER C., SCHLAG P., *et al.* The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. Cell Cycle. 2007a Jun 15;6(12):1502-9.

KNAUER S.K., KRÄMER O.H., KNÖSEL T., *et al.* **Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin.** FASEB J. 2007b Jan;21(1):207-16.

KNUEFERMANN C., LU Y., LIU B., *et al.* **HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells.** Oncogene. 2003 May 22;22(21):3205-12.

KONECNY GE, PAULETTI G, UNTCH M, *et al.* **Association between HER2, TOP2A, and response to anthracycline-based preoperative chemotherapy in high-risk primary breast cancer.** Breast Cancer Res Treat. 2010 Apr;120(2):481-9.

KORVER W, ROOSE J, CLEVERS H. The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells. Nucleic Acids Res. 1997 May 1;25(9):1715-9.

KRETSCHMER C, STERNER-KOCK A, SIEDENTOPF F, *et al.* **Identification of early molecular markers for breast cancer.** Mol Cancer. 2011 Feb 11;10(1):15.

KROL J, FRANCIS RE, ALBERGARIA A, *et al.* The transcription factor FOXO3a is a crucial cellular target of gefitinib (Iressa) in breast cancer cells. Mol Cancer Ther. 2007 Dec;6(12 Pt 1):3169-79.

KWOK JM, MYATT SS, MARSON CM, *et al.* **Thiostrepton selectively targets breast cancer cells through inhibition of forkhead box M1 expression.** Mol Cancer Ther. 2008 Jul;7(7):2022-32.

KWOK JM, PECK B, MONTEIRO LJ, et al. **FOXM1 confers acquired cisplatin resistance in breast cancer cells.** Mol Cancer Res. 2010 Jan;8(1):24-34.

LAMKANFI M., FESTJENS N., DECLERCQ W., et al. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. Cell Death Differ. 2007 Jan;14(1):44-55.

LEE HY, YOUN SW, KIM JY, et al. FOXO3a turns the tumor necrosis factor receptor signaling towards apoptosis through reciprocal regulation of c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Jan;28(1):112-20.

LEE JS, CHU IS, HEO J, *et al.* Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. Hepatology. 2004 Sep;40(3):667-76.

LEUNG TW, LIN SS, TSANG AC, *et al.* **Over-expression of FoxM1 stimulates cyclin B1 expression.** FEBS Lett. 2001 Oct 19;507(1):59-66.

- LI F, ACKERMANN EJ, BENNETT CF, et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. Nat Cell Biol. 1999 Dec;1(8):461-6.
- LI F., AMBROSINI G., CHU E.Y., *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. Nature. 1998 Dec10;396(6711):580-4.
- LI F. & ALTIERI D.C. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. Cancer Res. 1999 Jul 1;59(13):3143-51.
- LI F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. Br J Cancer. 2005 Jan 31;92(2):212-6.
- LI Q.X., ZHAO J., LIU J.Y., *et al.* Survivin stable knockdown by siRNA inhibits tumor cell growth and angiogenesis in breast and cervical cancers. Cancer Biol Ther. 2006 Jul;5(7):860-6.
- LI X, LU Y, LIANG K, *et al.* **Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells.** Breast Cancer Res. 2005;7(5):R589-97
- LING X., BERNACKI R.J., BRATTAIN M.G., *et al.* Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. J Biol Chem. 2004 Apr 9;279(15):15196-203.
- LISTON P, ROY N, TAMAI K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. Nature. 1996 Jan 25;379(6563):349-53.
- LIU M, DAI B, KANG SH, *et al.* **FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells.** Cancer Res. 2006 Apr 1;66(7):3593-602.
- LIU SS, TSANG BK, CHEUNG AN, *et al.* **Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma.** Eur. J Cancer 2001; 37: 1104-10.
- LONNING PE. **Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress?** Ann Oncol. 2007 Sep;18 Suppl 8:viii3-7.
- LOTHSTEIN L., ISRAEL M., SWEATMAN T.W. Anthracycline drug targeting: cytoplasmic versus nuclear--a fork in the road. Drug Resist Updat. 2001 Jun;4(3):169-77.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., *et al.* **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75.

MA RY, TONG TH, CHEUNG AM, et al. Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1c. J Cell Sci. 2005 Feb 15;118(Pt 4):795-806.

MACFARLANE M, MERRISON W, BRATTON SB, *et al.* **Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro**. J Biol Chem. 2002 Sep 27;277(39):36611-6.

MADUREIRA PA, VARSHOCHI R, CONSTANTINIDOU D, *et al.* **The Forkhead box M1 protein regulates the transcription of the estrogen receptor alpha in breast cancer cells.** J Biol Chem. 2006 Sep 1;281(35):25167-76

MAHMOOD Z. & SHUKLA Y. **Death receptors: Targets for cancer therapy.** Exp Cell Res. 2009 Dec 21.

MAJOR ML, LEPE R, COSTA RH. Forkhead box M1B transcriptional activity requires binding of Cdk-cyclin complexes for phosphorylation-dependent recruitment of p300/CBP coactivators. Mol Cell Biol. 2004 Apr;24(7):2649-61.

MANDLEKAR S., YU R., TAN T.H., *et al.* **Activation of caspase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase-1 signaling pathways in tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells.** Cancer Res. 2000 Nov 1;60(21):5995-6000.

MARTIN KJ, PATRICK DR, BISSELL MJ, et al. Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets. PLoS One. 2008 Aug 20;3(8):e2994.

MARUSAWA H., MATSUZAWA S., WELSH K., et al. **HBXIP** functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. EMBO J. 2003 Jun 2;22(11):2729-40.

MCGOVERN UB, FRANCIS RE, PECK B, *et al.* **Gefitinib** (**Iressa**) **represses FOXM1 expression via FOXO3a in breast cancer.** Mol Cancer Ther. 2009 Mar;8(3):582-91.

MILLOUR J, CONSTATINIDOU D, STAVROPOULOU AV, *et al.* FOXM1 is a transcriptional target of ERalpha and has a critical role in breast cancer endocrine sensitivity and resistance. Oncogene. 2010 May 20;29(20):2983-95

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil [texto na internet]. Rio de Janeiro, INCA, 2011.

MIRZA A., MCGUIRK M., HOCKENBERRY T.N., *et al.* **Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway.** Oncogene. 2002 Apr 18;21(17):2613-22.

MITA A.C., MITA M.M., NAWROCKI S.T., *et al.* Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. Clin Cancer Res. 2008 Aug 15;14(16):5000-5.

MIYAGUCHI Y, TSUCHIYA K, SAKAMOTO K. **P53** negatively regulates the transcriptional activity of FOXO3a under oxidative stress. Cell Biol Int. 2009 Aug;33(8):853-60.

MIZUTANI H., TADA-OIKAWA S., HIRAKU Y., *et al.* **Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide.** Life Sci. 2005 Feb 11;76(13):1439-53.

MONDELLO C. & SCOVASSI A.I. Apoptosis: a way to maintain healthy individuals. Subcell Biochem. 2010;50:307-23.

MORENO-ASPITIA A. & PEREZ E.A. Anthracycline- and/or taxane-resistant breast cancer: results of a literature review to determine the clinical challenges and current treatment trends. Clin Ther. 2009 Aug;31(8):1619-40.

MORIAI R., TSUJI N., MORIAI M., *et al.* Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2009 Sep;117(2):261-71.

MOSMAMM T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

MUFTI AR, BURSTEIN E, DUCKETT CS. **XIAP: cell death regulation meets copper homeostasis.** Arch Biochem Biophys. 2007 Jul 15;463(2):168-74.

MYATT SS, LAM EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. Nat Rev Cancer. 2007 Nov;7(11):847-59.

NAGARAJA G.M., OTHMAN M., FOX B.P. *et al.* Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. Oncogene. 2006 Apr 13;25(16):2328-38.

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 Nov;81(11):824-31.

NAKAMURA S, HIRANO I, OKINAKA K, *et al.* The **FOXM1** transcriptional factor promotes the proliferation of leukemia cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. Carcinogenesis. 2010 Nov;31(11):2012-21

NASSAR A., LAWSON D., COTSONIS G. *et al.* Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2008 Mar;16(2):113-20.

NESTAL DE MORAES, G., CARVALHO, E, MAIA, R.C., *et al.*. **Immunodetection of caspase-3 by Western blot using glutaraldehyde**. Anal Biochemistry. 2011a Aug 15;415(2):203-5.

NESTAL DE MORAES G., SILVA K.L., VASCONCELOS F.C., *et al.* Survivin overexpression correlates with an apoptosis-resistant phenotype in chronic myeloid leukemia cells. Oncol Rep. 2011b Jun;25(6):1613-9.

NESTAL DE MORAES, G., SOUZA, PS, COSTAS, FC, et al. The interface between BCR-ABL dependent and independent resistance signaling pathways in chronic myeloid leukemia. Leukemia Research and Treatment. 2012 (in print)

NOTON E.A., COLNAGHI R., TATE S., *et al.* Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis. J Biol Chem. 2006 Jan 13;281(2):1286-95.

NUÑEZ G., BENEDICT M.A., HU Y., et al. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. Oncogene. 1998 Dec 24;17(25):3237-45.

O'CONNOR D.S., WALL N.R., PORTER A.C., et al. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. Cancer Cell. 2002 Jul;2(1):43-54.

OBEXER P, GEIGER K, AMBROS PF, et al. **FKHRL1-mediated expression of Noxa and Bim induces apoptosis via the mitochondria in neuroblastoma cells.** Cell Death Differ. 2007 Mar;14(3):534-47.

OBEXER P., HAGENBUCHNER J., UNTERKIRCHER T., *et al.* **Repression of BIRC5/survivin by FOXO3/FKHRL1 sensitizes human neuroblastoma cells to DNA damage-induced apoptosis.** Mol Biol Cell. 2009 Apr;20(7):2041-8.

OKADA H. & MAK T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. Nat Rev Cancer. 2004 Aug;4(8):592-603.

OOST TK, SUN C, ARMSTRONG RC, *et al.* **Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer.** J Med Chem. 2004 Aug 26;47(18):4417-26.

PAIK S, HAZAN R, FISHER ER, *et al.* Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. J Clin Oncol. 1990 Jan;8(1):103-12.

PANDIT B, HALASI M, GARTEL AL. **p53 negatively regulates expression of FoxM1**. Cell Cycle. 2009 Oct 15;8(20):3425-7.

PAPANIKOLAOU V, ILIOPOULOS D, DIMOU I, *et al.* Survivin regulation by HER2 through NF-κB and c-myc in irradiated breast cancer cells. J Cell Mol Med. 2011 Jul;15(7):1542-50.

PARK HJ, COSTA RH, LAU LF, et al. Anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated proteolysis of the forkhead box M1 transcription factor is critical for regulated entry into S phase. Mol Cell Biol. 2008 Sep;28(17):5162-71.

PARK YY, JUNG SY, JENNINGS NB, et al. **FOXM1 mediates Dox resistance in breast cancer by enhancing DNA repair.** Carcinogenesis. 2012 Oct;33(10):1843-53.

PENG X.C., YANG L., YANG L.P., *et al.* Efficient inhibition of murine breast cancer growth and metastasis by gene transferred mouse survivin Thr34-->Ala mutant. J Exp Clin Cancer Res. 2008 Sep 25;27:46.

PEROU C.M., SØRLIE T., EISEN M.B., *et al.* **Molecular portraits of human breast tumours**. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.

PHILCHENKOV A., ZAVELEVICH M., KROCZAK T.J., *et al.* Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. Exp Oncol. 2004 Jun;26(2):82-97.

PILARSKY C, WENZIG M, SPECHT T, *et al.* **Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data.** Neoplasia. 2004 Nov-Dec;6(6):744-50.

RADHAKRISHNAN SK, BHAT UG, HUGHES DE, *et al.* **Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box M1**. Cancer Res. 2006 Oct 1;66(19):9731-5.

RAYCHAUDHURI P, PARK HJ. **FoxM1: a master regulator of tumor metastasis.** Cancer Res. 2011 Jul 1;71(13):4329-33.

RENAULT VM, THEKKAT PU, HOANG KL, *et al.* The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. Oncogene. 2011 Jul 21;30(29):3207-21.

RODRÍGUEZ J.A., SPAN S.W., FERREIRA C.G., *et al.* **CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein Survivin.** Exp Cell Res. 2002 Apr 15;275(1):44-53.

RYAN B.M., KONECNY G.E., 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.

SAYEED A, KONDURI SD, LIU W, *et al.* Estrogen receptor alpha inhibits p53-mediated transcriptional repression: implications for the regulation of apoptosis. Cancer Res. 2007 Aug 15;67(16):7746-55.

SCHIMMER A.D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. Cancer Res. 2004 Oct 15;64(20):7183-90.

SCOTT F.L., DENAULT J.B., RIEDL S.J., *et al.* **XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs.** EMBO J. 2005 Feb 9;24(3):645-55.

SEEGER JM, BRINKMANN K, YAZDANPANAH B, *et al.* **Elevated XIAP expression alone does not confer chemoresistance.** Br J Cancer. 2010 Jun 8;102(12):1717-23.

SIMI L, PRATESI N, VIGNOLI M, *et al.* **High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer.** Am J Clin Pathol. 2008 130: 247-253.

SIMON, J., BINES, J, BARRIOS, C., *et al.* Clinical Characteristics and Outcome of Treatment of Brazilian Women with Breast Cancer Treated at Public and Private Institutions – The AMAZONE Project of the Brazilian Breast Cancer Study Group (GBECAM). Cancer Research: Vol 69, Issue 24, Supplement 3 (SABCS-09-3082), 2009. doi: 10.1158/0008-5472.

SINGH A, YE M, BUCUR O, *et al.* **Protein phosphatase 2A reactivates FOXO3a through a dynamic interplay with 14-3-3 and AKT.** Mol Biol Cell. 2010 Mar 15;21(6):1140-52.

SINGH M., BLEILE M.J., SHROYER A.L., *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.

SONG Z., YAO X., WU M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. J Biol Chem. 2003 Jun 20;278(25):23130-40.

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

SPAN P.N., SWEEP F.C., WIEGERINCK E.T. *et al.* Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. Clin Chem. 2004 Nov;50(11):1986-93.

SPARANO J.A. & PAIK S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. J Clin Oncol. 2008 Feb 10;26(5):721-8.

SPEIDEL D. **Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death**. Trends Cell Biol. 2010 Jan;20(1):14-24

SRINIVASULA S.M. & ASHWELL J.D. **IAPs: what's in a name?** Mol Cell. 2008 Apr 25;30(2):123-35.

SRIVASTAVA RK, SRIVASTAVA AR, KORSMEYER SJ, *et al.* Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. Mol Cell Biol. 1998 18: 3509-3517.

SUNTERS A., FERNÁNDEZ DE MATTOS S., STAHL M., *et al.* **FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines.** J Biol Chem. 2003 Dec 12;278(50):49795-805.

SUNTERS A., MADUREIRA P.A., POMERANZ K.M., *et al.* Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. Cancer Res. 2006 Jan 1;66(1):212-20.

SUZUKI Y, IMAI Y, NAKAYAMA H, *et al.* **A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death**. Mol Cell. 2001 Sep;8(3):613-21.

TAI S.K., TAN O.J., CHOW V.T. *et al.* Differential expression of metallothionein 1 and 2 isoforms in breast cancer lines with different invasive potential: identification of a novel nonsilent metallothionein-1H mutant variant. Am J Pathol. 2003 Nov;163(5):2009-19

TAMM I, WANG Y, SAUSVILLE E, *et al.* **IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs.** Cancer Res. 1998 Dec 1;58(23):5315-20.

TAMM I., KORNBLAU S.M., SEGALL H., *et al.* Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. Clin Cancer Res. 2000 May;6(5):1796-803.

TAMM I., RICHTER S., OLTERSDORF D., *et al.* High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res. 2004 Jun 1;10(11):3737-44.

TANAKA K., IWAMOTO S., GON G., *et al.* Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. Clin Cancer Res. 2000 Jan;6(1):127-34.

TANDON AK, CLARK GM, CHAMNESS GC, et al. **HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer.** J Clin Oncol. 1989 Aug;7(8):1120-8.

TESTA U. & RICCIONI R. **Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia.** Haematologica. 2007 Jan;92(1):81-94.

THOMPSON E.W., PAIK S., BRUNNER N., SOMMERS C.L., ZUGMAIER G., CLARKE R., SHIMA T.B., TORRI J., DONAHUE S., LIPPMAN M.E., *et al*, VINCENT T. **Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines.** J Cell Physiol. 1992 Mar;150(3):534-44.

TRAN H., BRUNET A., GRIFFITH EC., et al. The many forks in FOXO'S road. SCI STKE. 2003 Mar 4; 2003(172):RE5.

TSUJI N., FURUSE K., ASANUMA K., *et al.* Mutations of the p53 gene and loss of heterozygosity at chromosome 17p13.1 are associated with increased survivin expression in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2004 Sep;87(1):23-31.

UPHOFF CC, DREXLER HG. **Detection of mycoplasma contaminations.** Methods Mol Biol. 2005; 290:13-23.

VAN DER HEIDE LP, HOEKMAN MF, SMIDT MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. Biochem J. 2004 Jun 1;380(Pt 2):297-309.

VAUX D.L. & SILKE J. **IAPs, RINGs and ubiquitylation.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Apr;6(4):287-97.

VASATURO F., MALACRINO C., SALLUSTI E. *et al.* **Role of extracellular matrix in regulation of staurosporine-induced apoptosis in breast cancer cells**. Oncol Rep. 2005 Apr;13(4):745-50.

VAYSSADE M, HADDADA H, FARIDONI-LAURENS L, *et al.* **P73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells.** Int J Cancer. 2005 116: 860-869.

VÉGRAN F, BOIDOT R, OUDIN C, *et al.* Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. Oncogene. 2007 Jan 11;26(2):290-7.

VELCULESCU V.E., MADDEN S.L., ZHANG L., *et al.* **Analysis of human transcriptomes.** Nat Genet. 1999 Dec;23(4):387-8.

VERDECIA M.A., HUANG H., DUTIL E., *et al.* **Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement.** Nat Struct Biol. 2000 Jul;7(7):602-8.

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

VUCIC D. & FAIRBROTHER W.J. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. Clin Cancer Res. 2007 Oct 15;13(20):5995-6000.

WANG IC, CHEN YJ, HUGHES D. Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. Mol Cell Biol. 2005 Dec;25(24):10875-94.

WANG S, HUANG X, LEE CK, *et al.* Elevated expression of erbB3 confers paclitaxel resistance in erbB2-overexpressing breast cancer cells via upregulation of Survivin. Oncogene. 2010 Jul 22;29(29):4225-36

WANG Z, AHMAD A, LI Y, et al. Forkhead box M1 transcription factor: A novel target for cancer therapy. Cancer Treat Rev. 2010 April; 36(2); 151-156.

WANG Z, BANERJEE S, KONG D, *et al.* **Down-regulation of Forkhead Box M1** transcription factor leads to the inhibition of invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells. Cancer Res. 2007 Sep 1;67(17):8293-300.

WANG Z, ZHENG Y, PARK HJ, *et al.* **Targeting FoxM1 effectively retards p53-null lymphoma and sarcoma.** Mol Cancer Ther. 2013 Feb 20. [Epub ahead of print]

WILKINSON JC, WILKINSON AS, GALBÁN S, *et al.* **Apoptosis-inducing factor is a target for ubiquitination through interaction with XIAP.** Mol Cell Biol. 2008 Jan;28(1):237-47.

WILSON MS, BROSENS JJ, SCHWENEN HD, *et al.* **FOXO and FOXM1 in cancer: the FOXO-FOXM1 axis shapes the outcome of cancer chemotherapy**. Curr Drug Targets. 2011 Aug;12(9):1256-66.

WIND NS, HOLEN I. Multidrug resistance in breast cancer: from in vitro models to clinical studies. Int J Breast Cancer. 2011;2011:967419.

WOLFF A.C., HAMMOND M.E., SCHWARTZ J.N., et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 2007 Jan 1;25(1):118-45.

WONG SW, TIONG KH, KONG WY, *et al.* Rapamycin synergizes cisplatin sensitivity in basal-like breast cancer cells through up-regulation of p73. Breast Cancer Res Treat. 2011 128: 301-313.

WONSEY DR & FOLLETTIE MT. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. Cancer Res. 2005 Jun 15;65(12):5181-9.

WRZESIEŃ-KUŚ A., SMOLEWSKI P., SOBCZAK-PLUTA A., *et al.* **The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias.** Apoptosis. 2004 Nov;9(6):705-15.

XIA W, BACUS S, HEDGE P, et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 May 16;103(20):7795-800.

YAMANAKA K, NAKATA M, KANEKO N, *et al.* **YM155, a selective survivin suppressant, inhibits tumor spread and prolongs survival in a spontaneous metastatic model of human triple negative breast cancer.** Int J Oncol. 2011 Sep;39(3):569-75.

YANG JY & HUNG MC. A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. Clin Cancer Res. 2009 Feb 1;15(3):752-7. Review.

YANG L, CAO Z, YAN H, et al. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. Cancer Res. 2003 Oct 15;63(20):6815-24.

YANG Y., FANG S., JENSEN J.P., *et al.* Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. Science. 2000 May 5;288(5467):874-7.

YAU C, WANG Y, ZHANG Y, et al. Young age, increased tumor proliferation and **FOXM1** expression predict early metastatic relapse only for endocrine-dependent breast cancers. Breast Cancer Res Treat. 2011 Apr;126(3):803-10.

YEH PY, CHUANG SE, YEH KH, *et al.* **Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death.** Oncogene. 2004 23: 3580-3588.

YOSHIDA Y, WANG IC, YODER HM, *et al.* The forkhead box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer. Gastroenterology. 2007 Apr;132(4):1420-31.

YOU H, YAMAMOTO K, MAK TW. Regulation of transactivation-independent proapoptotic activity of p53 by FOXO3a. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 13;103(24):9051-6.

ZANGEMEISTER-WITTKE U. & SIMON H.U. An IAP in action: the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy. Cell Cycle. 2004 Sep;3(9):1121-3.

ZHANG M, YANG J, LI F. Transcriptional and post-transcriptional controls of survivin in cancer cells: novel approaches for cancer treatment. J Exp Clin Cancer Res. 2006 Sep;25(3):391-402.

ZHANG Y, ZHU J, TANG Y, et al. X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: a new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma. Diagn Pathol. 2011 Jun 7;6:49.

ZHANG X, TANG N, HADDEN TJ, et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. Biochim Biophys Acta. 2011 Nov;1813(11):1978-86.

ZHAO J., TENEV T., MARTINS L.M., *et al.* **The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner.** J Cell Sci. 2000 Dec;113 Pt 23:4363-71.

ZHAO Y, WANG Y, ZHU WG. Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. J Mol Cell Biol. 2011 Oct;3(5):276-82.

ZHU H, ZHANG G, WANG Y, et al. Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces survivin expression via the ErbB2-beta-catenin/TCF4-survivin pathway in ErbB2-overexpressed breast cancer cells. Cancer Sci. 2010 May;101(5):1156-62.

ZILFOU J.T. & LOWE S.W. **Tumor Suppressive Functions of p53**. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009 Nov;1(5):a001883.

ZOU Y, TSAI WB, CHENG CJ, *et al.* Forkhead box transcription factor FOXO3a suppresses estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and tumorigenesis. Breast Cancer Res. 2008;10(1):R21.

10. ANEXOS

10.1 Trabalhos científicos publicados, não relacionados à tese de doutorado

10.1.1. NESTAL DE MORAES G., SILVA K.L., VASCONCELOS F.C., MAIA R.C. Survivin overexpression correlates with an apoptosis-resistant phenotype in chronic myeloid leukemia cells. Oncol Rep. 2011 Jun;25(6):1613-9.

Oncol Rep. 2011 Jun; 25(6):1613-9. doi: 10.3892/or.2011.1224. Epub 2011 Mar 22.

Survivin overexpression correlates with an apoptosis-resistant phenotype in chronic myeloid leukemia cells.

Nestal de Moraes G, Silva KL, Vasconcelos FC, Maia RC.

Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil.

Abstrac

Survivin is a member of the inhibitor of apoptosis protein family (IAP) that acts in both inhibition of apoptosis and regulation of the cell cycle. Despite the fact that survivin is overexpressed in almost all human malignancies, its expression is undetectable in most normal adult tissues, which is what makes it a potential target for anticancer interventions. The aim of this work was to investigate whether survivin is involved in resistance to idarubicin (ida), a drug commonly used in leukemia treatment. Cytotoxic assays using MTT showed that 1 µM of ida could inhibit 50% of cell viability in K562, a chronic myeloid leukemia cell line. Western blotting analysis revealed that survivin expression was increased in the cell line after treatment with ida 0.5 and 1 µM concentrations, protecting cells from ida-induced apoptosis. However, the highest ida concentrations tested were able to inhibit survivin levels and induce apoptosis in K562 cells, as evaluated by morphology and caspase-3 and -9 activation. These results indicate that survivin expression is involved in ida resistance in K562 leukemic cells. Flow cytometry analysis of the cell cycle showed that ida induced G2/M arrest in these cells and there was a statistically significant positive correlation between survivin expression and the percentage of cells in G2/M phase. This work supports the idea that survivin may contribute to an apoptosis-resistant phenotype by inhibiting ida-induced apoptosis and preventing cells from progressing in the cell cycle.

10.1.2 SOUZA PS, VASCONCELOS FC, 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.

Int J Oncol. 2011 Oct;39(4):925-33. doi: 10.3892/ijo.2011.1103. Epub 2011 Jun 28.

P-glycoprotein and survivin simultaneously regulate vincristine-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells.

Souza PS, Vasconcelos FC, De Souza Reis FR, Nestal De Moraes G, Maia RC.

Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Abstract

Overexpression of P-glycoprotein (Pgp/ABCB1) in tumor cells is associated with a classic phenotype of multidrug resistance (MDR). Moreover, some members of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family, such as survivin, contribute to an apoptosis-resistant phenotype, by inhibiting chemotherapy-induced cell death and promoting MDR. By using Western blotting, qRT-PCR, Annexin V and immunofluorescence assays we have demonstrated a relationship between Pgp and survivin in a prior sensitive chronic myeloid leukemia (CML) cell line (K562). A high dose of vincristine induced a concomitant overexpression of Pgp and survivin, which was associated with a low apoptotic index in the K562 cell line. In addition, we observed a cytoplasmic co-localization of Pgp and survivin, suggesting a functional association between these two proteins in apoptosis control by a common mechanism. In summary, our data suggest that Pgp and survivin should be analyzed in aggregate because they may have significant impact on drug resistance in CML cells.

10.1.3 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

Leuk Res Treatment. 2012;2012:671702. doi: 10.1155/2012/671702. Epub 2012 Apr 24.

The Interface between BCR-ABL-Dependent and -Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia.

Nestal de Moraes G, Souza PS, Costas FC, Vasconcelos FC, Reis FR, Maia RC.

Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Praça da Cruz Vermelha 23, 6° andar, Centro, 20230-130 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal hematopoietic disorder characterized by the presence of the Philadelphia chromosome which resulted from the reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22. The pathogenesis of CML involves the constitutive activation of the BCR-ABL tyrosine kinase, which governs malignant disease by activating multiple signal transduction pathways. The BCR-ABL kinase inhibitor, imatinib, is the front-line treatment for CML, but the emergence of imatinib resistance and other tyrosine kinase inhibitors (TKIs) has called attention for additional resistance mechanisms and has led to the search for alternative drug treatments. In this paper, we discuss our current understanding of mechanisms, related or unrelated to BCR-ABL, which have been shown to account for chemoresistance and treatment failure. We focus on the potential role of the influx and efflux transporters, the inhibitor of apoptosis proteins, and transcription factor-mediated signals as feasible molecular targets to overcome the development of TKIs resistance in CML.

10.2 Trabalhos científicos submetidos para publicação, não relacionados à tese de doutorado

10.2.1 SILVA KL, SOUZA PS, NESTAL DE MORAES, G, MOELLMANN-COELHO A, VASCONCELOS FC, MAIA RC. XIAP and P-glycoprotein co-expression is related to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia.

10.2.2 VASCONCELOS FC, NESTAL DE MORAES, G, MOELLMANN-COELHO A, MAIA RC. Phosphorylated Crkl (pCrkl) levels in association with P-glycoprotein (Pgp) activity identifies imatinib sensitive chronic myeloid leukemia patients samples.

10.3 Trabalho científico publicado, relacionado à tese de doutorado

10.3.1 NESTAL DE MORAES, G., CARVALHO, E, MAIA, R.C., STERNBERG, C. Immunodetection of caspase-3 by Western blot using glutaraldehyde. Anal Biochemistry. 2011 Aug 15;415(2):203-5.

Analytical Biochemistry 415 (2011) 203-205



Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio



Notes & Tips

Immunodetection of caspase-3 by Western blot using glutaraldehyde

Gabriela Nestal de Moraes, Érika Carvalho, Raquel C. Maia, Cinthya Sternberg*

Coordination of Clinical Research, Brazilian National Institute of Cancer (INCA), CEP 20231-050 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 24 January 2011 Received in revised form 13 April 2011 Accepted 19 April 2011 Available online 27 April 2011

ABSTRACT

Cell death by apoptosis triggers the engagement of a conserved intracellular machinery of execution, involving mainly the activation of the caspase family of cysteine proteases. Caspase-3 is a common effector of most of the apoptotic pathways and is able to cleave several target proteins whose degradation will contribute to the execution phase of the cell demise program. Here we present a modification of the Western blot protocol to improve sensitivity of caspase-3 detection, providing a valuable tool to access its activation in biological specimens.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Apoptosis represents the most studied type of programmed cell death and consists of a tightly controlled process that leads to cell degeneration and its further safe removal from the organism without eliciting inflammatory responses. Cell death with apoptotic morphology is accomplished by a conserved intracellular machinery of execution that is mainly attributed to the activation of the caspase family of cysteine proteases [1,2]. Caspase-3 is a common effector of most of the apoptotic pathways, expressed as a proenzyme of 32 kDa that in response to several stimuli is cleaved, generating two subunits of 17 and 12 kDa. The active enzyme, assembled as a double heterodimer between the two subunits, exhibits catalytic activity and is able to cleave several target proteins before the aspartate (P1 position) of an optimal recognition tetrapeptide sequence (DXXD) common to all caspase-3 substrates. The degradation of these substrates will contribute to the execution phase of the cell demise program.

Detection of active caspase-3 in cells and tissues can be achieved by several methods. Most common assays for examining caspase-3 activation include immunostaining or immunoblotting and colorimetric assays using fluorochrome substrates. Besides its usefulness as a tool in basic science, detection of caspase-3 might be soon making its way to clinical studies and molecular diagnosis laboratories because this protease has been shown recently to be a prognostic and predictive factor to both hematological and solid types of cancer. Caspase-3 protein expression was shown to be a predictor factor of survival in acute myelogenous leukemia patients [3] as well as to be a predictor of complete remission and survival for patients with acute lymphoblastic leukemia [4]. There are studies correlating the expression of caspase-3 and the prognosis for gliomas, non-small cell lung cancer, and primary resected esophageal squamous cell carcinoma [5-7]. Furthermore, caspase-3 expression was shown to be reduced in

* Corresponding author, Fax; +55 21 32076566, E-mail address; cstemberg@inca.gov.br (C. Sternberg) moderately and poorly differentiated prostatic tumors compared with well-differentiated prostate adenocarcinomas and the normal prostate, suggesting that the expression of this protease might have prognostic significance to prostate tumor patients [8]. Therefore, improvement in the detection of caspase-3 is an important issue not only for experimental settings in cell biology but also for preclinical research. Here we present a modification of the Western blot protocol to improve sensitivity of caspase-3 detection, providing a valuable tool to access its activation in biological specimens.

For immunodetection of recombinant active caspase-3, the resolved human recombinant active caspase-3 (Calbiochem) in 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)¹ was transferred to nitrocellulose (NC) membranes (Bio-Rad). The NC membranes were washed with distilled water and immediately treated with glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) at room temperature for varying time periods and concentrations. Glutaraldehyde was diluted with detergent-free Tris-buffered saline (TBS). After each treatment, glutaraldehyde was removed by washing with distilled water. Subsequently, the membranes were blocked with TBS containing 5% of nonfat dry milk diluted at room temperature for 1 h and then probed with 1:1000 anti-caspase-3 antibody (BD Biosciences Pharmingen) diluted with TBS containing 0.05% Tween 20 and 1:2000 diluted peroxidase-conjugated secondary antibody (GE Healthcare).

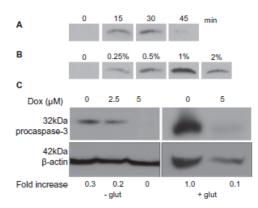
For immunodetection of caspase-3 in cell extracts, K562 cells were exposed to doxorubicin (Dox), harvested after a 48-h incubation, and caspase-3 was detected using 1:1000 anti-caspase-3 anti-body (BD Biosciences Pharmingen). Alternatively, MDA-231 cells were exposed to taxol, harvested after a 48-h incubation, and activated caspase was detected using 1:500 anti-activated caspase (US

¹ Abbreviations used: SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; NC, nitrocellulose; TBS, Tris-buffered saline; Dox, doxorubicin; PBS, phosp-hate-buffered saline; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; TEMED, N,N,N,N-tetramethylethylenediamine; APS, ammonium persulfate; HRP, horseradish peroxidase; PVDF, polyvinylidene fluoride.

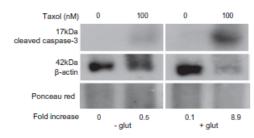
Biologicals). Pellets of 2 × 106 cells were washed with phosphatebuffered saline (PBS) and lysed in resuspension buffer (40 mM Tris-HCI and 40 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], pH 7.5) and 10% SDS for 15 min at 100 °C. The total protein was determined using the Bio-Rad protein assay solution. Lysates (80 or 100 µg) were subjected to SDS-PAGE on 15% polyacrylamide gels (acrylamide/30% bis-acrylamide, 25% H2O, 115 mM Tris-HCl buffer [pH 8.8], N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine [TEMED], and ammonium persulfate [APS]) and transferred to Hybond-P membranes. The membranes were treated with 1% glutaraldehyde (Acros Organics) diluted in TBS for 30 min, washed with 1× TBS, and blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat dry milk containing 0.2% Tween 20 before incubation with antibodies against caspase-3 (1:500 dilution, BD Biosciences) or β-actin (1:1000 dilution, Sigma-Aldrich) for 1 h. Blots were then exposed to horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti-mouse antibody (1:1000 dilution, GE Healthcare) for 1 h following four washing steps of 10 min each with TBS-Tween 20. Antibody complexes were visualized by an ECL Detection System (GE Healthcare).

Details of the fixing action of aldehydes are not known, although the general principles are understood. Formaldehyde and glutaraldehyde are the most commonly used aldehyde fixatives, and they generate crosslinking methylene bridges and Schiff bases between basic amino acid residues of proteins, Glutaraldehyde (normally used as a 2% buffered solution) causes deformation of \alpha-helix structures in proteins, and this might limit its application as a fixative for immunological stains. It is thought that the aldehydes form crosslinks between proteins, creating a gel, thereby retaining cellular constituents in their in vivo relationships to each other. Soluble proteins are fixed to structural proteins and rendered insoluble, giving some mechanical strength to the entire structure and enabling it to withstand subsequent processing [9]. However, it is more likely that the process of fixing proteins bound to NC membranes induces a crosslink among those proteins, decreasing protein loss due to several washes and the action of detergents and working solutions.

Because Western blot processing of membranes may lead to protein loss, we tested whether the glutaraldehyde fixation of blotted membranes could improve sensitivity of caspase-3 immunodetection. We resolved recombinant activated caspase-3 by 15% SDS-PAGE and transferred to a NC membrane, and the blotted membrane was incubated with different glutaraldehyde concentrations for several incubation periods. Fixation with glutaraldehyde improved immunoreactivity for activated caspase-3, and the optimal effect of fixation was observed at 1% glutaraldehyde after a 30-min incubation (Fig. 1A and B). However, we observed reduced immunoreactivity at 2% glutaraldehyde, suggesting that epitopes recognized by the antibody might be masked by excessive crosslinking. We can also observe this effect on immunoreactivity for β-actin, where glutaraldehyde fixation decreases the signal, although protein content was similar in samples (as shown by Ponceau red staining of membrane) (Figs. 1 and 2). In addition, we resolved K562 cell extracts either kept in the control condition or treated with Dox, an apoptosis inducer that triggers procaspase-3 cleavage and activation. We used the optimal condition set for recombinant active caspase-3 (1% glutaraldehyde for 30 min) (Fig. 1A and B), and we also observed increased immunoreactivity of procaspase-3 (Fig. 1C). This effect is not restricted to this specific cell line or antibody given that the same effect was observed in MDA-231 cells treated with taxol, where extracts were blotted with an antibody that recognizes activated caspase-3 (Fig. 2). It is worth noting that even when the loading control of β-actin shows reduced immunoreactivity in the sample after fixation with glutaraldehyde, the procaspase-3 band can be detected. We performed glutaraldehyde fixation in



Hg.1. Improved immunoreactivity of recombinant active caspase-3 by glutaraldehyde fixation of blotted NC membrane. The effect of glutaraldehyde fixation on immunoreactivity to activated caspase-3 was analyzed. (A) Membrane strips were treated with 1% glutaraldehyde for 0, 15, 30, and 45 min. Representative results are shown. (B) Each membrane strip was treated with 0%, 0.25%, 0.5%, 1%, and 2% glutaraldehyde for 30 min. (C) Protein extracts from either control or Dox-treated K562 cells. Procaspase-3 levels are better detected when membrane strips were treated with 1% glutaraldehyde for 30 min. Note that apoptosis induction by Dox induces the disappearance of procaspase-3 protein glut, glutaraldehyde.



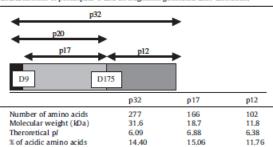
Hg. 2. Improved immunoreactivity of active caspase-3 by glutaraldehyde fixation of blotted NC membrane. The effect of glutaraldehyde fixation on immunoreactivity to activated caspase-3 was analyzed. Protein extracts from either control or taxoltreated MDA-231 cells were loaded, and the figure shows that active caspase-3 levels are better detected when membrane strips were treated with 1% glutaraldehyde for 30 min. Note that apoptosis induction by taxol induces the activation of procaspase-3 protein. Caspase-3 levels are expressed through the caspase-3/ β -actin densitometric ratio. glut, glutaraldehyde.

samples transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, however, we did not observe improved immunoreactivity for either procaspase or active caspase-3 in this setting (data not shown).

It has already been shown in the literature that the fixation of NC membranes with glutaraldehyde is able to stabilize the binding of small acidic proteins on NC membranes and to improve overall Western blot sensitivity [10,11]. According to molecular weight and theoretical pl calculation performed using the ProtParam tool (available at http://www.expasy.ch), we found that caspase-3, either as a proenzyme or as active subunits, is slightly acidic (Table 1), and perhaps the improvement in the immunostaining after fixation can be attributed to its physicochemical properties, corroborating the above-mentioned studies.

These results altogether point out that caspase-3 detection, either the proenzyme or the activated form, is greatly enhanced by glutaraldehyde fixation of blotted membrane. Difficulties in detecting this protein in samples might be due to poor retention of caspase-3 in the NC membrane, so fixation is expected to stabilize its binding and improve its detection. Thus, this method could

Table 1 Characteristics of procaspase-3 and its fragments generated after activation.



contribute to both investigational and preclinical studies of caspase-3 at the molecular level as well as to diagnostic tests in either the experimental or clinical oncology setting, especially for studies involving cases where immunohistochemistry analysis of paraffinembedded tissue is not achievable such as in nonresectable tumors, where only small fragments could be collected by biopsy or leukemia samples.

Acknowledgment

This work was supported by grants from the Foundation for Research Support from the State of Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- B. Zhivotovsky, D.H. Burgess, D.M. Vanags, S. Orrenius, Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 230 (1997) 481–488.
- V. Cryns, J. Yuan, Proteases to die for, Genes Dev. 12 (1998) 1551–1570.
 Z. Estrov, P.F. Thall, M. Talpaz, E.H. Estey, H.M. Kantarjian, M. Andreeff, D. Harris, Q. Van, M. Walterscheid, S.M. Komblau, Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia, Blood 92 (1998) 3090–3097. [4] S. Faderl, P.F. Thall, H.M. Kantarjian, M. Talpaz, D. Harris, Q. Van, M. Beran, S.M.
- Kornblau, S. Pierce, Z. Estrov, Caspase 2 and caspase 3 as predictors of complete remission and survival in adults with acute lymphoblastic leukemia, Clin. Cancer Res. 5 (1999) 4041–4047.
- [5] T. Kobayashi, J. Masumoto, T. Tada, T. Nomiyama, K. Hongo, J. Nakayama, Prognostic significance of the immunohistochemical staining of cleaved caspase-3, an activated form of caspase-3, in gliomas, Clin. Cancer Res. 13 (2007) 3868-3874.
- [6] R. Koomagi, M. Volm, Relationship between the expression of caspase-3 and the clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer, Anticancer Res. 20 (2000) 493-496. [7] J.Y. Hsia, C.Y. Chen, J.T. Chen, C.P. Hsu, S.E. Shai, S.S. Yang, C.Y. Chuang P.Y.
- Wang, J. Miaw, Prognostic significance of caspase-3 expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma, Eur. J. Surg. Oncol. 29 (2003) 44-48.
- [8] R.N. Winter, A. Kramer, A. Borkowski, N. Kyprianou, Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer, Cancer Res. 61 (2001) 1227-1232.
- J.A. Kieman, Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde, and glutaraldehyde: what they are and what they do, Microsc. Today 1 (2000) 8-12.
 C.A. Mizzen, N.J. Cartel, W.H. Yu, P.E. Fraser, D.R. McLachlan, Sensitive detection of metallothioneins-1, -2, and -3 in tissue homogenates by immunoblotting: a method for enhanced membrane transfer and retention, J. Biochem. Biophys. Methods 32 (1996) 77-83.
 J.H. Jeon, S.Y. Cho, C.W. Kim, D.M. Shin, J.C. Kwon, K.H. Choi, I.G. Kim, Improved
- nunodetection of human papillomavirus E7, Exp. Mol. Med. 34 (2002) 496-

10.4 Trabalho científico submetido para publicação, relacionado à tese de doutorado

10.4.1 NESTAL DE MORAES, G., VASCONCELOS, F.C., DELBUE, D., MOGNOL

G.P., STERNBERG C., VIOLA J.P.B., MAIA, R.C. Doxorubicin induces cell death in

breast cancer cells regardless of Survivin and XIAP expression levels.

Doxorubicin induces cell death in breast cancer cells regardless of Survivin and XIAP

expression levels

Gabriela Nestal de Moraes¹², Flavia C. Vasconcelos¹, Deborah Delbue¹, Giuliana P.

Mognol³, Cinthya Sternberg⁴, João P.B. Viola³, Raquel C. Maia¹

¹Cellular and Molecular Hemato-Oncology Laboratory, Program of Molecular Hemato-Oncology, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Praça da Cruz Vermelha, 23/6°

andar, Rio de Janeiro, Brazil.

²Oncology Post-Graduation Program, Brazilian National Cancer Institute, Rua André

Cavalcanti, 37/1° andar, Rio de Janeiro, Brazil.

³Program of Cellular Biology, Brazilian National Cancer Institute, Rua André Cavalcanti,

37/5° andar, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴Coordination of Clinical Research, Brazilian National Cancer Institute, Rua André

Cavalcanti, 37/3° andar, Rio de Janeiro, Brazil.

*Correspondence to: Raquel C. Maia, Cellular and Molecular Hemato-Oncology

Laboratory, Program of Molecular Hemato-Oncology, Brazilian National Cancer Institute,

Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail: rcmaia@inca.gov.br

Telephone number: + 55 21 3207 1198.

Fax number: + 55 21 3207 1808.

ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of deaths in women around the world. Resistance to therapy is the main cause of treatment failure and still little is known about predictive biomarkers for response to systemic therapy. Increasing evidence show that Survivin and XIAP overexpression is closely associated with chemoresistance and poor prognosis in breast cancer. However, their impact on resistance to doxorubicin (dox), a chemotherapeutic agent widely used to treat breast cancer, is poorly understood. Here, we demonstrated that dox inhibited cell viability and induced DNA fragmentation and activation of caspases-3, -7 and -9 in the breast cancer-derived cell lines MCF7 and MDA-MB-231, regardless of different p53 status. Dox exposure resulted in reduction of Survivin and XIAP mRNA and protein levels. However, when we transfected cells with a Survivin-encoding plasmid, we did not observe a cell death-resistant phenotype. XIAP and Survivin silencing, either alone or in combination, had no effect on breast cancer cells sensitivity towards dox. Altogether, we demonstrated that breast cancer cells are sensitive to the chemotherapeutic agent dox irrespective of Survivin and XIAP expression levels. Also, our findings suggest that dox might act as a sensitizer agent to taxanes when used in a sequential regimen.

Keywords: XIAP; Survivin; doxorubicin; chemoresistance; breast cancer.

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; DOX, doxorubicin; EDTA, Ethylenediamine tetraacetic acid; EGFR, epithelial growth factor receptor; ER, estrogen receptor; Her2, human epidermal growth factor receptor-2; HIF, hypoxia-inducible factor; IAP, inhibitor of apoptosis proteins; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazlol-2-yl; PBS, phosphate buffered saline; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; RNAse, ribonuclease A; SDS, dodecyl sodium sulfate; Tris, trishidroximethylaminomethane.

Introduction

Breast cancer is the leading cause of deaths in women around the world, despite recent advances regarding novel therapeutic options. Resistance to chemotherapy remains the major hurdle for the success of antineoplastic treatment. Several mechanisms have been implicated in chemoresistance in breast cancer such as TP53 mutations [1], changes in the DNA repair machinery [2], overexpression of ATP-binding cassette drug transporters [3], modifications of drug targets such as topoisomerase II [4] and disruption in apoptotic signaling pathways such as the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) overexpression [5]. Survivin is the smallest member of the IAP family [6], whose function also extends to cell division regulation and control of mitotic spindle assembly [7]. Survivin is poorly expressed in normal breast despite its overexpression in neoplastic breast tissues [8], where it was found to be an independent prognostic factor of poor outcome [9,10]. Survivin has been shown to inhibit apoptosis through an IAP-IAP complex, which stabilizes XIAP expression, preventing its proteasome degradation and enabling its caspase-inhibitory activity [11]. XIAP is another IAP protein, known for its ability to bind and effectively inhibit caspases-3, -7 and -9 [12]. Although XIAP expression is highly prevalent in breast carcinomas, its role in prognosis still remains controversial. While some studies have demonstrated that XIAP expression was closely related to a more aggressive clinical behavior [13] and shortened survival [14], Hinnis and colleagues [9] observed no correlation between its expression and clinical-biological parameters. In preclinical and clinical models, different approaches directed to inhibit IAPs sensitize breast cancer cells to apoptosis and reduce tumor growth [15-18], even in chemoresistant tumors [19,20], supporting their potential use as therapeutic targets. Consistent with this, other groups have demonstrated that Survivin can prevent apoptosis mediated by a variety of stimuli such as tamoxifen [21], paclitaxel [22], transtuzumab [23] and radiotherapy [24]. Nevertheless, little is known about Survivin and XIAP role in resistance to doxorubicin (dox), an anthracyclic chemotherapeutic agent widely used to treat breast cancer [25].

In this study, we investigated the potential role of Survivin and XIAP as dox resistance factors in breast-derived cancer cell lines. Our data show that Survivin-induced overexpression does not prevent dox-mediated cell death in both invasive and non-invasive breast cancer cells. Similarly, knockdown of Survivin by siRNA, alone or in combination with XIAP silencing, cannot sensitize cells to cytotoxic stimuli. Taken together, these

findings suggest that Survivin and XIAP expression have no influence on dox resistance in breast cancer cells.

Materials and methods

Materials

Dox (Rubidox®) was provided by Bergamo (São Paulo, Brazil). The drug was diluted in NaCl 0.9% and serial dilutions in culture media were performed prior to use. Tris (trishidroximethylaminomethane) was purchased from Merck and MTT (3-(4,5-dimethylthiazlol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), from USB. PBS (phosphate buffered saline), RNAse (ribonuclease A), DMSO (dimethyl sulfoxide) and β-actin antibody (1:5000 dilution) were obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Antibodies for Survivin, XIAP, procaspase-7 and procaspase-9 were from R&D Systems (1:1000 dilution; Minneapolis, MN, USA). Procaspase-3 and p53 antibodies were from BD Biosciencies (1:1000 dilution; San Jose, CA, USA) and Dako (1:500 dilution; Glostrup, DK), respectively. Mouse and rabbit secondary antibodies were purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

Cell lines

The human breast cancer cell lines MCF7, a non-invasive, estrogen receptor (ER) positive, and MDA-MB-231 (invasive, basal-like ER-negative) were cultured in RPMI 1640 and Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco; BRL, UK), respectively, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco) and maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. Cells in exponential growth were exposed to clinically relevant dox doses (1 and 2 μ M) and to a concentration used mainly for mechanistic purposes (5 μ M) [26]. The cell lines were genotyped for confirmation of authenticity by the Sonda Laboratory at Federal University of Rio de Janeiro and monitored for mycoplasm contamination.

Measurement of cell metabolic viability

Cell viability was evaluated by the MTT assay. Breast cancer-derived cells (10⁵ ml⁻¹) were left to adhere onto 96-well plates for 24 h and treated with dox for 24, 48 and 72 h. After incubation with MTT (5mg/ml in PBS) for 4 h at 37°C, the supernatant was removed and 150 µl of DMSO were added to dissolve the formazan salt. Absorbance at 492 nm was measured with an ELISA reader (DTX 800 Multimode Detector from Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and the percentage of cell viability was assessed as: (absorbance of dox treated cells/absorbance of untreated cells) x 100. The concentrations and experiments were conducted in triplicate.

Assessment of DNA fragmentation

After dox treatment, cells were harvested by trypsinization (trypsin 0.125%), washed twice in PBS and incubated with 300 µl of propidium iodide (PI) staining solution (PI 50 µg/ml diluted in citrate buffer 4 mM and Triton X-100 0.3%) and 300 µl RNAse (100 µg/ml diluted in citrate buffer 40 mM) for 15 min at room temperature. DNA content was determined on a flow cytometer (Cyan ADP; Dako) and a total of 10.000 events were acquired per sample. Analysis was performed using the Summit v4.3 software and DNA fragmentation was quantified by the percentage of cells in sub-G0/G1 phase.

Detection of apoptosis

For detection of caspase-mediated apoptosis, Western blotting was performed as previously described [27]. Caspases activation was analyzed by reduction of procaspase levels or detection of cleaved caspase bands.

Western blot analysis

For Survivin, XIAP and p53 detection, pellets of 2 x 10⁶ trypsinized cells were washed three times in PBS and lysed in resuspension buffer (40 mM Tris-HCl; 40mM EDTA; pH 7.5) and 10% SDS (dodecyl sodium sulfate) for 15 min at 100°C. Total protein was determined using Bio-Rad protein assay solution and 80 µg of lysates were subjected to SDS-PAGE onto 15% polyacrylamide gels. After electrophoresis and transfer to Hybond-P membranes, blots were stained with Ponceau red to assure equal protein loading and blocked

for 2 h at room temperature with 5% nonfat dry milk TBS containing 0.2% Tween-20. Subsequently, membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C, prior to incubation with secondary horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit, anti-mouse (1:1000 dilution; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) or anti-goat antibodies (1:2000 dilution; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). Antibody complexes were visualized by the ECL detection system (GE Healthcare) and band intensities were quantified using the VisionWorks software. Protein expression was normalized with respect to β-actin.

Detection of p53 expression by flow cytometer

After exposure to dox for 24 h, MCF7 cells were incubated for 10 min at room temperature with 2 ml of a mixture of paraformaldehyde (final concentration: 2%; diluted in PBS) and Becton Dickinson's FACS lysing solution (1:10 dilution in distilled water) for fixation and permeabilization. Afterwards, cells were centrifuged and supernatant was discarded and then washed with 2 ml of PBS/0.5% Tween 20. The fixed cells were incubated with 10 μl of anti-p53 directly labeled with FITC (Dako; 1:500) in a single step for 30 min, followed by two washes with PBS/0.5% Tween 20 and resuspended in 500μl of 1% formaldehyde/PBS, prior to flow cytometer analysis. For each test, isotype-matched monoclonal antibody was used as a negative control (IgG 1-FITC; Dako; 1:500). The p53 antibody reacts with both wild-type and mutant p53 proteins.

Real time PCR quantification (TaqMan) of Survivin and XIAP mRNA

For Survivin and XIAP mRNA analysis, total RNA was isolated from dox-treated and untreated cells using the Trizol reagent (Trizol®, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and quantified (Nanodrop® ND-1000). Subsequently, cDNA was synthesized through the Superscript method (Superscript® II Reverse Transcriptase; Invitrogen). Survivin (Hs000153353_m1) and XIAP (Hs01597783_m1) mRNA was amplified by using TaqMan probes obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Real-time monitoring of PCR amplification of cDNAs was carried out using TaqMan Universal master mix (Applied Biosystems). Relative quantification of target gene expression was performed by employing a comparative Ct method ($\Delta\Delta$ Ct), using β -actin (Hs99999903_m1) as a reference gene. All

experiments were carried out in the StepOneTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Transfection of Survivin gene into breast cancer cells

The plasmid-encoding human survivin pcDNA3-myc-survivin and the empty vector pcDNA3-myc were kindly provided by Dr. John C. Reed (The Burnham Institute, La Jolla, CA) [28]. Transfections were performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. After 24 h of transfection, cells were trypsinized and left to adhere, prior to dox exposure for 72 h.

Transfection of siRNA targeting Survivin and XIAP into MCF7 cells

Small interfering RNAs (siRNAs) targeting Survivin (4392420; ID:s1455) and XIAP (4392420; ID:s1459) and the non-silencing control – scramble – (4390843) were purchased from Life Technologies (Foster City, CA, USA). Transfections were performed using the Lipofectamine RNAimax reagent, according to the protocol provided by the manufacturer (Invitrogen). After 24 h of simultaneous or individual transfection with the siRNA sequences, cells were exposed to dox for 24 h and viability was assessed.

Statistical analysis

Statistical validation of data was performed using the Graph Pad Prism 4.0 software. The Student's t-test was used to compare differences between dox-treated and untreated cells. A value of p < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Dox induces apoptosis in breast cancer cells

First, we evaluated the effects of dox on invasive MCF7 and non-invasive MDA-MB-231 cells. We could observe that cell viability was inhibited in a time-dependent manner when

cells were exposed to increasing concentrations of dox (Fig. 1A). To investigate cell death mechanisms, we assessed DNA fragmentation and procaspases levels after cells exposure to dox. Our results showed that dox induced DNA fragmentation in both cell lines, as observed by the hypodiploidy cells in sub-G0/G1 phase (Fig. 1B). The increase in dox concentrations had an impact on MDA-MB-231 toxicity, but not on MCF7 cells, where DNA fragmentation occurred mostly time-dependent and was more expressive after a 72-h incubation. In addition, we demonstrated that procaspases-9, -7 and -3 levels decreased after a 72-h dox treatment (Fig. 1C). Altogether, these data suggest that dox triggers apoptosis in breast cancer cells.

Dox-induced apoptosis occurs in cells lines with different p53 status

As an anthracycline, dox acts by intercalating DNA and inhibiting topoisomerase II activity [26,29], which leads to DNA damage and p53 activation [30]. To investigate if dox-induced apoptosis involves p53 induction in our model, we examined p53 levels in mutant p53 MDA-MB-231 cells, which display high levels of undegraded nonfunctional p53 protein, and in wild-type p53 MCF7 (Fig. 2A). As shown in Fig. 2B, approximately 27% and 44% of MCF7 cells had an increase in p53 levels after incubation with 1 μ M and 5 μ M dox, respectively. To further confirm this result, we performed Western blot experiments and observed that dox was able to induce p53 expression in all concentrations tested in MCF7 cells, but not in MDA-MB-231 whose expression levels remained unaltered (Fig. 2C). These results indicate that dox is able of inducing apoptosis in breast cancer cells displaying different p53 status.

Survivin and XIAP expression is down-regulated at both mRNA and protein levels after dox treatment

It is well known that IAPs such as Survivin can be regulated at both transcriptional and post-transcriptional levels [31]. Next, we investigated if dox could modulate the expression of antiapoptotic proteins Survivin and XIAP. Survivin and XIAP mRNA levels were down-regulated on dox-treated when compared to untreated cells (Fig. 3A and B). These results were mirrored in protein expression analysis, where we observed the decrease in XIAP expression as early as 24 h of dox treatment whereas Survivin had its expression diminished

when cells were exposed to 2 and 5 μ M dox (Fig. 3C and D) Interestingly, Survivin expression was increased after MDA-MB-231 cells were exposed to 1 μ M dox, whose cytotoxic effects are less pronounced (Fig. 3C and Fig. 1). These results indicate that Survivin and XIAP are down-regulated at the transcriptional level by dox and that their modulation profile correlates to dox-induced apoptosis.

Survivin overexpression does not confer resistance to dox-mediated cell death

As dox treatment decreased Survivin expression, we sought to investigate if its decreased expression was facilitating cell death induction by dox. Transiently transfected cells with either a Survivin-encoding plasmid and an empty vector were compared in terms of dox cytotoxic effects. Upon an efficient transfection (87% and 95% efficiency for MDA-MB-231 and MCF7, respectively - data not shown), we did not observe changes in the cell cycle profile of both cell lines (Fig. 4A). Although Survivin overexpression attenuated processing of caspase 9 (Fig. 4B), it did not block cell death induced by dox, as evaluated by DNA fragmentation (Fig. 4C) and changes in cell viability (Fig. 4D). Moreover, Survivin overexpression did not stabilize XIAP expression, whose levels were still reduced upon dox treatment (Fig. 4B). Altogether, these findings show that the observed decrease in Survivin expression does not act as an enabling event to dox-induced cell death in breast cancer cells.

Survivin silencing, alone or in combination with XIAP silencing, does not sensitize breast cancer cells to dox apoptotic stimuli

Next, we tested the hypothesis that a further decrease in Survivin expression would enhance cell death induced by dox in breast cancer cell lines. As a model, we chose MCF7 cells that were shown to be more sensitive to dox effects. By using Survivin and XIAP siRNAs, we found that silencing either isolated or simultaneous Survivin or XIAP expression clearly stimulated processing of procaspases-7 and -9 (Fig. 5A). However, it did not have an impact on dox-induced cell death (Fig. 5B). Nonetheless, when XIAP was silenced, the decrease in Survivin expression is enhanced in the presence of dox (compare data on Survivin expression in Fig. 3C and 5A), suggesting that lack of XIAP expression may render Survivin more unstable. Altogether, our findings suggest that dox-induced cell

death is not enhanced by a further decrease in Survivin and/or XIAP expression levels in breast cancer cells. However, Survivin expression levels appear to be stabilized by XIAP, corroborating data in the literature regarding their functional interaction [11].

Long-term Survivin inhibition results in cytotoxicity

Survivin function is not only limited to apoptosis inhibition but also to control of mitotic spindle assembly and cell cycle progression [7]. Although Survivin silencing did not alter sensitivity to dox, we observed that, after 72 h of inhibition of Survivin expression, there was an increase in DNA fragmentation when compared to cells transfected with the scramble siRNA (Fig. 6). We also observed this effect in cells transfected with both Survivin and XIAP siRNAs, but not in XIAP-silenced cells, in which the cytotoxicity was less pronounced. This result shows that long-term Survivin inhibition leads to cytotoxicity and confirms Survivin cytoprotective role.

Discussion

Despite many advances in the treatment of breast cancer, with the development of novel therapeutic modalities and identification of prognostic and predictive factors, resistance to chemotherapy remains the major obstacle for successful treatment. To assign numbers, resistance usually accounts for 90% of patients receiving chemotherapy in metastatic disease [32]. Therefore, the search for biomarkers known to confer resistance to chemotherapy has the potential to avoid overtreatment and unnecessary exposure to toxic and ineffective therapy. Although the microarray gene expression profiling technology has arisen as a strategy to classify patients according to their molecular signature and possibly identify those who could benefit from specific therapies, still there are limitations that derail its incorporation into clinical practice and treatment decisions [33]. Thus, the better understanding of mechanisms responsible for causing tumor resistance can provide tools to developing new strategies for overcoming chemoresistance.

Dox is considered to be one of the most effective agents in the treatment of breast cancer and, despite first used decades ago [34], it is still included in the standard chemotherapy protocol for this disease. In vitro, dox has been shown to counteract viability of breast cancer cells by triggering apoptosis [35]. Accordingly, in the present study, we

analyzed apoptotic features and demonstrated that dox can induce DNA fragmentation and cleavage of procaspases-3, -7 and -9 in both invasive MDA-MB-231 and non-invasive MCF7 cells. In addition, we also observed reduced viability upon dox treatment, as measured by the MTT metabolic assay. The time-dependent dox cytotoxic effects were not dependent upon of p53 status, as it occurred in wild-type MCF7 and mutant MDA-MB-231 p53 bearing cells. Also, our data shows that dox induced p53 expression in wild-type MCF7 cells, confirming previous data reporting dox-induced p53 phosphorylation [36] and differential p53 modulation between dox and paclitaxel, a taxane also used in breast cancer treatment [37]. On the other hand, the high levels of inactive mutant p53 remained unaltered in MDA-MB-231 cells, whose signaling pathways associated to chemosensitivity have been shown to be mediated by p73 up-regulation [38]. Consistent with this, Vayssade and colleagues [39] demonstrated that the p73 transcription factor may assume some of the p53 functions in dox-treated p53-deficient cells. Our finding that p53 status does not influence the response of these cells to dox might provide clinically relevant information, as approximately 30% of all breast tumors display *TP53* mutations [40].

Our next step was to investigate whether Survivin would confer dox resistance and protect breast cancer cells from apoptosis. First, we observed that dox could reduce Survivin and XIAP levels, concomitantly with apoptosis induction, pointing to a possible correlation between IAPs and dox resistance. Dox-induced Survivin downregulation is an effect which has been previously observed in lung cells [41], but was never reported in breast cancer cells. In the aforementioned study, overexpression of Survivin rescued A549 cells from doxinduced cell death, reducing the levels of apoptosis in a dose-dependent manner. When we transfected cells with a Survivin-encoding plasmid, we found that caspase-9 cleavage was attenuated, suggesting that, at least in part, Survivin overexpression can counteract doxmediated apoptosis. However, we observed no changes in dox sensitivity between Survivinoverexpressing cells and cells transfected with the vector control regarding changes in cell viability and DNA fragmentation. This finding is in contrast with the current knowledge regarding Survivin role as a powerful resistant factor in breast cancer. By conducting similar experiments, Moriai and colleagues [21] found a decrease in the number of apoptotic cells induced by tamoxifen after overexpression of Survivin. A recent study demonstrated that Survivin acts downstream the human epidermal growth factor receptor-2 (Her2) and 3 (Her3)/ PI3K/Akt pathway and is required for mediating paclitaxel resistance in Her2overexpressing breast cancer cells [22]. Another group has shown that Survivinoverexpressing cells had little changes in viability upon transtuzumab treatment, indicating that Survivin rescues transtuzumab-induced cell growth inhibition [23]. Finally, Survivin knockdown by siRNA has been shown to enhance sensitivity to irradiation effects [24]. Altogether, these results show that Survivin role in resistance is most likely therapy-specific. However, it is noteworthy that our results might offer an explanation for the relative efficiency of therapeutic regimens combining dox and taxanes for breast cancer patients (e.g. AC-P: sequence of dox and cyclophosphamide – 4x – and paclitaxel – 4x) [42]. As the anthracycline is given first in the treatment sequence, it is possible that the degradation of Survivin induced by dox might act as a sensitizing mechanism to the posterior action of paclitaxel, which resistance by tumors is clearly mediated by Survivin [24]. Supporting this hypothesis, a recent study evaluated pathological complete response to GAT (dox on day 1, paclitaxel and gemcitabine on day 2, every 14 days for six cycles) and its correlation with tumors biomarkers and found that tumors exhibited decreased numbers of Survivin-positive cells after treatment, suggesting that Survivin degradation might be involved in the response to GAT [43].

We have also questioned if a further decrease in Survivin and XIAP expression would enhance cell death induced by dox in breast cancer cells, as it was previously described that Survivin and XIAP may act in complex to counteract apoptosis [11]. For this purpose, we inhibited their expression and found that Survivin- and XIAP-silenced cells have the processing of procaspases-7 and -9 stimulated, but did not display a more sensitive phenotype towards dox, as DNA fragmentation remained unchanged in this experimental paradigm, indicating that depleting IAPs expression cannot render breast cancer cells less resistant. A recent study showed that XIAP overexpression alone could not confer resistance to Hela cells against several drugs, such as etoposide, staurosporine, vincristine and also dox[44]. A resistant-phenotype was only observed when XIAP overexpression was combined with ablation of its negative regulator and proapoptotic protein Smac. Like Survivin, XIAP silencing alone has been shown to reduce resistance to transtuzumabe in breast cancer cells [5]. However, the data presented here support the idea that Survivin and XIAP expression does not modify the response to dox-based therapy in breast cancer cells. Together with the Survivin overexpression data, these results strongly support the idea that manipulation of Survivin and XIAP levels can affect the threshold for dox-induction of apoptosis but cannot influence significantly DNA fragmentation, the final event of cell death. It suggests that, by partly preventing apoptosis, IAPs overexpression can favor the

induction of other types of cell death by dox. Reinforcing our hypothesis, dox has been shown to counteract viability of breast cancer cells in vitro by triggering different types of cell death: apoptosis, senescence and autophagy [35].

In addition to these findings, we could observe that Survivin silencing had an impact on spontaneous cell viability after 72 h of transfection rather than on protection from doxinduced cytotoxic effects. This result is in accordance with several studies which demonstrated that Survivin plays a crucial role in cell cycle regulation and cytoprotection. Therefore, Survivin depletion results in aberrant progression into mitosis and pleiotropic division defects [7]. We also observed that XIAP silencing leads to a destabilization of Survivin expression, suggesting an interplay between these two molecules that regulates Survivin stability. These findings are relevant in the context of breast cancer because Survivin and XIAP expression is often observed in breast cancer samples [10,14]. In the future, it might be interesting to establish the ratio of XIAP and Survivin and test its prognostic power in a cohort of breast cancer patients, instead of interrogating both proteins in an independent manner.

According to our data, Survivin and XIAP are down-regulated upon apoptosis induction by dox, but do not influence dox resistance in breast cancer cells. These conclusions prompted us to speculate about the mechanisms underlying their negative regulation. Indeed, Survivin and XIAP are downstream factors for multiple oncogenic signaling pathways (for review: [45,46]) and most likely, their regulation occurs at the level of transcription as a consequence of deregulation of upstream regulators and transcription factors. In this study, we also showed that both Survivin and XIAP are down-regulated at mRNA levels, which supports our hypothesis that they might be transcriptionally repressed following dox exposure. Thus, it would be interesting to explore what transcription factors, whether activated or inhibited, can account for IAPs negative regulation in response to cytotoxic chemotherapy-induced stress. Interestingly, dox was shown to impair the transcriptional response of the hypoxia-inducible factor (HIF) by inhibiting the binding of the HIF-heterodimer to the consensus enhancer element (RCGTG), and this effect was accompanied by a co-ordinated down-regulation of HIF targets [47]. Survivin was already shown to be regulated by HIF1 alpha on some models [48,49], rendering HIF-1 alpha impaired function a putative culprit for the decreased expression of Survivin upon dox treatment.

Another point to highlight is that, despite having based our experiments in totally different breast-derived cell lines, the results we obtained were mostly similar. Unlike MCF7 which is a non-invasive, luminal-like cell type, MDA-MB-231 has a highly invasive, basal-like phenotype and is usually considered a resistant cell line model. Moreover, there are data in the literature reporting distinct molecular lesions harbored by these cell lines. MCF7 is wild-type for KRAS, EGFR (epithelial growth factor receptor) and BRAF, but it displays a missense PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) mutation in exon 9 (E545K), rendering this kinase constitutively active. Of note, MCF7 cells do not express caspase-3. As for MCF7, MDA-MB-231 is wild-type for EGFR, but it harbors activating mutations in KRAS (G13D) and BRAF (G464V) and is wild-type for PI3K [50,51]. In spite of the differences in these clinically relevant molecular lesions and different expression pattern of key molecules such as ER and Her2, we observed that both cell lines were similarly sensitive to dox-mediated apoptosis. As breast cancer is a heterogeneous disease [52], results obtained from in vitro experiments based on a single cell line do not resemble breast cancer biology.

In summary, we demonstrated that breast cancer cells are sensitive to the chemotherapeutic agent dox irrespective of Survivin and XIAP expression levels and that molecular manipulation of their levels does not modify the response to dox. Nonetheless, our findings suggest that dox might act as a sensitizer agent to taxanes when used in a sequential regimen and that the ratio of Survivin and XIAP should be explored in the future as a prognostic/predictive factor to taxane use. Currently, we are conducting a study in a cohort of breast cancer patients in order to explore these findings in vivo. Our experimental data can contribute to a better understanding of molecular mechanisms underlying chemoresistance in breast cancer.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by funds from Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- 1. Knappskog S, Lonning PE (2012) P53 and its molecular basis to chemoresistance in breast cancer. Expert Opin Ther Targets 16 Suppl 1: S23-30.
- 2. Dhillon KK, Swisher EM, Taniguchi T (2011) Secondary mutations of BRCA1/2 and drug resistance. Cancer Sci 102: 663-669.
- 3. Wind NS, Holen I (2011) Multidrug resistance in breast cancer: from in vitro models to clinical studies. Int J Breast Cancer 2011: 967419.
- 4. Konecny GE, Pauletti G, Untch M, Wang HJ, Mobus V, et al. (2010) Association between HER2, TOP2A, and response to anthracycline-based preoperative chemotherapy in high-risk primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 120: 481-489.
- 5. Foster FM, Owens TW, Tanianis-Hughes J, Clarke RB, Brennan K, et al. (2009) Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer. Breast Cancer Res 11: R41.
- 6. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med 3: 917-921.
- 7. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, et al. (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. Nature 396: 580-584.
- 8. Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C (2008) Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. Appl Immunohistochem Mol Morphol 16: 113-120.
- 9. Hinnis AR, Luckett JC, Walker RA (2007) Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients. Br J Cancer 96: 639-645.
- 10. Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, Wang HJ, Untch M, et al. (2006) Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. Ann Oncol 17: 597-604.
- 11. Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, et al. (2004) An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. J Biol Chem 279: 34087-34090.
- 12. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL (2006) Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. EMBO Rep 7: 988-994.
- 13. Jaffer S, Orta L, Sunkara S, Sabo E, Burstein DE (2007) Immunohistochemical detection of antiapoptotic protein X-linked inhibitor of apoptosis in mammary carcinoma. Hum Pathol 38: 864-870.
- 14. Zhang Y, Zhu J, Tang Y, Li F, Zhou H, et al. (2011) X-linked inhibitor of apoptosis positive nuclear labeling: a new independent prognostic biomarker of breast invasive ductal carcinoma. Diagn Pathol 6: 49.
- 15. Aird KM, Ding X, Baras A, Wei J, Morse MA, et al. (2008) Trastuzumab signaling in ErbB2-overexpressing inflammatory breast cancer correlates with X-linked inhibitor of apoptosis protein expression. Mol Cancer Ther 7: 38-47.
- 16. Flygare JA, Beresini M, Budha N, Chan H, Chan IT, et al. (2012) Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer (GDC-0152). J Med Chem 55: 4101-4113.
- 17. Gonzalez-Lopez M, Welsh K, Finlay D, Ardecky RJ, Ganji SR, et al. (2011) Design, synthesis and evaluation of monovalent Smac mimetics that bind to the BIR2 domain of the anti-apoptotic protein XIAP. Bioorg Med Chem Lett 21: 4332-4336.
- 18. Li QX, Zhao J, Liu JY, Jia LT, Huang HY, et al. (2006) Survivin stable knockdown by siRNA inhibits tumor cell growth and angiogenesis in breast and cervical cancers. Cancer Biol Ther 5: 860-866.

- 19. Dean E, Jodrell D, Connolly K, Danson S, Jolivet J, et al. (2009) Phase I trial of AEG35156 administered as a 7-day and 3-day continuous intravenous infusion in patients with advanced refractory cancer. J Clin Oncol 27: 1660-1666.
- 20. Yamanaka K, Nakata M, Kaneko N, Fushiki H, Kita A, et al. (2011) YM155, a selective survivin suppressant, inhibits tumor spread and prolongs survival in a spontaneous metastatic model of human triple negative breast cancer. Int J Oncol 39: 569-575.
- 21. Moriai R, Tsuji N, Moriai M, Kobayashi D, Watanabe N (2009) Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 117: 261-271.
- 22. Wang S, Huang X, Lee CK, Liu B (2010) Elevated expression of erbB3 confers paclitaxel resistance in erbB2-overexpressing breast cancer cells via upregulation of Survivin. Oncogene 29: 4225-4236.
- 23. Zhu H, Zhang G, Wang Y, Xu N, He S, et al. (2010) Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces survivin expression via the ErbB2-beta-catenin/TCF4-survivin pathway in ErbB2-overexpressed breast cancer cells. Cancer Sci 101: 1156-1162.
- 24. Papanikolaou V, Iliopoulos D, Dimou I, Dubos S, Kappas C, et al. (2011) Survivin regulation by HER2 through NF-kappaB and c-myc in irradiated breast cancer cells. J Cell Mol Med 15: 1542-1550.
- 25. Burnell M, Levine MN, Chapman JA, Bramwell V, Gelmon K, et al. (2010) Cyclophosphamide, epirubicin, and Fluorouracil versus dose-dense epirubicin and cyclophosphamide followed by Paclitaxel versus Doxorubicin and cyclophosphamide followed by Paclitaxel in node-positive or high-risk node-negative breast cancer. J Clin Oncol 28: 77-82.
- 26. Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochem Pharmacol 57: 727-741.
- 27. Nestal de Moraes G, Carvalho E, Maia RC, Sternberg C (2011) Immunodetection of caspase-3 by Western blot using glutaraldehyde. Anal Biochem 415: 203-205.
- 28. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, et al. (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. Cancer Res 58: 5315-5320.
- 29. Lothstein L, Israel M, Sweatman TW (2001) Anthracycline drug targeting: cytoplasmic versus nuclear--a fork in the road. Drug Resist Updat 4: 169-177.
- 30. Gewirtz DA, Sundaram S, Magnet KJ (2000) Influence of topoisomerase II inhibitors and ionizing radiation on growth arrest and cell death pathways in the breast tumor cell. Cell Biochem Biophys 33: 19-31.
- 31. Zhang M, Yang J, Li F (2006) Transcriptional and post-transcriptional controls of survivin in cancer cells: novel approaches for cancer treatment. J Exp Clin Cancer Res 25: 391-402.
- 32. Coley HM (2008) Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. Cancer Treat Rev 34: 378-390.
- 33. Lavasani MA, Moinfar F (2012) Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on "basal-like" carcinoma: a critical review. J Biophotonics 5: 345-366.
- 34. Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, Poisson R, Redmond C, et al. (1990) Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from

- the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. J Clin Oncol 8: 1483-1496.
- 35. Di X, Shiu RP, Newsham IF, Gewirtz DA (2009) Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin. Biochem Pharmacol 77: 1139-1150.
- 36. Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Chang LL, et al. (2004) Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death. Oncogene 23: 3580-3588.
- 37. Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS, et al. (1998) Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. Mol Cell Biol 18: 3509-3517.
- 38. Wong SW, Tiong KH, Kong WY, Yue YC, Chua CH, et al. (2011) Rapamycin synergizes cisplatin sensitivity in basal-like breast cancer cells through up-regulation of p73. Breast Cancer Res Treat 128: 301-313.
- 39. Vayssade M, Haddada H, Faridoni-Laurens L, Tourpin S, Valent A, et al. (2005) P73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. Int J Cancer 116: 860-869.
- 40. Borresen-Dale AL (2003) TP53 and breast cancer. Hum Mutat 21: 292-300.
- 41. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, et al. (2002) Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. Oncogene 21: 2613-2622.
- 42. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirrincione CT, Goldstein LJ, et al. (2003) Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. J Clin Oncol 21: 976-983.
- 43. Sanchez-Rovira P, Anton A, Barnadas A, Velasco A, Lomas M, et al. (2012) Classical markers like ER and ki-67, but also survivin and pERK, could be involved in the pathological response to gemcitabine, adriamycin and paclitaxel (GAT) in locally advanced breast cancer patients: results from the GEICAM/2002-01 phase II study. Clin Transl Oncol 14: 430-436.
- 44. Seeger JM, Brinkmann K, Yazdanpanah B, Haubert D, Pongratz C, et al. (2010) Elevated XIAP expression alone does not confer chemoresistance. Br J Cancer 102: 1717-1723.
- 45. Galban S, Duckett CS (2010) XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. Cell Death Differ 17: 54-60.
- 46. Guha M, Altieri DC (2009) Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. Cell Cycle 8: 2708-2710.
- 47. Tanaka T, Yamaguchi J, Shoji K, Nangaku M (2012) Anthracycline inhibits recruitment of hypoxia-inducible transcription factors and suppresses tumor cell migration and cardiac angiogenic response in the host. J Biol Chem 287: 34866-34882.
- 48. Chen YQ, Zhao CL, Li W (2009) Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha on transcription of survivin in non-small cell lung cancer. J Exp Clin Cancer Res 28: 29.
- 49. Peng XH, Karna P, Cao Z, Jiang BH, Zhou M, et al. (2006) Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1alpha signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. J Biol Chem 281: 25903-25914.
- 50. Sanchez CG, Ma CX, Crowder RJ, Guintoli T, Phommaly C, et al. (2011) Preclinical modeling of combined phosphatidylinositol-3-kinase inhibition with endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer. Breast Cancer Res 13: R21.

- 51. Simi L, Pratesi N, Vignoli M, Sestini R, Cianchi F, et al. (2008) High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. Am J Clin Pathol 130: 247-253.
- 52. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, et al. (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. Nature 486: 346-352.

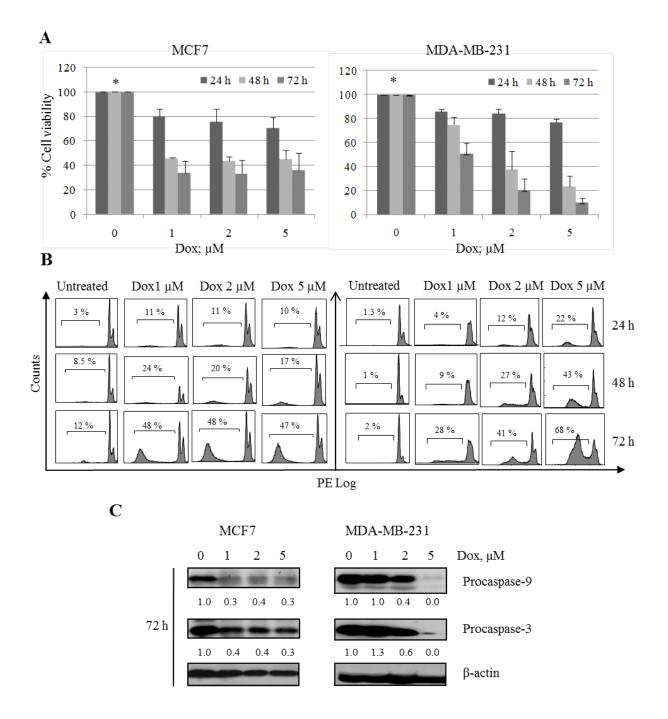


Fig. 1 - Doxorubicin (dox) induces apoptosis in breast cancer cells. MCF7 and MDA-MB-231 cell lines were left to adhere for 24 h and were exposed to dox for the indicated times. (A) MTT assay. Data are expressed as the mean \pm standard deviation from three independent experiments; *p< 0.05; Student's t-test. (B) Flow cytometry analysis of dox effect on DNA fragmentation, evaluated by the appearance of a sub-G0/G1 peak. (C) Cells were lysed for Western blotting. The values below the blots indicate the densitometric ratio between the protein and β -actin. The images are representative of three independent experiments.

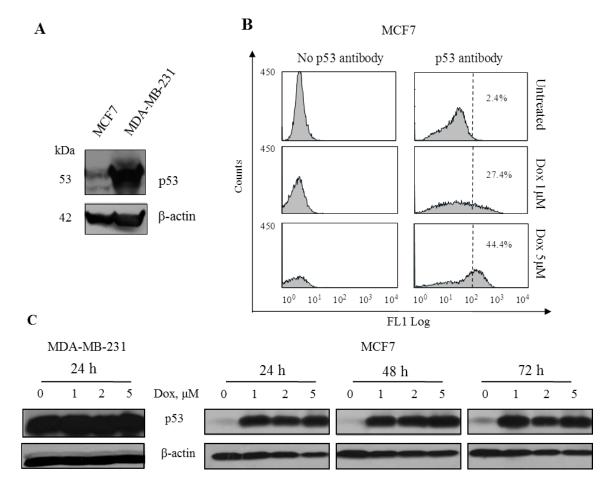


Fig. 2 - Dox-induced apoptosis occurs in cell lines with different p53 status. Wild-type MCF7 and mutant MDA-MB-231 cells (A) were left to adhere for 24 h and were exposed to increasing concentrations of dox. (B) Cells were permeabilized for the flow cytometry experiment after 24 h of dox treatment (C) Cells were lysed for Western blotting at the indicated time points. The figures are representative of three independent experiments.

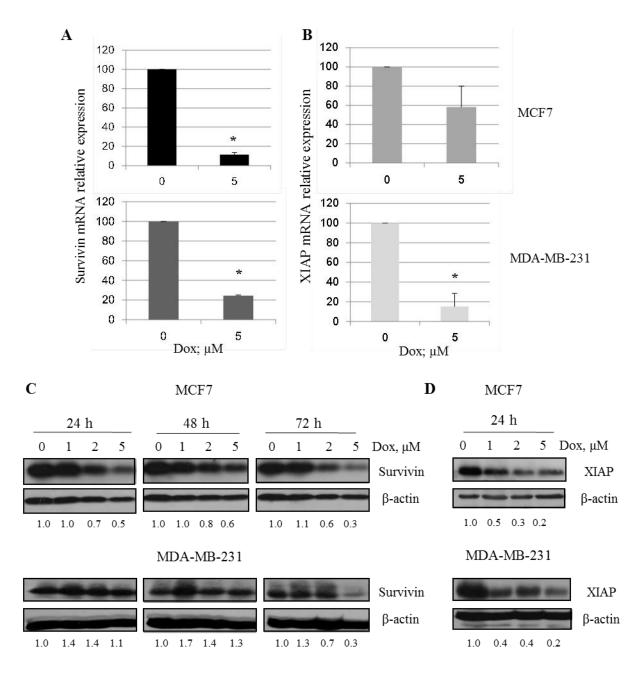


Fig. 3 - Survivin and XIAP expression is down-regulated at both mRNA and protein levels upon dox treatment. MCF7 and MDA-MB-231 cell lines were left to adhere for 24 h and were exposed to dox for the indicated times. (A,B) After a 24-h incubation with the drug, RNA was extracted from dox-treated and untreated cells and c-DNA was synthesized by the Superscript Method. β -actin was used as an internal control to normalize Survivin and XIAP mRNA levels. p<0.05; Student's t-test. (C,D) Cells were lysed for Western blot. The values below the blots indicate the densitometric ratio between the protein and β -actin. The figures are representative of three independent experiments.

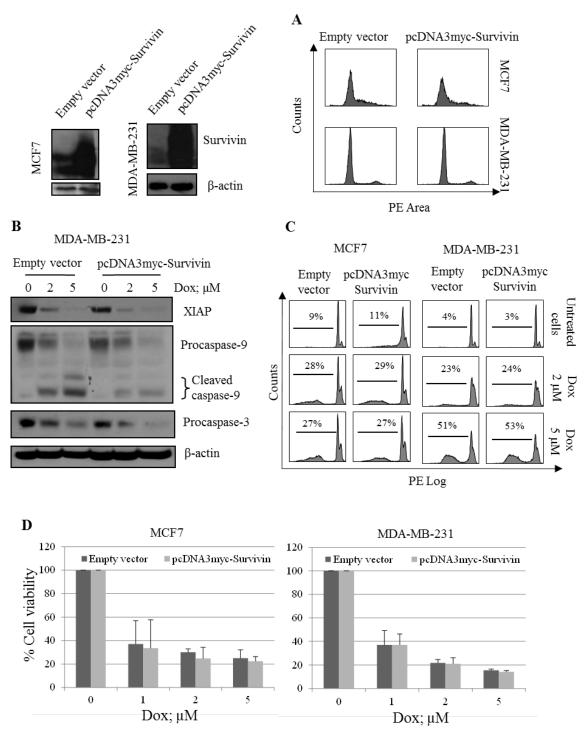


Fig. 4 - Survivin overexpression does not confer resistance to dox-mediated cell death. MCF7 and MDA-MB-231 cells were left to adhere for 24 h prior to transfection with the pcDNA3myc (empty vector) or pcDNA3myc-Survivin vector using the Lipofectamine 2000 reagent. Following transfection, cells had cell cycle profile (A) assessed by flow cytometry. Cells were also exposed to dox for 72 h and harvested for analysis of caspase levels (B), DNA fragmentation (C) and cell viability (D). Data are expressed as the mean \pm standard deviation from three independent experiments; ns: non-significant; Student's t-test. The figures are representative of three independent experiments.

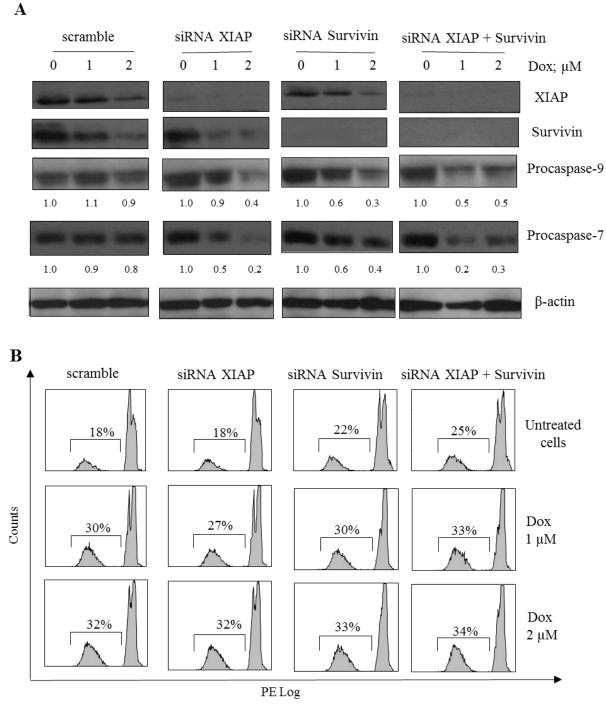


Fig. 5 - Survivin and XIAP silencing, alone or in combination, does not sensitize MCF7 cells to dox. MCF7 cells were transfected with the Survivin and/or XIAP-targeted siRNA or with the scramble-siRNA sequences using the Lipofectamine RNAimax reagent. On the following day, dox was added to the culture medium. After 24 h of dox exposure, cells were harvested for Western blotting (A) and flow cytometry DNA content analysis (B). The figures represent three independent experiments.

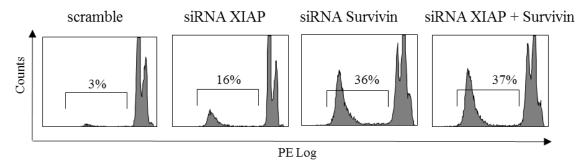


Fig. 6 - Long-term Survivin inhibition results in cytotoxicity. MCF7 cells were transfected with the Survivin and/or XIAP-targeted siRNA sequences using the LipofectamineRNAimax reagent. After 72 h of transfection, DNA content was evaluated using flow cytometry. The histograms are representative of three independent experiments.