

Andréa Turbuck Celestino

**Modulação do fenótipo de resistência a múltiplas drogas por lipoproteínas em células de sarcoma uterino resistente à doxorubicina**

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Emergências Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*Dedico aos meus pais **Maria**  
**Helena** e **Isaias** pelo apoio e  
compreensão incondicionais. Para  
vocês, minha eterna gratidão.*

## **Agradecimientos**

Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski pela oportunidade e confiança que me foram dadas para a realização deste trabalho.

Agradeço imensamente a Débora Levy por me ajudar desde o começo, sem você, jamais conseguiria ter realizado este trabalho.

À Luciana Ferreira Morganti Maselli, pela amizade e confiança.

À Cleide Appolonio (Cleidinha), pelo carinho e atenção em todos os momentos.

À Denise Sanches e Linah, pelos momentos de descontração e alegria, em períodos difíceis.

À Adriana de Aguiar Debes por me transmitir muito conhecimento.

Ao Jorge Ruiz e Felipe Janz pela imensa ajuda, amizade e apoio prestado sempre que precisei.

Às colegas de pós-graduação, Natália, Pamela, Carolina e Karoline pelas dificuldades que passamos juntas.

À Graciela, por sempre me ajudar nos experimentos com citometria de fluxo.

Aos meus grandes amigos Kelly, Gustavo, Denis e Marcelo por estarem comigo nos momentos difíceis e alegres.

A minha irmã Aline, por ser exemplo de persistência.

À CNPq pelo auxílio financeiro, sem o qual, não seria possível realizar este trabalho.

Aos demais colegas da Superintendência de Pesquisa da Fundação Pró-Sangue, pela colaboração, coleguismo e respeito.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente Angélica e Rose, pela atenção e dedicação dispensada em todos os momentos, durante o curso de pós-graduação.

Enfim, a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, a minha formação como pesquisadora e ser humano, os sinceros agradecimentos.

Este trabalho foi realizado com  
auxílio de bolsa CNPq processo  
número 142872/2005-9

## **Sumário**



Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Mecanismos de resistência a múltiplas drogas.....	3
1.2 ABCB1 MDR/P-glicoproteína.....	5
1.3 P-gp e sua afinidade por drogas.....	8
1.4 ABCC1/MRP1.....	12
1.5 Proteína relacionada à resistência de pulmão (LRP).....	15
1.6 Metabolismo lipídico.....	19
1.7 Funções da P-Glicoproteína na esterificação do colesterol.....	23
1.8 Mudanças na membrana lipídica associada com MDR.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
3. MÉTODOS.....	29
3.1 Preparo de LDL e HDL plasmáticas humanas.....	30
3.2 Cultura de células de sarcoma uterino resistente à quimioterápicos.....	31
3.3 Teste de citotoxicidade das lipoproteínas.....	31
3.4 Eletroforese de lipoproteínas.....	31
3.5 Extração de RNA total.....	32
3.6 Análises da expressão dos genes MDR, MRP e LRP.....	33

3.6.1 PCR em tempo real.....	33
3.6.2 Tratamento com sinvastatina.....	34
3.6.3 Tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina.....	35
3.7 Análise da expressão da proteína P-gp.....	36
3.8 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Eletroforese de lipoproteínas.....	38
4.2 Análises de citotoxicidade.....	40
4.2.1 Lipoproteína de baixa densidade (LDL).....	40
4.2.2 Lipoproteína de alta densidade (HDL).....	42
4.2.3 Análise da citotoxicidade da metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) .....	42
4.2.4 Análise da citotoxicidade da sinvastatina.....	43
4.3. Análise da eficiência do PCR em tempo real.....	45
4.3.1 MDR.....	45
4.3.2 LRP.....	46
4.3.3 MRP.....	48
4.3.4 $\beta_2$ -microglobulina.....	50
4.4 Expressão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes à doxorubicina cultivadas sob influência de LDL, HDL, metil- $\beta$ -ciclodextrina, sinvastatina e ausência de soro fetal bovino.....	51
4.4.1 LDL.....	51
4.4.2 HDL.....	53

4.4.3 Ausência de soro fetal bovino.....	54
4.4.4 Metil- $\beta$ -ciclodextrina.....	55
4.4.5 Sinvastatina.....	57
4.5 Expressão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes à doxorubicina cultivadas sob influência de LDL, HDL, metil- $\beta$ -ciclodextrina, sinvastatina e ausência de soro fetal bovino.....	59
4.5.1 LDL.....	59
4.5.2 HDL.....	60
4.5.3 Ausência de soro fetal bovino.....	61
4.5.4 Metil- $\beta$ -ciclodextrina.....	62
4.5.5 Sinvastatina.....	64
4.6 Expressão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes à doxorubicina cultivadas sob influência de LDL, HDL, metil- $\beta$ -ciclodextrina, sinvastatina e ausência de soro fetal bovino.....	65
4.6.1 LDL e HDL.....	65
4.6.2 Ausência de soro fetal bovino.....	68
4.6.3 Metil- $\beta$ -ciclodextrina.....	69
4.6.4 Sinvastatina.....	70
4.7 Análise da expressão da proteína P-gp.....	71
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.....	82
7. REFERÊNCIAS.....	84

## **Lista de Abreviaturas**

$\beta_2$ MG	$\beta_2$ -microglobulina
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
ACAT	Acil CoA: colesterol aciltransferase
Apo	Apolipoproteína
Aprox.	Aproximadamente
ATCC	American Type Culture Colection
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CT	Cyclo of Threshold
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramas
GSH	Conjugados de glutationa
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
KBr	Brometo de potássio
KDa	KiloDalton
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LRP	Proteína relacionada ao receptor de LDL

M	Molar
MDR	Resistência a múltiplas drogas
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MRP	Proteína associada ao MDR
MTT	Methyl Thiazolyl Blue
MVP	Major Vault Protein
M $\beta$ CD	Metil- $\beta$ -ciclodextrina
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P-gp	P-glicoproteína
PM	Padrão de peso molecular
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
QM	Quilomícron
RNA	Ácido ribinucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SFB	Soro fetal bovino
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

## **Lista de Figuras**

Figura 1. Estrutura da glicoproteína P.....	6
Figura 2. Estrutura da proteína MRP.....	13
Figura 3. Complexo “vault” em microscopia eletrônica (A); em desenho esquemático (B).....	16
Figura 4. Eletroforese de lipoproteínas em acetato de celulose. 1: Plasma; 2: HDL; 3: LDL.....	39
Figura 5. Curva de citotoxicidade de diferentes concentrações de LDL em células de sarcoma uterino resistente.....	41
Figura 6. Curva de citotoxicidade de diferentes concentrações de metil-β-ciclodextrina em células de sarcoma uterino resistentes.....	43
Figura 7. Curva de citotoxicidade de diferentes concentrações de sinvastatina em células de sarcoma uterino.....	44
Figura 8. Curva de dissociação do gene MDR. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência.....	45
Figura 9. Regressão linear semi-log do valor do C <sub>T</sub> em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene MDR.....	46
Figura 10. Curva de dissociação do gene LRP. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência.....	47
Figura 11. Regressão linear semi-log do valor do C <sub>T</sub> em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene LRP.....	48



Figura 12. Curva de dissociação do gene MRP. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência.....	49
Figura 13. Regressão linear semi-log do valor do $C_T$ em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene MRP.....	49
Figura 14. Curva de dissociação do gene $\beta$ 2-microglobulina. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência.....	50
Figura 15. Regressão linear semi-log do valor do $C_T$ em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene $\beta$ 2MG.....	51
Figura 16. Expressão relativa do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	52
Figura 17. Expressão relativa do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	53
Figura 18. Expressão relativa do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, cultivadas com meio sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR.....	55
Figura 19. Expressão relativa do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextrina.....	56
Figura 20. Expressão relativa do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistente, tratadas com diferentes concentrações	

de sinvastatina.....	57
Figura 21. Expressão relativa do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	59
Figura 22. Expressão relativa do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	60
Figura 23. Expressão relativa do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, cultivadas com meio sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR.....	62
Figura 24. Expressão relativa do gene LRP em células de sarcoma uterino resistente, tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextreina.....	63
Figura 25. Expressão relativa do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina.....	64
Figura 26. Expressão relativa do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	66
Figura 27. Expressão relativa do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	67
Figura 28. Expressão relativa do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, cultivadas com meio sem soro fetal	

bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR.....	68
Figura 29. Expressão relativa do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextrina.....	69
Figura 30. Expressão relativa do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina.....	70
Figura 31. Análise de citometria de fluxo das células de sarcoma uterino resistentes a doxorrubicina.....	72

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Propriedades físicas e composição das principais lipoproteínas.....	21
Tabela 2. Classificação e propriedades das principais lipoproteína.....	22
Tabela 3. Média da concentração de colesterol e triacilgliceróis em plasma, LDL e HDL.....	39
Tabela 4. Média da concentração de proteínas totais nas preparações de LDL e HDL.....	40
Tabela 5. Viabilidade celular de células de sarcoma uterino resistente com diferentes concentrações de LDL.....	41
Tabela 6. Viabilidade celular de células de sarcoma uterino resistentes com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextrina.....	43
Tabela 7. Viabilidade celular de células de sarcoma uterino resistentes com diferentes concentrações de sinvastatina.....	44
Tabela 8. Expressão relativa e desvio padrão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	52
Tabela 9. Expressão relativa e desvio padrão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	54
Tabela 10. Expressão relativa e desvio padrão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, cultivadas com meio	

sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR.....	55
Tabela 11. Expressão relativa e desvio padrão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextrina.....	57
Tabela 12. Expressão relativa e desvio padrão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistente, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina.....	58
Tabela 13. Expressão relativa e desvio padrão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	60
Tabela 14. Expressão relativa e desvio padrão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	61
Tabela 15. Expressão relativa e desvio padrão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes cultivadas com meio sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR.....	62
Tabela 16. Expressão relativa e desvio padrão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextrina.....	63
Tabela 17. Expressão relativa e desvio padrão do gene LRP em células	

de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina.....	65
Tabela 18. Expressão relativa e desvio padrão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	66
Tabela 19. Expressão relativa e desvio padrão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR.....	67
Tabela 20. Expressão relativa e desvio padrão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, cultivadas com meio sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR.....	68
Tabela 21. Expressão relativa e desvio padrão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextreina.....	69
Tabela 22. Expressão relativa e desvio padrão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina.....	71

**Resumo**



Celestino AT. *Modulação do fenótipo de resistência a múltiplas drogas por lipoproteínas em células de sarcoma uterino resistente à doxorubicina.* Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009

O desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas na terapêutica do câncer é um importante obstáculo para o tratamento efetivo. Os mecanismos de resistência a múltiplas drogas ocasionam a redução intracelular de agentes quimioterápicos e, por conseqüência, estão envolvidos no fracasso no tratamento do câncer. Os principais genes envolvidos neste fenômeno são: o gene MDR1("multiple drug resistctance"), que codifica uma glicoproteína de alto peso molecular, a P-gp; o gene MRP1, que codifica uma glicoproteína de 190 Kda, denominada proteína associada à resistência a múltiplas drogas; e o gene da LRP (proteína relacionada à resistência de pulmão). Alguns estudos sugerem que o colesterol pode estar envolvido diretamente com o fenômeno de resistência a múltiplas drogas, e que os lipídeos podem influenciar várias e complexas funções no MDR, por afetarem o transporte de drogas através da membrana plasmática. Além disso, células tumorais tem maior necessidade de colesterol devido a uma taxa de multiplicação mais elevada que as células normais. Neste estudo analisou-se a expressão dos genes MDR1, MRP1 e LRP em células de sarcoma uterino resistentes à doxorubicina, e a influência de lipoproteínas. Houve aumento da expressão dos genes MDR1, MRP1 e LRP nas células tratadas com a LDL, sendo mais expressivo o gene MDR1. A HDL diminuiu a expressão dos genes MRP1 e LRP. No entanto, o gene MDR1 teve sua expressão diminuída somente em concentrações maiores. As células cultivadas em meio sem soro fetal apresentaram um elevado aumento na expressão destes genes. Em conclusão, as lipoproteínas podem modular a expressão dos genes MDR1, MRP1 e LRP e, assim, atuar na resistência a múltiplas drogas.

Descritores: 1. Resistência a múltiplos medicamentos 2. Doxorubicina 3. Lipoproteínas

## **Summary**

Celestino AT. *Modulation of phenotype of multidrug resistance for lipoprotein in uterine sarcoma cells resistant to doxorubicin*. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP (Brazil); 2009.

The development of multidrug resistance in anticancer therapy is an obstacle in the efficiency of the treatment. The multidrug resistance mechanism causes reduction of intracellular chemotherapeutic drugs. Therefore, it leads to treatment failure. There are three main multidrug resistance genes: MDR1, which codifies the P-gp (a high weight glycoprotein); MRP1, which codifies a 190 Kda glycoprotein; and, the LRP (lung resistance related protein) gene. Several reports suggest that cholesterol may be directly involved with the multidrug resistance phenomenon and that lipids may affect many complex functions in this regard, as the activity of the drug transport across the plasmatic membrane. Moreover, tumor cells have great cholesterol necessity due to the high cell multiplication rate. Here we described the MDR, MRP, LRP gene expression of a doxorubicin-resistant uterine sarcoma cell line under the influence of lipoproteins. LDL increased the expression of all genes, mainly MDR1. Treatment with HDL led to reduction of MRP and LRP expression. However, the MDR gene expression decreased only by higher concentrations of HDL. Cells grown in serum-deprived medium led to an increased expression of all the studied genes. Therefore, lipoproteins may modulate the MDR, MRP, LRP gene expression and, consequently, the cell resistance to drugs.

Descriptors: 1. Drug resistance, multiple 2. Doxorubicin 3. Lipoproteins

## **1. Introdução**

A ligação entre colesterol e câncer não é nova. Há mais de um século atrás, Holden Webb sugeriu que o câncer ocorria devido à cristalização do colesterol em células vivas. Oito anos depois, foi observado o acúmulo de colesterol em tumores (Brown, 2007).

A quimioterapia possui uma importante função no tratamento do câncer. Para diminuir os efeitos da quimioterapia tradicional, algumas moléculas utilizadas como carregadoras de drogas anticancer vem sendo estudadas. Sistemas baseados em lipossomos e LDL (lipoproteína de baixa densidade) demonstram ser promissores no aperfeiçoamento dos efeitos terapêuticos das drogas anticancer e na redução dos efeitos colaterais associados a essas drogas. Entretanto, pacientes que tem recidivas após o tratamento com quimioterápicos apresentam o desenvolvimento da resistência a múltiplas drogas (MDR), limitando, assim, o potencial do tratamento (Shu & Liu, 2007).

O colesterol é um importante constituinte na formação de membranas celulares. As células adquirem colesterol de duas formas, através da LDL e pela biossíntese na própria célula. O transporte de colesterol pela LDL é mediado por receptores de LDL localizados na membrana celular e estes receptores estão aumentados em células de câncer, enquanto que nos tecidos normais os receptores de LDL podem ser regulados (Shu & Liu, 2007).

Os lipídeos podem influenciar o transporte de drogas através da membrana plasmática e modular a atividade dos transportadores de droga, proporcionando diminuição do acúmulo intracelular de agentes

quimioterápicos levando ao típico fenótipo de resistência a múltiplas drogas (Rothnie *et al.*, 2001).

### **1.1 Mecanismos de resistência a múltiplas drogas**

O uso de agentes quimioterápicos constitui um dos tratamentos eletivos para diversos tumores. Contudo, muitas neoplasias não respondem à quimioterapia e outras, inicialmente responsivas, tornam-se resistentes posteriormente. O desenvolvimento de resistência frente a diferentes agentes antineoplásicos é um obstáculo fundamental para o êxito terapêutico desde o início do uso da quimioterapia no tratamento de tumores. A utilização de múltiplas drogas combinadas determinou um importante avanço para a diminuição no desenvolvimento de resistência, porém, diversos tumores persistem resistentes aos mais diferentes tipos de tratamento farmacológico (Goldie & Coldman, 1979).

O fator de maior relevância envolvido no fracasso do tratamento do câncer é, portanto, representado pelo desenvolvimento de resistência a drogas pelas células tumorais (Ginn, 1996; Kanzanki *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001). A resistência a drogas pode ser definida como a habilidade das células neoplásicas de sobreviverem à exposição a agentes tóxicos em doses máximas toleradas por tecidos normais e refere-se à resistência simultânea a uma variedade de agentes citotóxicos que apresentam diferentes sítios de ação e estruturas químicas diversas (Ginn, 1996; Raaijmakers *et al.*, 1998).

Pode constituir-se numa propriedade intrínseca das células tumorais, ou pode ser adquirida por populações destas células que inicialmente são sensíveis à quimioterapia e, posteriormente, tornam-se resistente com a exposição aos agentes citotóxicos (Ginn, 1996; Liu *et al.*; 2001).

A inabilidade em tratar pacientes de forma efetiva após a recidiva do tumor deve-se a múltiplos fatores de resistência, estudados há aproximadamente três décadas. Os mecanismos de resistência representam diversas formas de proteção da célula e do organismo e estão presentes na maioria das células normais. Infelizmente, muitos tumores utilizam esses mecanismos para sua própria proteção (Bergman, 2003).

A resposta de células tumorais no tratamento com drogas pode ser definida por um vasto número de mecanismos moleculares operando em diferentes estágios (desde a penetração das substâncias dentro das células até a morte celular ou o encerramento de algum estágio do ciclo celular). Recentemente um conjunto de mecanismos capazes de definir resistência a drogas foi expandido, e os conceitos de organização do tumor e proteção celular ficaram mais complicados (Stavrovskaya & Stromskaya, 2008).

Durante o século XX, o programa de seqüenciamento do Genoma Humano levou à descoberta de um grande número de transportadores ABC, cujas proteínas estão presentes em todos os organismos vivos (Stavrovskaya & Stromskaya, 2008). Estes transportadores ABC, pertencem a uma vasta família de proteínas transportadoras dependentes de ATP, que se encontra em domínios transmembrânicos (Glavinas *et al.*, 2004).

A atividade dos transportadores ABC representa uma estratégia básica de defesa das células contra o efeito citotóxico de agentes xenobióticos. A caracterização detalhada dos mecanismos causadores de MDR, tanto em células procariontas quanto em eucariotas de microorganismos ou de células neoplásicas humanas, é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para prevenir ou transpor a resistência ao tratamento (Lage, 2003).

## **1.2 ABCB1 MDR/P-glicoproteína**

Este foi o primeiro transportador de membrana descrito por sua habilidade em conferir resistência a múltiplas drogas em células de câncer.

O gene de resistência a múltiplas drogas, denominado MDR, codifica uma proteína de alto peso molecular a P-glicoproteína (P-gp), a qual apresenta múltiplas isoformas codificadas por famílias do gene MDR (MDR-1, MDR-2, MDR-3) (Ginn, 1996; Bates, 1999; Lee *et al.*, 1996; Liu *et al.*; 2001; Moore *et al.*, 1995). No entanto, a isoforma conhecida em seres humanos por conferir resistência a drogas é codificada pelo gene MDR-1.

A P-gp funciona como uma bomba de efluxo dependente de energia, que resulta em uma diminuição intracelular de agentes citotóxicos em células tumorais (Ginn, 1996; Lee *et al.*, 1996; Liu *et al.*; 2001; Loggini *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 1995). A P-gp é uma glicoproteína de 170-Kda, transmembrânica, com dois domínios ATPase, sendo que o domínio interno transporta compostos hidrofílicos, incluindo muitos agentes quimioterápicos,



para o exterior da célula, de forma dependente de energia (Liu *et al.*; 2001; Niehans *et al.*, 1992), conforme figura 1.

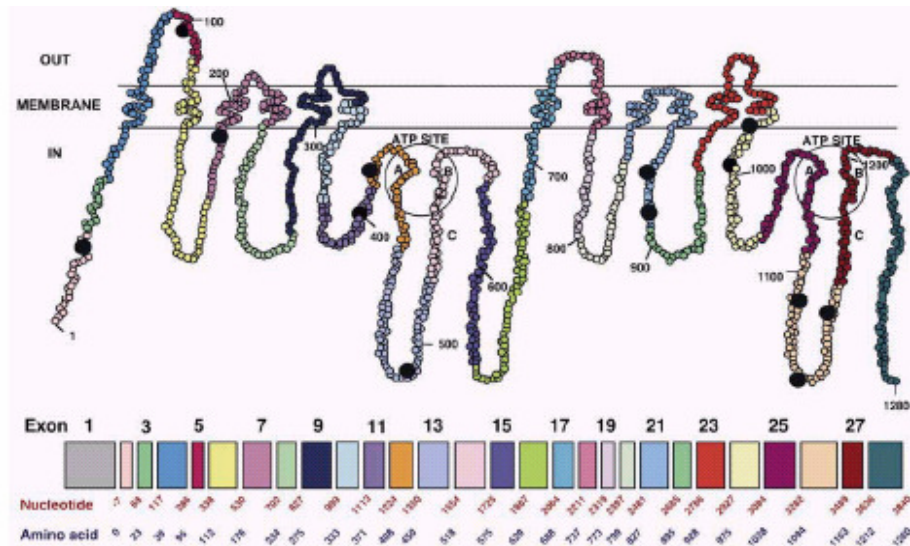


Figura 1. Estrutura da P-glicoproteína

Pouco se sabe a respeito da regulação deste gene. Diferentes agentes, tais como hormônios, oncogenes e fatores de transcrição podem ser relacionados à modulação da expressão do MDR-1 em seres humanos. Substâncias ou fatores como o butirato de sódio, ácido retinóico, vincristina, gene P53, fator nuclear kB, NF-IL 6 e YB-1 são alguns exemplos (Bates, 1999). Hormônios esteroidais induzem a expressão MDR-1 no epitélio secretor do útero. Níveis nucleares de YB-1, um fator de transcrição associado à proliferação celular, podem estar relacionados à expressão do MDR-1 em câncer de mama e osteossarcoma em seres humanos. Portanto, a ativação do MDR-1 pode ser desencadeada por diversos fatores (Bates, 1999). O MDR é um sistema de proteção das células contra compostos, incluindo drogas caracterizadas por diferentes estruturas químicas e por

diferentes mecanismos de atividade intracelular (Stavroskaya & Stromskaya, 2008).

A P-gp em seres humanos é expressa em tecidos normais: células do córtex da adrenal, na superfície canalicular de hepatócitos, superfície apical das células dos túbulos contornados proximais dos rins, superfície mucosa do intestino delgado e grosso, glândulas sebáceas da pele, endométrio do útero gravídico, trofoblastos da placenta, dutos pancreáticos e células epiteliais de capilares de tecidos como testículo e cérebro (Ginn, 1996; Loggini *et al.*, 2001).

Nestes locais, a P-gp atua na retirada de compostos xenobióticos tóxicos e no transporte de hormônios esteroidais (Niehans *et al.*, 1992). Esta expressão em órgãos secretolíticos revela sua participação fisiológica na eliminação de produtos tóxicos intrínsecos e extrínsecos. Tumores originados dos tecidos citados acima, geralmente expressam a P-gp intrinsecamente, indicando que sua expressão pode ser mantida posteriormente em uma transformação neoplásica (Loggini *et al.*, 2001).

Os padrões de expressão da P-gp em tumores humanos distribuem-se em quatro categorias (Glinn, 1996; Liu *et al.*; 2001). A primeira é representada por aqueles tumores com expressão intrínseca da P-gp, derivados de células que expressam esta proteína em estado não-neoplásico e são também tradicionalmente refratários ao tratamento com drogas afetadas pelo fenômeno MDR. Os tumores que apresentam expressão intrínseca da P-gp originam-se de órgãos onde existe a expressão fisiológica da P-gp, como as glândulas adrenais e os rins

(BERGMAN et al., 1996). A segunda categoria envolve tumores que apresentam uma expressão ocasional da P-gp, como os vários tipos de leucemia, linfoma não-Hodgkin e alguns casos de neoplasias mamárias. Estes tumores são considerados inicialmente sensíveis à quimioterapia. A terceira relaciona-se a neoplasias que desenvolvem uma rara expressão da P-gp e apresentam uma sensibilidade variável à quimioterapia. Incluem-se neste grupo a maioria dos neoplasmas mamários, melanomas, tumores da vesícula urinária, tireóide, timo, ovário e próstata. A quarta categoria abriga tumores que expressam a P-gp após o tratamento, sendo eles o linfoma não-Hodgkin de grau intermediário de malignidade, mieloma múltiplo, leucemias mielóides agudas, sarcomas que se desenvolvem na infância, tumores ovarianos e neuroblastomas. A expressão da P-gp em certos cânceres deste grupo é associada a um mau prognóstico, progressão da doença e previsível resistência a múltiplas drogas (Ginn, 1996; Liu *et al.*; 2001). Muitos estudos clínicos demonstraram a expressão da P-gp em pacientes portadores de mieloma múltiplo e os níveis aumentados desta proteína quando estes se tornam resistentes à vincristina e à doxorubicina (Dalton *et al.*, 1995).

### **1.3 P-gp e sua afinidade por drogas**

A maioria dos agentes quimioterápicos é dissolvida na bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática, difundindo-se em um gradiente de concentração. A P-gp atua contrariamente, expulsando esses agentes para o meio extracelular (Ambudkar *et al.*, 2003).

Existem basicamente dois mecanismos de captação de drogas pela membrana citoplasmática. No caso de drogas hidrofílicas como a cisplatina, análogos de nucleosídeos e antifolatos, estas não conseguem cruzar a membrana citoplasmática isoladamente. Há necessidade de transportadores ou a presença de canais hidrofílicos na membrana, para que estes agentes alcancem o meio intracelular (Ambudkar *et al.*, 2003). Nestes casos, o fenômeno de resistência pode ser originado a partir de mutações geradas nestes transportadores, resultando no impedimento da entrada destes compostos na célula (Ambudkar *et al.*, 2003).

Em relação aos agentes hidrofóbicos, como os alcalóides da vinca, antraciclinas, actinomicina D, etoposídeo e paclitaxel, estes atravessam a membrana citoplasmática por difusão, sem a necessidade de transportadores específicos. Assim, a única forma de manter estas drogas fora da célula é pela ativação dos sistemas de transporte dependentes de energia, como a família das proteínas transportadoras ABC, cujo seu principal representante, a P-gp, leva à extrusão dessas drogas, resultando no fenótipo MDR (Ambudkar *et al.*, 2003).

Um grande e diverso grupo de substâncias estruturalmente não relacionadas pode agir como substratos da P-gp. Este grupo inclui antraciclinas (doxorubicina), alcalóides da vinca (vincristina), actinomicenos (actinomicina D, dactinomicinas), taxol (paclitaxel), agentes alquilantes (mitomicina C), antibióticos peptídicos (gramicidina, valinomicina), e muitos outros. Inibidores de protease do HIV-1 podem ser considerados como substratos da P-gp. Dessa forma a P-gp pode influenciar negativamente o

tratamento dos pacientes HIV+ com estes substratos. Por outro lado, a P-gp é capaz de expulsar efetivamente o peptídeo hidrofóbico viral gp41 das células. A interação desse peptídeo com a membrana plasmática celular é o passo inicial da entrada do vírus HIV na célula. A P-gp pode diminuir a infecção de HIV em linhagens celulares que a expressam. Deste ponto de vista, a P-gp é um transportador ABC com extrema especificidade aos substratos (Breier *et al.*, 2005).

Vários substratos fluorescentes da P-gp, assim como a doxorrubicina e a rodamina 123, são usados para demonstrar a atividade de transporte pela P-gp. Indicadores de cálcio intracelular, assim como calceína, fura-2 e fluo-3, em particular suas formas esterificadas (em que são capazes de entrar nas células via difusão passiva através da membrana plasmática) são substratos para P-gp e podem ser usados para medir com precisão a atividade de transporte da P-gp, usando citometria de fluxo ou microscópio confocal (Breier *et al.*, 2005).

Uma propriedade característica da resistência a múltiplas drogas mediada pela P-gp é reverter este fenômeno através de substâncias e drogas não citotóxicas. Assim, o verapamil e a ciclosporina A são geralmente aceitos como inibidores padrão da P-gp. Os agentes inibidores da P-gp são um grupo diverso e bem caracterizado de substâncias que incluem bloqueadores de canais de cálcio e sódio, antagonistas da calmodulina, anestésicos locais, esteróides, agentes imunossupressores, inibidores da proteína quinase, flavonóides, detergentes, alcalóides, compostos macrolide, metilxantinas derivadas da pentoxifilina, etc. Essas

substâncias reversoras do MDR mediado pela P-gp podem agir por diferentes mecanismos: (1) interação direta da molécula P-gp com seu sítio de ligação com ATP, onde a droga se liga ao sítio ou em outro lugar que seja crítico para a função do transporte; (2) modulação da expressão da P-gp; (3) modulação da atividade da P-gp pela inibição das modificações pós-translacionais (fosforilação ou glicosilação); (4) modulação indireta das atividades de transporte da P-gp por outros sistemas (Breier *et al.*, 2005).

Além dos diversos quimioterápicos, existem outras drogas, consideradas substratos da P-gp. São elas a ivermectina, ondasetrona, loperamida, itraconazol, cetoconazol, ciclosporina, rifampicina, fenobarbital, digoxina, doxiciclina, omeprazole e anti-histamínicos (Bergman, 2003). Esta informação é importante, uma vez que a utilização concomitante destas drogas com quimioterápicos pode alterar a farmacocinética e toxicidade dos agentes empregados no protocolo quimioterápico, além da possibilidade de indução da resistência a múltiplas drogas (Bergman, 2003). Além disso, observou-se que por meio da P-gp, as células cancerígenas tornam-se simultaneamente resistentes a diferentes drogas.

Estudos clínicos abrangendo vários tumores malignos constataram o desenvolvimento progressivo da expressão de P-gp, durante o tratamento quimioterápico. Nestas condições, a exposição a agentes citotóxicos leva à seleção de clones resistentes. A recidiva da doença maligna condiz com o pico, ou seja, estágio máximo de multiplicação desses clones malignos (Mealey *et al.*, 1998).

#### 1.4 ABCC1/MRP1

Em 1992, Cole et al. relataram a existência de um segundo tipo de proteína que também funcionaria como uma bomba de efluxo de drogas, presente em células cancerígenas pulmonares resistentes à doxorrubicina.

Vários trabalhos sobre o gene MRP incluindo organização, localização, distribuição tecidual e função fisiológica, topologia, ligação de substratos a sítios específicos e transporte de substratos dependentes de ATP, tem sido realizados desde a clonagem de cDNA do MRP1. Devido à natureza dessa glicoproteína de membrana, mais esforço será necessário para elucidar a relação entre a estrutura e função desta proteína com a superexpressão de MDR em células de câncer (Chang, 2007).

O gene MRP1 codifica uma glicoproteína de 190 Kda, que apresenta homologia ao gene MDR-1 e encontra-se no cromossomo 16 (Zhan *et al.*, 1997). A figura 2 ilustra o modelo estrutural da proteína MRP, designada proteína associada à resistência a múltiplas drogas que pode explicar parcialmente o fenômeno da resistência a múltiplas drogas em tumores cujo mecanismo envolvido não seja mediado pela P-gp (Zhan *et al.*, 1997).

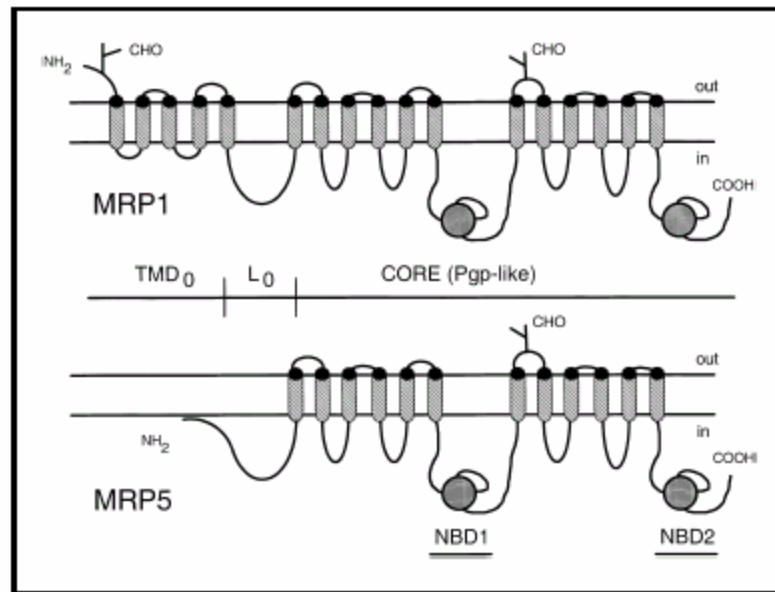


Figura 2. Estrutura da proteína MRP

As proteínas P-gp e MRP são proteínas transportadoras ABC que desempenham um importante papel fisiológico no transporte de diferentes moléculas por meio das membranas biológicas, desde células bacterianas, fúngicas, protozoárias até células neoplásicas humanas. Esta superfamília de proteínas transportadoras é de fundamental importância para a resistência a drogas (Lage, 2003).

A proteína MRP1 é expressa em diferentes órgãos e tipos celulares, com altos níveis no pulmão, testículos, rins, placenta, músculo esquelético e cardíaco. A MRP1 também é expressa no estômago, baço, cólon, tireóide, bexiga urinária e glândula adrenal (Chang, 2007). A expressão da proteína MRP1 em plexos coróides está de 4 a 5 vezes elevado em relação aos pulmões, que é consistente com os altos níveis de RNAm da MRP1 achados no plexos coróides de ratos (Chang, 2007).



Muitas células tumorais co-expressam P-gp e MRP (Bergman, 2003). A MRP constitui o segundo mecanismo mais freqüente de resistência a múltiplas drogas (Bergman, 2003).

Pesquisadores divergem quanto à distribuição intracelular da MRP. Estudos da década passada sugerem uma localização predominante no retículo endoplasmático liso, enquanto outros, uma distribuição na membrana plasmática ou nas vesículas do complexo de Golgi (Loe *et al.*, 1996).

Bergman (2003) afirma que a MRP localiza-se fisiologicamente no citoplasma de células normais, enquanto que nas células neoplásicas é encontrada na membrana citoplasmática, indicando sua possível função excretora nas mesmas (Bergman, 2003).

Embora o mecanismo de ação da MRP não seja completamente conhecido, esta proteína também atua no aumento do efluxo de drogas, de forma dependente de energia, resultando na redução do acúmulo intracelular de drogas (Loe *et al.*, 1996). Participa no transporte de conjugados de glutathione (GSH) e glucuronídeos de bilirrubina, drogas neutras conjugadas a sulfato e drogas aniônicas como a metotrexato, no interior da célula e na excreção dos mesmos para o meio extracelular (Borst *et al.*, 2000). Desta forma, a MRP tem importante papel na detoxificação, a qual também ocorre para os agentes quimioterápicos, facilitando o mecanismo de resistência (Bergman, 2003).

A principal proteína homóloga à MRP é a MRP1, que está presente na maioria dos tecidos, enquanto que a P-gp é expressa principalmente em tecidos que funcionam como barreiras (Ambudkar *et al.*, 2003).

A MRP1, na espécie humana, parece estar envolvida na resistência a múltiplas drogas em casos de neoplasias como leucemias, linfomas, fibrossarcomas, tumores de pulmão, mama, útero, próstata e em carcinoma de bexiga (Berger *et al.*, 1997; Lage, 2003; Loe *et al.*, 1996).

Estudos constataram que a MRP-1 pode conferir resistência a diversos quimioterápicos, incluindo as antraciclinas, alcalóides da vinca, epipodofilotoxinas e metotrexato (Lage, 2003; Zhan *et al.*, 1997). O metotrexato, por ser um ânion orgânico, pode formar um complexo com moléculas de glutatona e ser lançado para fora da célula por meio da MRP1. Ao contrário, a P-gp preferencialmente transporta compostos orgânicos neutros ou básicos (Borst *et al.*, 2000).

### **1.5 Proteína relacionada à resistência de pulmão (LRP)**

Em 1986, foi identificada uma proteína denominada proteína relacionada à resistência de pulmão (“Lung Resistance Related Protein” – LRP), detectada primeiramente em células tumorais de câncer de pulmão resistentes a múltiplas drogas, através de mecanismo não mediado pela P-gp (Raaijmakers *et al.*, 1998). Os pesquisadores notaram que a LRP é idêntica à maior proteína do grupo “vault” a MVP (Major Vault Protein). Vaults são organelas citoplasmáticas localizadas na membrana nuclear e no poro nuclear (Ohno *et al.*, 2001; Raaijmakers *et al.*, 1998), conforme figura 3.

Acredita-se que as “vaults” estejam envolvidas nos transportes vesicular e nucleocitoplasmático de drogas (Kanzaki *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 2001).

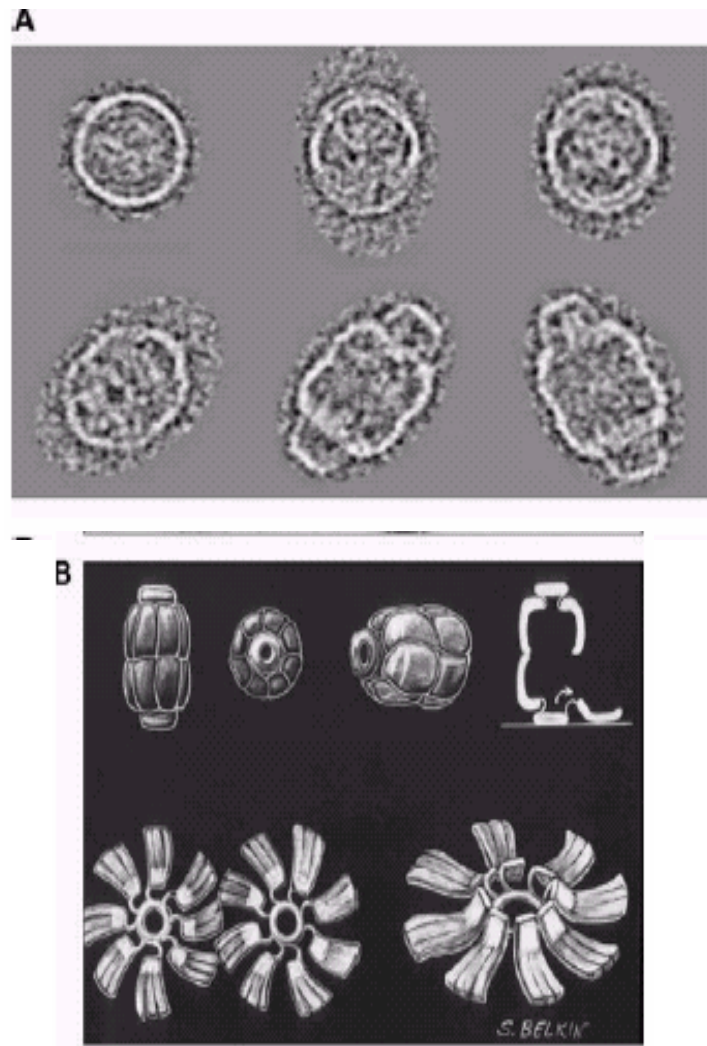


Figura 3. Complexo “vault” em microscopia eletrônica (A); em desenho esquemático (B)

Cogita-se que as proteínas “vault” mediem o transporte bidirecional de uma variedade de substratos entre o núcleo e o citoplasma celular (Raaijmakers *et al.*, 1998; Van Zon *et al.*, 2003). Também já foi relatada a presença de drogas em vesículas de exocitose, no interior de células

resistentes a múltiplas drogas, que apresentaram uma alta expressividade da LRP (Raaijmakers *et al.*, 1998).

Um estudo realizado em células de carcinoma de faringe, as quais apresentaram uma alta expressão de LRP, demonstrou o possível envolvimento desta proteína no transporte nucleocitoplasmático de drogas, resultando no fenótipo MDR. As células de carcinoma de faringe sensíveis e resistentes foram submetidas a determinadas concentrações de benzopireno ou de doxorubicina e verificando-se a distribuição intracelular destas drogas por microscopia de fluorescência. Foi observado que as células sensíveis ao receberem o tratamento com o benzopireno ou doxorubicina, apresentaram maior acúmulo no núcleo da célula, local de ação destas drogas, do que no citoplasma, conferindo-se assim, sensibilidade a estes agentes. Por outro lado, as células resistentes apresentaram maior acúmulo de drogas no citoplasma do que no núcleo, distanciando-as do seu sítio de ação. Este experimento assim como outros, aponta para a importância desta proteína como mecanismo MDR (Cheng *et al.*, 2000).

A proteína LRP pode ser encontrada fisiologicamente no cólon, pulmões, túbulos contornados proximais renais, córtex da adrenal (Filipits *et al.*, 2000).

A LRP apresenta uma alta expressividade em tecidos expostos a longo prazo a agentes xenobióticos como epitélio brônquico, córtex da adrenal e macrófagos (Van Zon *et al.*, 2003).

A LRP, encontrada em tecidos normais e neoplásicos de seres humanos, pode levar a maior ou menor sensibilidade à quimioterapia por

diferentes tipos de tumores (Raaijmakers *et al.*, 1998), principalmente no câncer de pulmão (origem de sua denominação), mas também nas leucemias, linfomas e tumores sólidos (Mossink *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2001).

Embora este mecanismo de resistência ainda não tenha sido extensivamente estudado, foi demonstrado que a LRP está envolvida na resistência à adriamicina e cogita-se que possa estar associada à resistência em casos de neoplasia mamária (Schneider *et al.*, 2001).

Siva *et al.* (2001), relataram que linhagens celulares resistentes a múltiplas drogas como carcinoma de pulmão, mieloma e carcinoma de mama, apresentam níveis elevados de MVP (LRP). No entanto, já se demonstrou previamente que a MVP não é suficiente para levar ao fenótipo MDR isoladamente. “Vaults” são complexos de múltiplas subunidades e precisam interagir para ocasionar o fenótipo MDR.

Estudos recentes em mielomas e em outras neoplasias humanas, relacionaram a expressão da LRP à resistência a agentes alquilantes como o melfalano no caso de mieloma múltiplo (Mossink *et al.*, 2003; Raaijmakers *et al.*, 1998). Além disso, a expressão da LRP em células tumorais está associada à resistência à doxorrubicina, vincristina, carboplatina, cisplatina, etoposídeo, paclitaxel e gramicidin D (Filipits *et al.*, 2000).

A expressão da LRP também foi associada a uma resposta insatisfatória à quimioterapia e a uma sobrevida curta, em casos de linfoma de células B, sugerindo que esta proteína seja um fator de resistência clinicamente relevante em casos de linfoma (Filipits *et al.*, 2000).

No caso de leucemia mieloide aguda em seres humanos, pode-se observar a co-expressão da P-gp, MRPI e da LRP simultaneamente. Geralmente, as piores respostas ao tratamento e taxa de sobrevida são observadas em pacientes que co-expressam estas proteínas e o melhor prognóstico em pacientes negativos para as mesmas (Mossink *et al.*, 2003). A existência de co-expressão destas proteínas já foi relatada previamente por Moran *et al.* (1997), em células de carcinoma de ovário humano.

Em relação aos tumores sólidos em seres humanos, a expressão da LRP foi notada em câncer de ovário, mama e em neoplasias de epitélio brônquico, ceco, colon, reto, melanoma, osteossarcoma e neuroblastoma (Mossink *et al.*, 2003).

Até o momento, poucos estudos contribuíram para a elucidação da participação da “vaults” no desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas (Mossink *et al.*, 2003).

## **1.6 Metabolismo lipídico**

Os lipídeos são um grupo heterogêneo de compostos insolúveis em água, que podem ser divididos em quatro grupos principais: ácidos graxos, triglicérides, fosfolípidos e o colesterol. Devido a sua característica hidrofóbica, quando presentes na corrente sanguínea, naturalmente formam estruturas organizadas, macroagregados moleculares, denominados lipoproteínas (Davis *et al.*, 1996; Bachorik *et al.*, 1999 ).

As lipoproteínas, unidades funcionais de transporte de lipídeos na corrente sanguínea, tem forma esférica e são compostas por núcleo lipídico

hidrofóbico, constituído, principalmente, por éster de colesterol e triglicérides, envolto por uma monocamada hidrofílica, composta por fosfolípidos, colesterol e proteínas (Eisemberg & Levi, 1995). Seus componentes protéicos são denominados apolipoproteínas e se associam à lipoproteína por interações não covalentes (Schaeffer *et al.*, 1978).

As apolipoproteínas desempenham importante papel na solubilização e estabilização estrutural das lipoproteínas, modulam o metabolismo lipoprotéico ao atuarem como ativadores e bloqueadores enzimáticos e, por fim, mediam a captação celular das lipoproteínas por receptores específicos (Schaeffer *et al.*, 1978). A classificação das apolipoproteínas é feita de acordo com uma nomenclatura alfanumérica: A-I, A-II e A-IV, apo B-100 e B-48, apo C-I C-II e C-III, apo D, apo E e apo (a) (Schaeffer *et al.*, 1978).

As lipoproteínas se diferem quanto a composição (diferenças quantitativas e qualitativas dos lipídeos e apolipoproteínas), tamanho e mobilidade eletroforética. A sua classificação pode ser feita por ultracentrifugação em gradiente de densidade, ou de acordo com sua migração eletroforética em acetato de celulose ou gel de agarose (Lee *et al.*, 1970; Chapman *et al.*, 1981). As quatro maiores classes de lipoproteínas plasmáticas são: quilomícron, VLDL, LDL e HDL. Existem duas menores classes de lipoproteínas que são: lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína (a) (Scartezini *et al.*, 2003).

As propriedades físicas e a composição das principais lipoproteínas estão reunidas na tabela 1 e a classificação e as propriedades das principais apolipoproteínas estão reunidas na tabela 2.

Tabela 1. Propriedades físicas e composição das principais lipoproteínas

	QM	VLDL	IDL	LDL	HDL	Lp (a)
Tamanho (nm)	75-1200	30-70		18-30	5-12	25-30
Densidade (g/ml)	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21	1,045-1,080
Mobilidade Eletroforética	Origem	Pré- $\beta$	Entre $\beta$ e Pré- $\beta$	$\beta$	$\alpha$	Pré- $\beta$
Triglicérides (%)	80-95	45-65	Aprox. 32	4-8	2-7	Semelhante LDL
Fosfolípides (%)	3-6	15-20	Aprox. 21	18-24	36-32	Semelhante LDL
Colesterol (%)	1-3	4-8	Aprox. 8	6-8	3-5	Semelhante LDL
Ester de Colesterol (%)	2-4	16-22	Aprox. 23	45-50	15-20	Semelhante LDL
Proteínas (%)	1-2	6-10	Aprox. 16	18-22	45-55	27
Principais Após	A-I, B-48, C-I, C-II, C-III	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100 E	B-100	A-I A-II	(a) B-100

Abreviaturas: QM= quilomícron, VLDL= Lipoproteína de muito baixa densidade, LDL= lipoproteína de baixa densidade, HDL= lipoproteína de alta densidade, Aprox. = aproximadamente. Adaptado de Bachorick *et al.*, 1999



Tabela 2. Classificação e propriedades das principais lipoproteínas

Lipoproteínas	PM (kda)	Lipoproteína Carreadora	Função
A-I	29	Quilomícron, HDL	Ativas a LCAT, Estimular o efluxo de colesterol Mediar a ligação da HDL com SR-B1 e ABCA1
A-II	17,4	HDL	Inibição da LH Estimular o Efluxo de Colesterol
A-IV	44,5	Quilomícron, HDL	Ativar a LCAT, Modular LLP, Estimular o efluxo de colesterol
B-48	240,8	Quilomícron	Secreção de lípidos do intestino sob a forma de QM
B-100	512,7	VLDL, IDL, LDL	Secreção de lípidos do fígado sob a forma de VLDL, Captação hepática da IDL e LDL
C-I	6,6	Quilomícron, VLDL, HDL	Ativar a LCAT, Inibir LH, Inibir a captação hepática das lipoproteínas ricas em TG
C-II	8,9	Quilomícron, VLDL, HDL	Ativar LLP, Inibir LH, Inibir a captação hepática das lipoproteínas ricas em TG
C-III	8,8	Quilomícron, VLDL, HDL	Inibir LLP, Inibir LH, Inibir a captação hepática das lipoproteínas ricas em TG
E	34,1	Quilomícron, VLDL, HDL	Ativas a LCAT, Ativar LH, Estimular o efluxo de colesterol Captação hepática de QMr, IDL e HDL
(a)	187 a 662	Lp (a)	Desconhecida

Abreviaturas: QM= Quilomícron, QMr= remanescente de quilomícron, VLDL= lipoproteína de muito baixa densidade, LDL= lipoproteína de baixa densidade, IDL= lipoproteína de densidade intermediária, HDL= lipoproteína de alta densidade, LCAT= lecitina colesterol acil-transferase, LH= lípase hepática, LLP= lípase lipoproteica. Adaptado de Scartezini *et al.*, 2003 e Wang & Briggs, 2004

O transporte dos lipídeos na circulação sanguínea pode ser dividido em duas vias principais: o transporte exógeno, que corresponde à via de transporte dos lipídios provenientes da dieta; e o transporte endógeno, que corresponde ao transporte dos lipídios de origem hepática. Além disso, há o

transporte reverso do colesterol que corresponde ao transporte do colesterol de tecidos extra-hepáticos para o fígado (Brown *et al.*, 1981).

### **1.7 Funções da P-Glicoproteína na esterificação do colesterol**

As células exercem um controle estrito sobre o nível de colesterol livre através de mecanismos homeostáticos que controlam as taxas de síntese de colesterol, da esterificação de colesterol e da endocitose de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), rica em colesterol, mediada por receptores específicos. A esterificação do colesterol é catalizada pela enzima acil-CoA: colesterol aciltransferase (ACAT), no retículo endoplasmático. O excesso de colesterol livre intracelular estimula sua esterificação e conseqüente armazenamento em gotas lipídicas citosólicas; este é um mecanismo de proteção, pois o colesterol livre em excesso pode ser tóxico para as células. A taxa de esterificação do colesterol é mais dependente da disponibilidade de colesterol no retículo endoplasmático do que dos níveis de ACAT (Debry *et al.*, 1996).

A HMG-CoA redutase, enzima-limitante da biossíntese de colesterol, também se encontra no retículo endoplasmático, mesmo quando seu substrato ou seu produto se encontrem no citosol. O excesso de colesterol livre diminui a atividade da HMG-CoA redutase, aumentando a taxa de degradação da enzima. Assim, esta é mais uma atividade no metabolismo do colesterol que ocorre no retículo endoplasmático (Debry *et al.*, 1996).

Vários compostos e substâncias interferem com a esterificação do colesterol, incluindo algumas utilizadas no tratamento do câncer como, por

exemplo, a progesterona inibe a esterificação do colesterol, inibindo diretamente a ACAT ou evitando a liberação de colesterol para a ação da ACAT (transporte de colesterol da membrana ao retículo endoplasmático) e seqüestro de colesterol no lisossomo (Debry *et al.*, 1996). A progesterona interage também com a P-glicoproteína, inibindo-a, assim como a testosterona e corticosterona (Debry *et al.*, 1996). A esterificação do colesterol, por sua vez, também é inibida por inibidores não esteroidais de MDR.

Luker *et al* 1999, mostraram a esterificação do colesterol com dados que sugerem uma possível função da P-gp no transporte de colesterol da membrana plasmática para o retículo endoplasmático. As células transfectadas com a P-gp humana esterificaram mais colesterol do que as células que não receberam o gene (Mizutani *et al.*, 2008).

Wang *et al* 2000, relataram que a P-gp tem uma função direta na disposição do colesterol. Em uma linhagem celular que superexpressava P-gp, o colesterol provocou uma inibição dramática no transporte de daunorrubicina, sugerindo que o colesterol interage diretamente com os substratos ligados aos sítios de P-gp, consistente com o colesterol transportado pela P-gp (Mizutani *et al.*, 2008).

Gayet *et al* 2005, observaram que células de leucemia linfoblástica aguda expressam elevados níveis de P-gp, e que a quantidade de colesterol esterificado aumenta linearmente a resistência à vinblastina, enquanto que a quantidade de colesterol livre e total aumenta de maneira não linear. O colesterol controla as atividades ATPase e de efluxo de droga mediado pela

P-gp. Isto sugere que o colesterol possa estar envolvido diretamente com o típico fenômeno de resistência a múltiplas drogas (Mizutani *et al.*, 2008).

### **1.8 Mudanças na membrana lipídica associada com MDR**

Os lipídeos podem influenciar múltiplas e complexas funções no MDR, por afetar o transporte de drogas através da membrana plasmática e por modular a atividade do transporte de drogas. Os lipídeos determinam a fluidez da membrana celular (ordem da bicamada lipídica e microviscosidade da membrana), a qual modificada pode afetar a habilidade das células (MDR) em acumular drogas. Semelhantemente a outras ATPases associadas à membrana, a P-gp deve ser reconstituída com fosfolipídios da bicamada em completa atividade. Fosfatidilcolina e fosfatidilserina insaturadas são cruciais para a restauração da atividade ATPásica da P-gp, enquanto que a fosfatidiletanolamina saturada é mais efetiva na ativação da ATPase. Além disso, os lipídeos atuam na acoplagem entre os sítios de ligação da droga e os sítios catalíticos da P-gp (Lavie *et al.*, 2000).

Diversos estudos demonstram que células resistentes a drogas exibem um aumento na fluidez da membrana, enquanto outros sugerem o oposto (Lavie *et al.*, 2000). Em paralelo, análises químicas de lipídeos celulares e a comparação quantitativa de vários tipos de lipídeos em células resistentes e sensíveis a drogas, tem indicado que a aquisição do MDR está associada com mudanças significativas no colesterol, esfingolipídios e outros lipídeos. Estas alterações no conteúdo lipídico podem ocorrer por mudanças

nas propriedades do MDR na membrana celular e podem afetar o transporte e extrusão da droga (Lavie *et al.*, 2000).

## **2. Objetivos**

Analisar a influência das lipoproteínas na expressão dos genes MDR1, MRP1 e LRP em células de sarcoma uterino resistentes à doxorubicina.

### **3. Métodos**



### 3.1 Preparo de LDL e HDL plasmáticas humanas

A preparação de LDL e HDL nativa foi feita a partir de plasma humano, obtido de doadores de sangue, após fracionamento do sangue de acordo com o método de Havel (1955). Adicionou-se ao plasma benzamidina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), nas concentrações finais de 2mM, 1mM e 1mg/ml, respectivamente. A densidade do plasma foi ajustada inicialmente de 1,006 g/ml (densidade normal do plasma) para 1,063 g/ml com brometo de potássio (KBr), na quantidade calculada de acordo com a fórmula de Radding-Steinberg (1960). Após homogeneização, as amostras foram ultracentrifugadas em ultracentrífuga Beckman a 49.000 x g por 24 horas a 4°C em rotor 80Ti. Após ultracentrifugação, o material de cor alaranjada (LDL) contido na porção superior do tubo (densidade inferior a 1,063 g/ml), foi aspirado; desprezou-se a porção incolor intermediária, e a porção esverdeada presente no fundo do tubo foi também aspirada. A densidade do material que contém a LDL foi determinada e ajustada para 1,006g/ml com solução salina. Este material foi novamente ultracentrifugado nas mesmas condições descritas acima. A fração de densidade superior a 1,006g/ml foi coletada e dialisada extensivamente contra tampão de 150mM de cloreto de sódio (NaCl) por 48 a 72hs. A densidade do material que contém a HDL foi ajustada para 1,215g/ml com KBr. Este material foi novamente ultracentrifugado nas mesmas condições descritas acima. A porção amarela correspondente a HDL foi coletada e dialisada contra tampão de 150 mM de cloreto de sódio (NaCl) por 72 hs. A concentração de proteína, tanto da LDL

como da HDL purificadas, foi determinada pelo método de Lowry (1951). O material foi esterilizado por passagem em filtro de 0,22 µm e armazenado a 4°C sob atmosfera de nitrogênio até o momento de sua utilização (Havel *et al.*, 1955).

### **3.2 Cultura de células de sarcoma uterino resistente à quimioterápicos**

Células de sarcoma uterino humano MES-SA/Dx5 (ATCC CRL-1977), resistentes à doxorrubicina, foram cultivadas em meio McCoy's 5A contendo SFB 10%, 100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina, 26,4mM bicarbonato de sódio. Estas células cresceram em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, conforme descrito (Dalton *et al.*, 1983). A não ser quando especificado, estas células sempre estarão mantidas neste ambiente.

### **3.3 Teste de citotoxicidade das lipoproteínas**

Cerca de  $1 \times 10^4$  células (sarcoma uterino resistente) foram cultivadas em meio de cultura em placas de 96 poços, em triplicata. As células foram incubadas sem ou com diferentes concentrações de LDL, HDL por 3 dias consecutivos (Cucco *et al.*, 1996). Diariamente foi feita a contagem de células viáveis pelo método MTT (Carmichael, 1987).

### **3.4 Eletroforese de lipoproteínas**

A eletroforese de lipoproteínas foi realizada em fitas de acetato de celulose (Stein, 1986). Utilizaram-se como reagentes: tampão Tris-Veronal, pH  $9,1 \pm 0,2$ ; tampão High Buffer pH  $8,8 \pm 0,2$ ; NaOH 5,5%; etanol absoluto;

corante Sudan black. Como soluções de trabalho: solução de coloração (50 mL de Sudan black + 50 mL de NaOH 5,5%) e solução fixadora (30 mL de NaOH 5,5% + 20 mL de etanol absoluto).

A fita de acetato de celulose foi umedecida com tampão Tris-Veronal; o excesso de tampão foi removido com papel-filtro. Amostras de plasma, HDL, LDL obtidas conforme descrito acima foram aplicadas nas fitas por três vezes, esperando-se a absorção das amostras entre uma aplicação e outra. Colocou-se o tampão Tris-Veronal na cuba de eletroforese. As fitas foram colocadas em uma base de apoio e, em seguida, na cuba de eletroforese com a parte da aplicação do lado do pólo negativo. A voltagem aplicada foi de 200 volts e o tempo de corrida foi de 45 minutos. Após a corrida eletroforética, as fitas foram retiradas e colocadas na solução fixadora por 10 minutos e, em seguida, na solução de coloração até o dia seguinte, quando foram retiradas, lavadas em água corrente e mantidas em um recipiente com água destilada até a análise.

### **3.5 Extração de RNA total**

Células de sarcoma uterino resistentes foram contadas e coletadas por centrifugação a 1.850 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado 1 ml de TRIzol para cerca de  $5-10 \times 10^6$  células e homogeneizou-se bem com uma pipeta. Incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200µl de clorofórmio e agitou-se vigorosamente por 15 segundos, seguido de repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi

transferida para um novo tubo previamente esterilizado. Adicionou-se 500µl de isopropanol e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e homogeneizou-se em vortex, suavemente, por 15 segundos. Centrifugou-se a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi colocado para secar por 15 minutos à temperatura ambiente e dissolvido em 50 µl de água tratada com DEPC (Chomczynski & Sacchil, 1987).

### **3.6 Análises da expressão dos genes MDR, MRP E LRP**

#### **3.6.1 PCR em tempo real**

O PCR em tempo real foi utilizado para a análise da expressão gênica dos genes MDR, MRP e LRP, utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. A expressão de cada RNAm foi normalizada em relação a expressão do gene da  $\beta_2$ -microglobulina. De acordo com instruções do fabricante do aparelho “Rotor-Gene RG 3000” (Cobertt Research), os ensaios foram realizados em duplicata e a variação no valor de CT (Cyclo of Threshold) entre as duplicatas não ultrapassaram 0,5. Todos os ensaios utilizaram amostra referência e um controle de amplificação ao qual não foi adicionada amostra.

Os experimentos PCR em tempo real foram realizados utilizando-se 250ng/µl de RNA e o SuperScript III Platinum SYBER Green One-Step qRT-

PCR Kit (Invitrogen), em volume final de 12,5 $\mu$ l. A condição usual de programação dos ciclos foi 50°C por cinco minutos para síntese de cDNA, 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Foi realizada curva de dissociação no intervalo de variação de temperatura 50 a 99°C, sendo 1°C por etapa de 30 segundos.

Os primers utilizados foram:

B2MG-S: 5'- ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA – 3'

B2MG-AS: 5'- ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG – 3'

MDR1-S: 5'- CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG – 3'

MDR1-AS: 5'- GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA – 3'

MRP-S: 5'- CTG AAA CCA TCC ATG ACC TCA ATC C -3'

MRP-AS: 5'- GCC TCC TCG TTC ACG TCC ACC TGG G -3'

LRP-S: 5'- GGG TTG TGC CCA TCA CCA CC- 3'

LRP-AS: 5'- GGT CCG CGG ATG AGC CAG TGG -3'

Para calcular a quantificação relativa foi utilizado o método  $\Delta\Delta C_T$ , que utiliza a seguinte fórmula:  $\Delta C_T = C_T \text{ gene alvo} - C_T \text{ gene endógeno}$ ,  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ do gene alvo} - \Delta C_T \text{ do gene endógeno}$ . O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak *et al.*, 2001)

### 3.6.2 Tratamento com sinvastatina

Primeiro a lactona presente na sinvastatina foi convertida para forma ativa. Dissolveu-se 40mg de sinvastatina em 1ml de etanol 100%, em seguida adicionou-se 1,5ml de NaOH 0,1M e foi feito um aquecimento da solução a 50°C por 2h. Em seguida, a solução foi neutralizada com 0,1M de

HCl para obter pH 7,2, e o volume final foi ajustado para 20ml. Desta solução estoque foram feitas alíquotas de 5 mM, as quais foram estocadas em freezer (Jakóbisziak *et al.*, 1991).

Foi realizado teste de citotoxicidade da sinvastatina pelo método de MTT (Carmichael, 1987). Cerca de  $1 \times 10^4$  células de sarcoma uterino resistente foram cultivadas em placas de 96 poços contendo meio sem SFB e sinvastatina nas concentrações de  $2 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$ , e foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$  por 24, 48 e 72h.

Cerca de  $3 \times 10^6$  células de sarcoma uterino resistente serem cultivadas em meio de cultura sem soro fetal bovino, em placas de 6 poços e em duplicata. As células foram incubadas com sinvastatina nas concentrações de  $2 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$ , e foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$  por 24, 48 e 72h. O controle de células não tratadas foi realizado da mesma forma que as células tratadas com sinvastatina. Após cada período, foi feita a extração de RNA e posterior análise de expressão por Real Time.

### **3.6.3 Tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina**

Primeiramente foi feito o teste de citotoxicidade da M $\beta$ CD, onde  $1 \times 10^4$  células foram incubadas em placas de 96 poços com meio sem SFB contendo 20, 30 e 100mM de M $\beta$ CD por 30 min, 1h, e 2h, a  $37^\circ\text{C}$  (Kamau *et al.*, 2005). Posteriormente, foi feita análise da citotoxicidade pelo método de MTT (Carmichael, 1987).

Cerca de  $3 \times 10^6$  células de sarcoma uterino resistente foram cultivadas em meio de cultura sem soro fetal bovino, em placas de 6 poços em

duplicata. As células foram incubadas com 20, 30 e 100 mM de M $\beta$ CD por 30 min, 1h, e 2h, a 37°C (Kamau *et al.*, 2005). O controle de células não tratadas foi realizado da mesma forma que as células tratadas com M $\beta$ CD. Após cada período, foi feita a extração de RNA e posterior análise de expressão por Real Time.

### **3.7 Análise da expressão da proteína P-gp**

Cerca de  $1 \times 10^6$  células de sarcoma uterino resistentes a doxorrubicina foram tratadas com LDL ou HDL nas concentrações de 0,45 e 0,85mg/ml. Incubou-se com 5 $\mu$ l de anticorpo anti-P-gp por 1h e 30min em gelo. Lavou-se com PBS uma vez e adicionou-se 100 $\mu$ l de paraformaldeído 4%. As aquisições e a análises foram realizadas em FACSCalibur utilizando o software CELLQuest Pro.

### **3.8 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados utilizando estatísticas descritivas, análise de variância de um fator simples (ANOVA 1 via), análises da variância em dois fatores (ANOVA 2 vias) seguidas do teste post Hoc Dunnet e Bonferroni respectivamente. Os valores foram apresentados como a média e o desvio padrão (DP) de três experimentos independentes realizados por triplicata e as diferenças estatisticamente significativas foram representadas nos gráficos com \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* ( $P < 0,001$ ). Para todas as análises foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism 5,

## **4. Resultados**



#### 4.1 Eletroforese de lipoproteínas

Foi possível observar, através da eletroforese de lipoproteínas (figura 4), que as amostras extraídas por ultracentrifugação estavam puras e não havia contaminação da amostra com outra lipoproteína. No plasma observou-se a presença das duas bandas de interesse, a superior sendo a  $\beta$ -lipoproteína (correspondente a LDL) e a inferior a  $\alpha$ -lipoproteína (correspondente a HDL). Nas extrações realizadas observou-se a banda correspondente ao produto extraído.

Foi realizada a determinação de colesterol total e frações das amostras obtidas. A tabela 3 mostra a média dos resultados da determinação de colesterol e de triacilgliceróis em diferentes amostras de plasma e frações correspondentes. Como esperado, as amostras de LDL apresentaram maior concentração de colesterol e de triacilgliceróis do que a HDL.

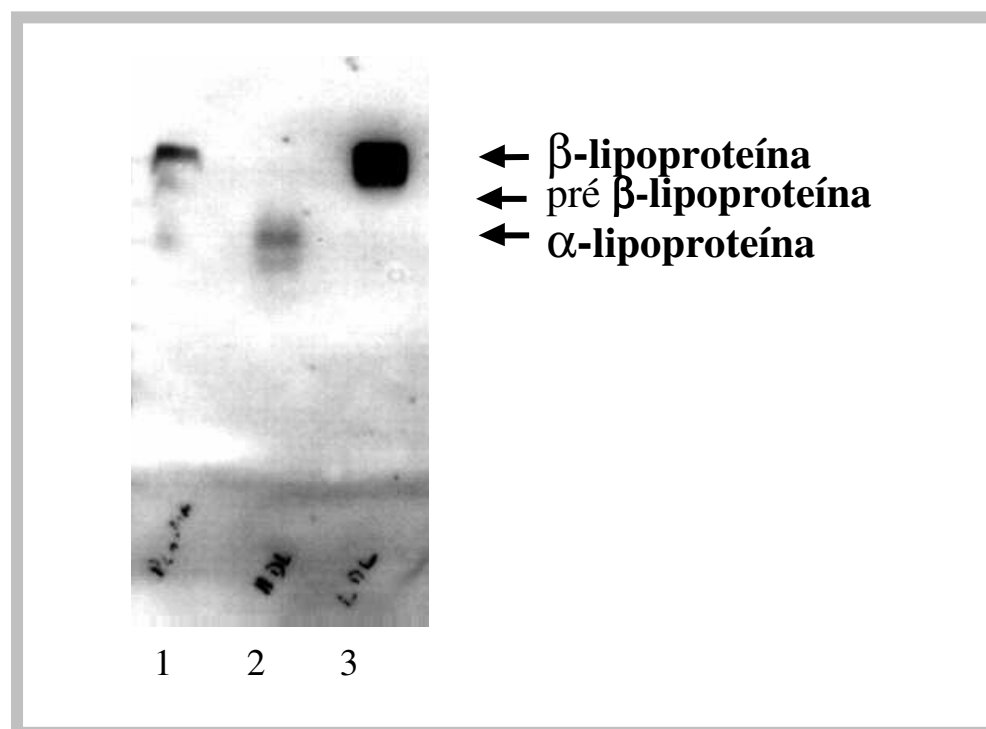


Figura 4. Eletroforese de lipoproteínas em acetato de celulose. 1: Plasma; 2: HDL; 3: LDL

Tabela 3. Média da concentração de colesterol e triacilgliceróis em plasma, LDL e HDL

Plasma e frações	Colesterol (mg/ml)	Triacilgliceróis (mg/ml)
Plasma	117,0	61,5
LDL	377,0	77,5
HDL	44,0	23,0

Foi realizada dosagem de proteína das amostras fracionadas. A tabela 4 mostra a média dos valores das proteínas em diferentes preparações. Observa-se que a concentração de proteína na HDL é 10 vezes maior do que na LDL, o que seria de esperar, visto que a maior parte

da composição da HDL é de proteínas (cerca de 50%), enquanto que a LDL contém somente 25% de proteínas. A concentração de proteínas de LDL (mg/ml) nas duas preparações foi, respectivamente, 1,06 e 1,14. Assim as frações obtidas foram colocadas em um pool.

Tabela 4. Média da concentração de proteínas totais nas preparações de LDL e HDL

Lipoproteínas	Proteínas totais (mg/ml de preparação)
LDL	6,9
HDL	142,7

## 4.2 Análises de citotoxicidade

### 4.2.1 Lipoproteína de baixa densidade (LDL)

As células de sarcoma uterino resistentes foram incubadas com diferentes concentrações de LDL, por 3 dias consecutivos, tendo como controle células de sarcoma uterino em meio sem SFB. Foi realizada a verificação da viabilidade destas células nos tempos 24, 48 e 72 horas. Os resultados das células de sarcoma uterino resistentes estão na figura 5, a qual se observou aumento na toxicidade da LDL, ficando, a viabilidade, inferior a 40% após 48 horas de incubação com as concentrações de 0,85 e 1,25mg/ml.

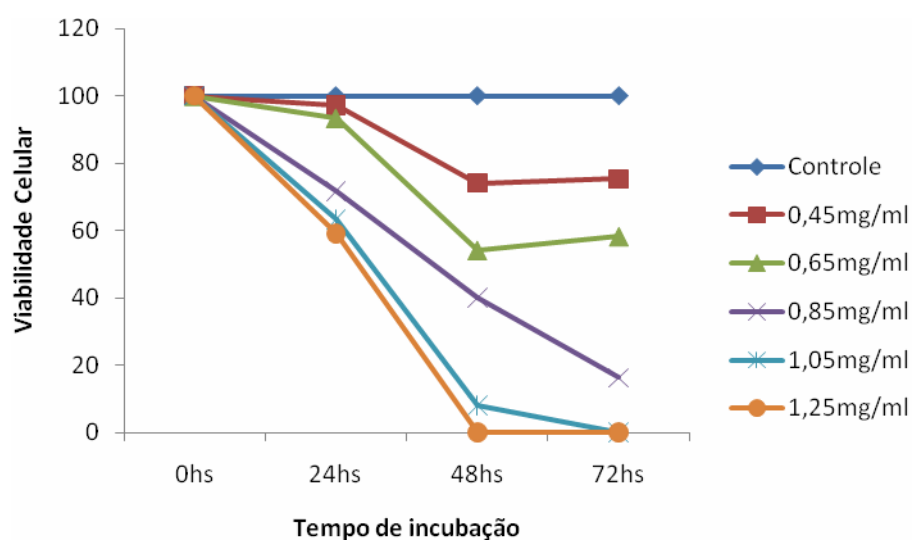


Figura 5. Curva de citotoxicidade de diferentes concentrações de LDL em células de sarcoma uterino resistente

Tabela 5. Viabilidade celular de células de sarcoma uterino resistente com diferentes concentrações de LDL

	0hs		24hs		48hs		72hs	
	%	DP	%	DP	%	DP	%	DP
Controle	100,0	0,18	100,0	0,02	100,0	0,03	100,0	0,14
0,45mg/ml	100,0	0,12	97,2	0,01	74,1	0,04	75,3	0,08
0,65mg/ml	100,0	0,60	93,4	0,04	54,1	0,07	58,2	0,08
0,85mg/ml	100,0	0,04	71,7	0,01	40,1	0,03	16,3	0,11
1,05mg/ml	100,0	0,92	63,3	0,02	8,0	0,06	0,0	0,04
1,25mg/ml	100,0	0,76	59,0	0,01	0,0	0,01	0,0	0,08

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

#### **4.2.2 Lipoproteína de alta densidade (HDL)**

Foi realizada verificação da viabilidade das células de sarcoma uterino resistente nos tempos de 24, 48 e 72 horas, variando as concentrações de HDL entre 0,45mg/ml a 1,25mg/ml. A HDL não mostrou nenhuma toxicidade para as células de sarcoma uterino resistente para as concentrações testadas, independente do tempo de incubação.

#### **4.2.3 Análise da citotoxicidade da metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD)**

As células de sarcoma uterino resistente foram incubadas com 20, 30 e 100 $\mu$ M de metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD), por 30 minutos, 1 e 2 horas. O controle foi feito com células cultivadas em meio sem soro fetal bovino. A figura e tabela 6 mostram, em porcentagem, a viabilidade celular das células tratadas com as diferentes concentrações de M $\beta$ CD. Em relação ao controle e as outras concentrações, as células tratadas com 100 $\mu$ M por 2 horas obtiveram a menor viabilidade celular.

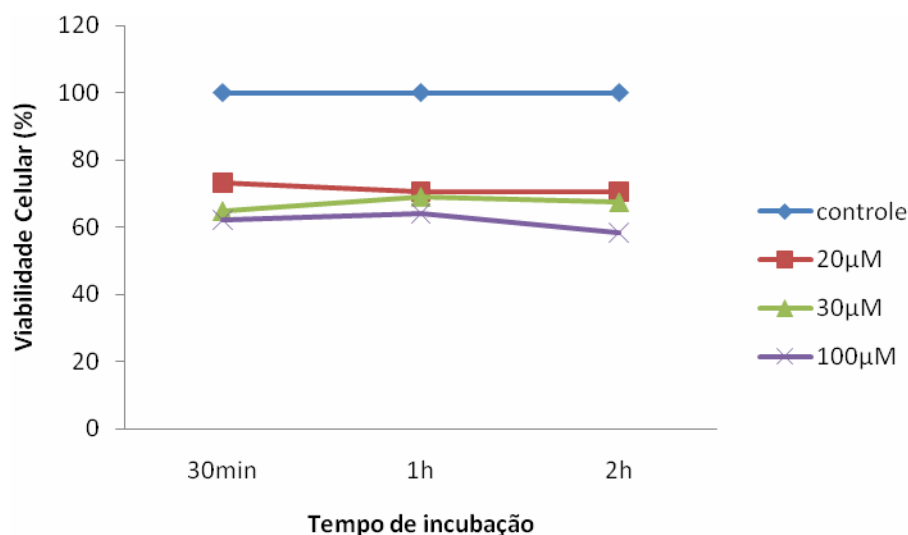


Figura 6. Curva de citotoxicidade de diferentes concentrações de metil-β-ciclodextrina em células de sarcoma uterino resistentes

Tabela 6. Viabilidade celular de células de sarcoma uterino resistentes com diferentes concentrações de metil-β-ciclodextrina

	30min		1h		2h	
	%	DP	%	DP	%	DP
controle	100	0,013	100	0,016	100	0,022
20μM	73,23	0,032	70,5	0,005	70,6	0,016
30μM	64,64	0,011	68,9	0,01	67,3	0,01
100μM	62,12	0,01	64,2	0,011	58,4	0,008

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

#### 4.2.4 Análise da citotoxicidade da sinvastatina

Para esta análise as células de sarcoma uterino resistente foram incubadas com diferentes concentrações de sinvastatina, por 3 dias consecutivos. No controle as células foram tratadas com meio sem SFB. Na

figura 7 e tabela 7 pode-se observar que as menores viabilidades em relação ao controle foram as células tratadas com as concentrações de 10 e 50 $\mu$ M ambas nos períodos de 48 e 72 horas.

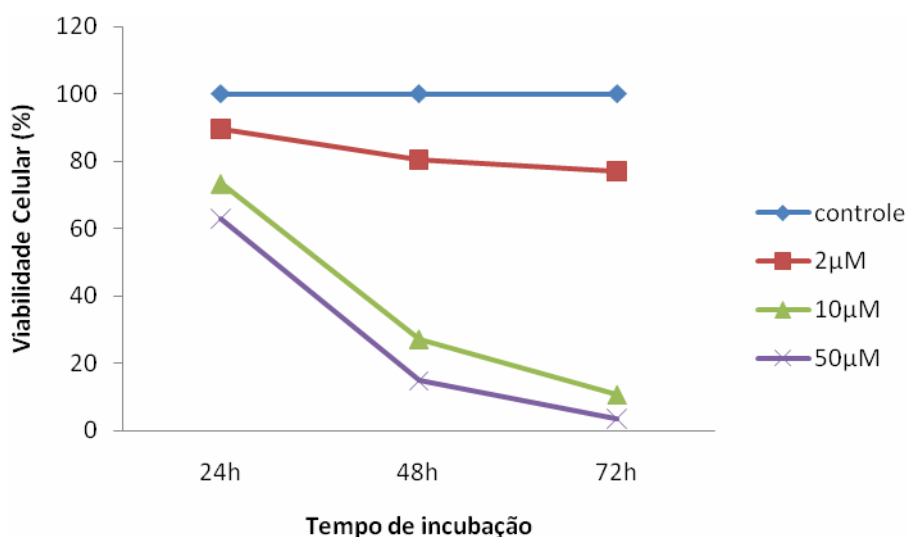


Figura 7. Curva de citotoxicidade de diferentes concentrações de sinvastatina em células de sarcoma uterino

Tabela 7. Viabilidade celular de células de sarcoma uterino resistentes com diferentes concentrações de sinvastatina

	24h		48h		72h	
	%	DP	%	DP	%	DP
controle	100	0,001	100	0,02	100	0,117
2 $\mu$ M	89,6	0,056	80,4	0,076	76,9	0,014
10 $\mu$ M	73,4	0,031	27,1	0,02	10,6	0,006
50 $\mu$ M	63	0,032	14,7	0,013	3,4	0,001

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

### 4.3. Análise da eficiência do PCR em tempo real

#### 4.3.1 MDR

Para a análise de eficiência foram realizadas diluições seriadas do RNAm das células de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina nas concentrações de 31,2, 62,5, 125, 250 e 500ng. Essas concentrações escolhidas devem-se ao fato de que a concentração de uso nos experimentos foi 125ng. As amostras foram amplificadas em duplicata. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar ou cycle threshold (Ct), onde o aumento do sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

Foi verificada a especificidade da reação de RT-PCR realizando-se a curva de dissociação. A reação foi específica para o produto de PCR analisado, mostrando apenas um pico (figura 8).

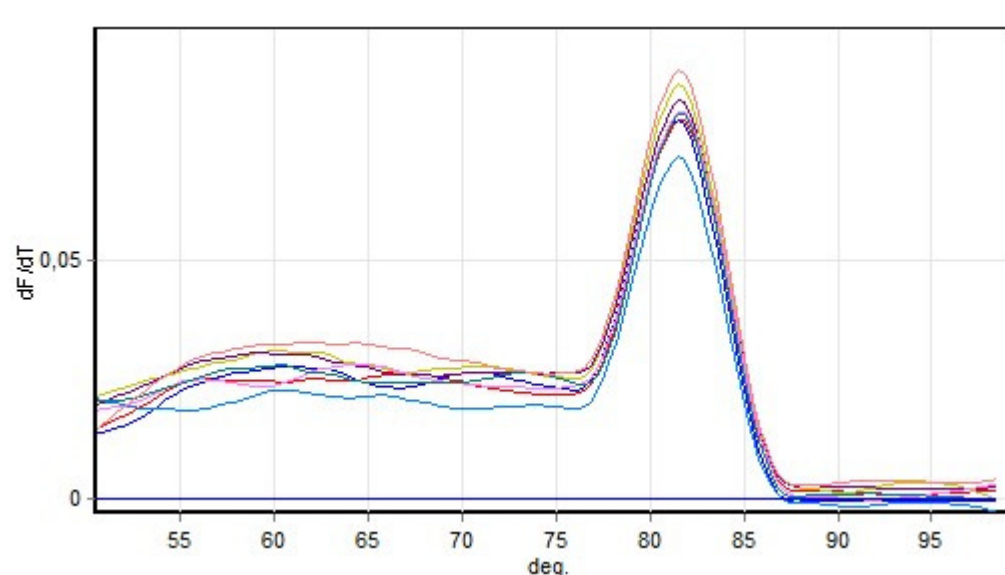


Figura 8. Curva de dissociação do gene MDR. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência



A figura 9 demonstra a regressão linear semi-log do valor do  $C_T$  em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm. A eficiência foi calculada através da fórmula  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ . Desta forma a eficiência de amplificação do gene MDR foi 102%.

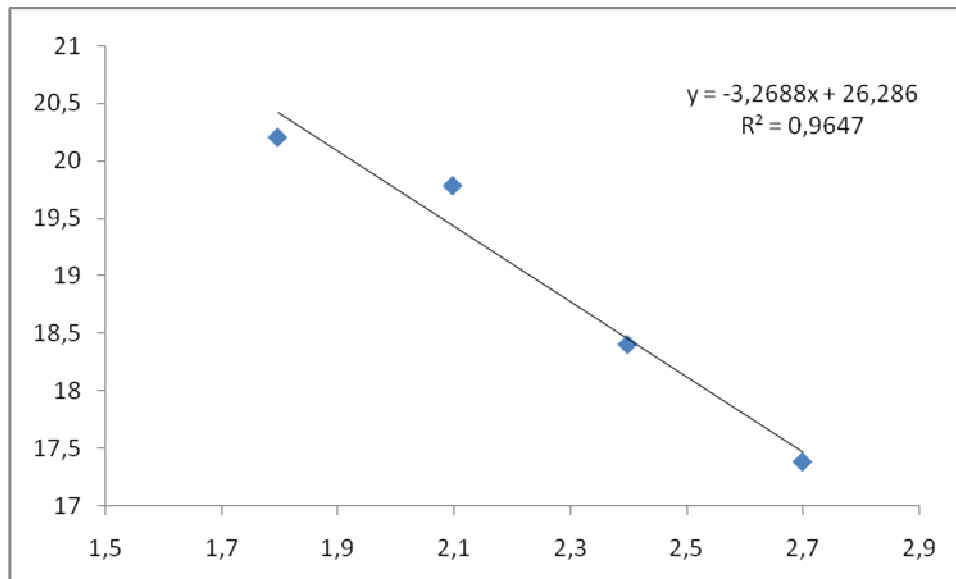


Figura 9. Regressão linear semi-log do valor do  $C_T$  em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene MDR

#### 4.3.2 LRP

Foram realizadas diluições seriadas do RNAm das células de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina nas concentrações de 31,2, 62,5, 125, 250 e 500ng. As amostras foram amplificadas em duplicata. Realizou-se a curva de dissociação e reação foi específica para o produto de PCR analisado, mostrando apenas um pico (figura 10).

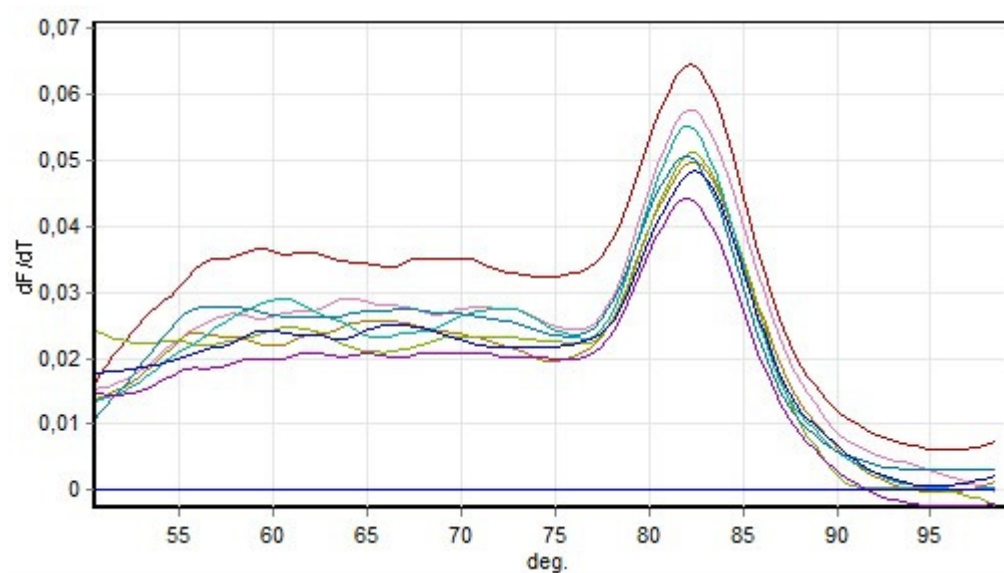


Figura 10. Curva de dissociação do gene LRP. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência

A figura 11 demonstra a regressão linear semi-log do valor do  $C_T$  em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm. A eficiência de amplificação do gene LRP foi 103%.

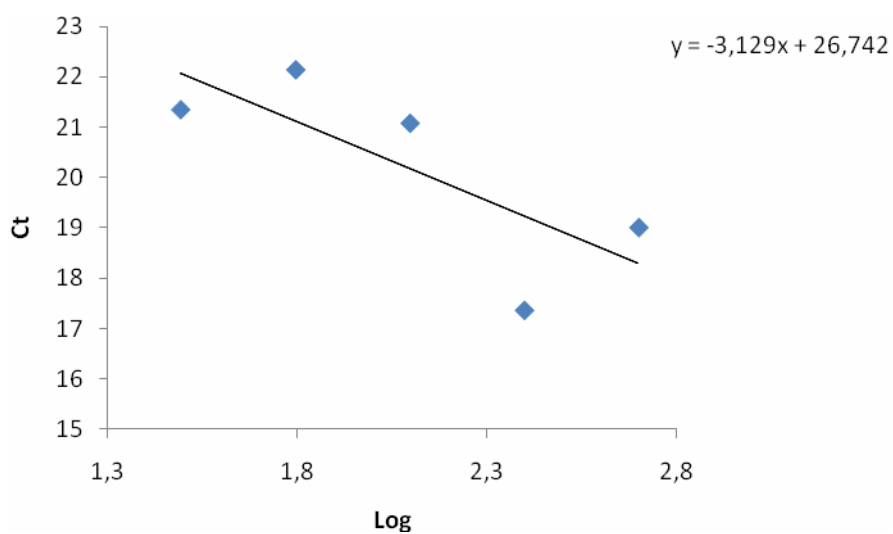


Figura 11. Regressão linear semi-log do valor do C<sub>T</sub> em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene LRP

#### 4.3.3 MRP

Realizou-se diluições seriadas do RNAm das células de sarcoma uterino resistentes à doxorubicina nas concentrações de 31,2, 62,5, 125, 250 e 500ng. As amostras foram amplificadas em duplicata.

Foi verificada a especificidade da reação de RT-PCR realizando-se a curva de dissociação. A reação foi específica para o produto de PCR analisado, mostrando apenas um pico (figura 12).

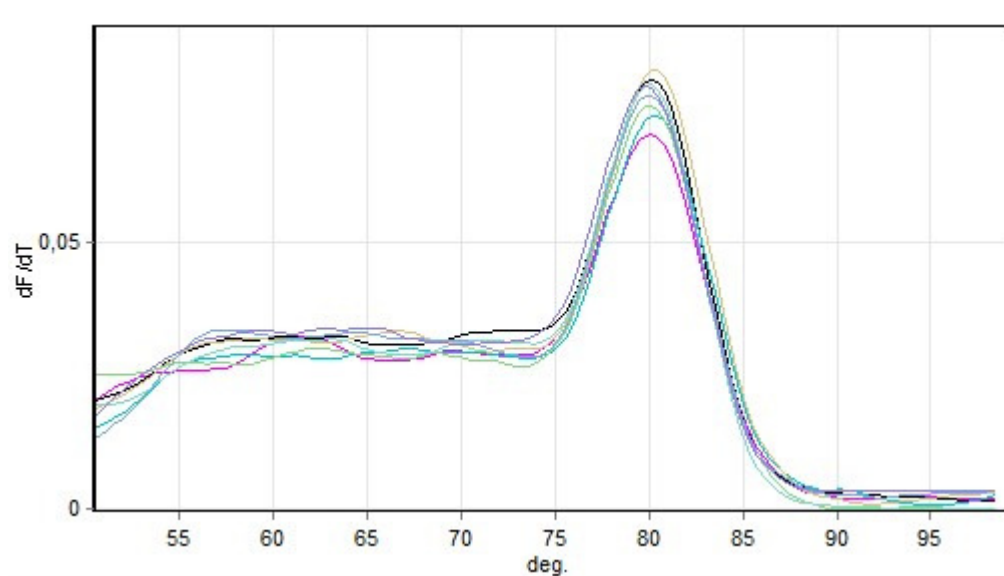


Figura 12. Curva de dissociação do gene MRP. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência

A figura 13 demonstra a regressão linear semi-log do valor do  $C_T$  em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm. A eficiência de amplificação do gene MRP foi 98%.

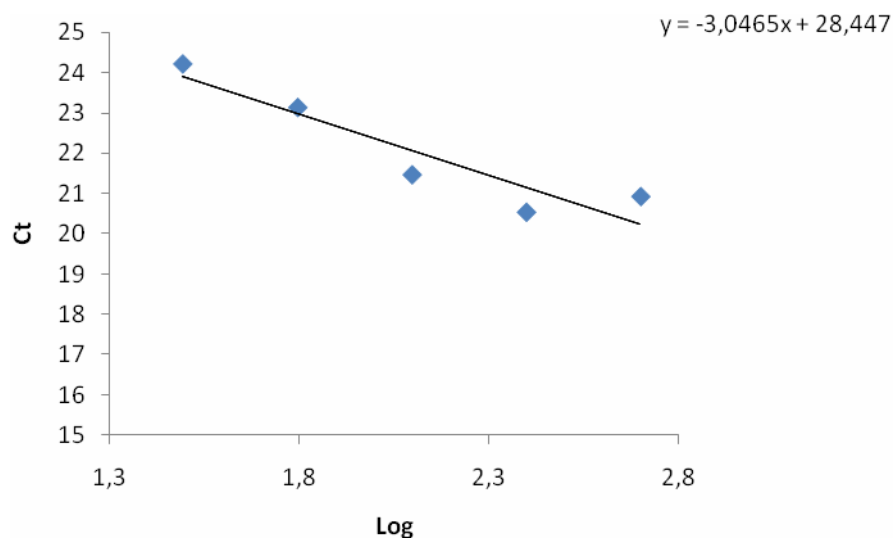


Figura 13. Regressão linear semi-log do valor do  $C_T$  em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene MRP

#### 4.3.4 $\beta_2$ -microglobulina

Foram realizadas diluições seriadas do RNAm das células de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina nas concentrações de 31,2, 62,5, 125, 250 e 500ng. As amostras foram amplificadas em duplicata. Realizou-se a curva de dissociação e a reação foi específica para o produto de PCR analisado, mostrando apenas um pico (figura 14).

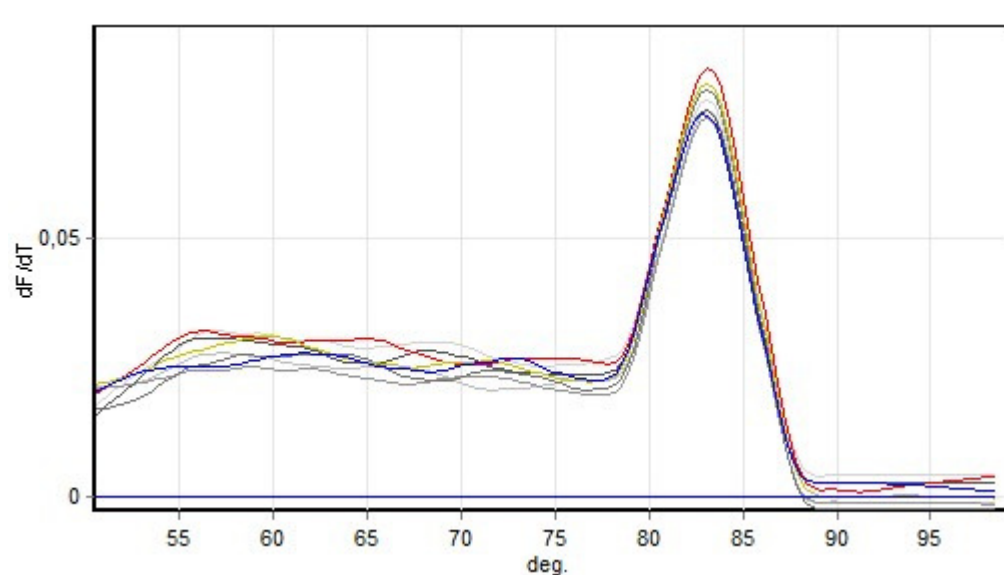


Figura 14. Curva de dissociação do gene  $\beta_2$ -microglobulina. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência

A figura 15 demonstra a regressão linear semi-log do valor do  $C_T$  em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm. A eficiência de amplificação do gene  $\beta_2$ MG foi de 90%.

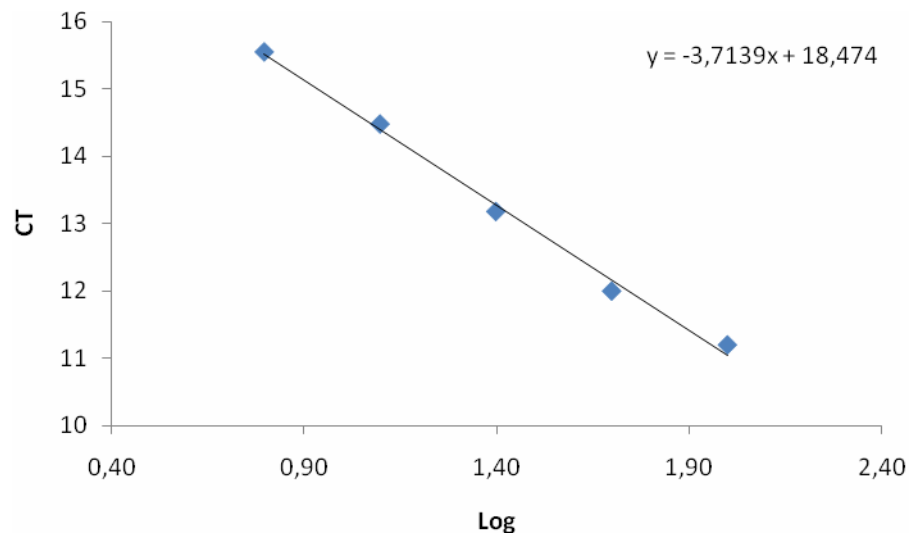


Figura 15. Regressão linear semi-log do valor do C<sub>T</sub> em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene  $\beta_2$ MG

#### **4.4 Expressão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina cultivadas sob influência de LDL, HDL, metil- $\beta$ -ciclodextrina, sinvastatina e ausência de soro fetal bovino**

##### **4.4.1 LDL**

As células de sarcoma uterino resistentes foram cultivadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas incubadas por 48 horas.

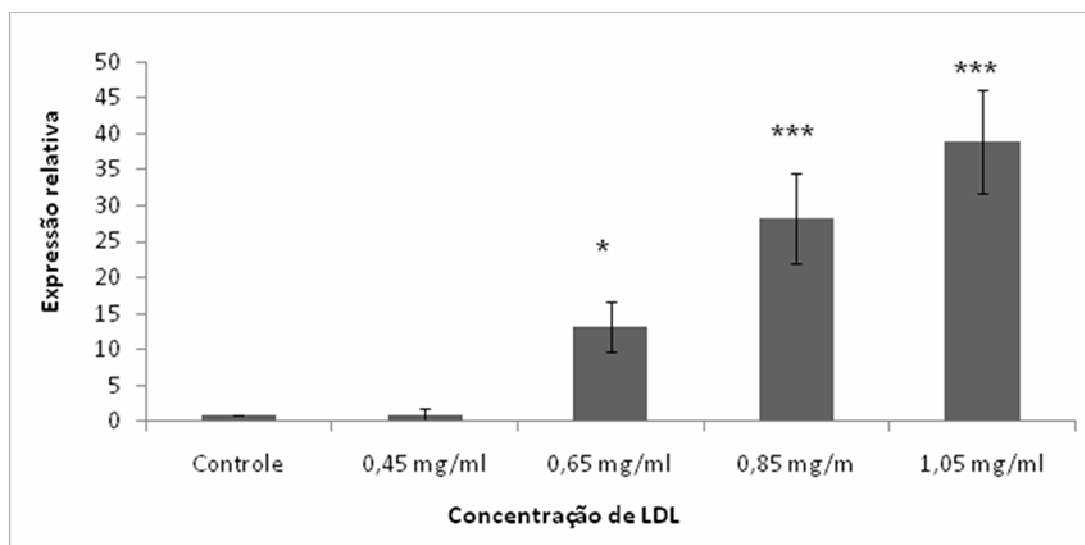


Figura 16. Expressão relativa do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR. \*( $p < 0,05$ ); \*\*\*( $p < 0,001$ )

Tabela 8. Expressão relativa e desvio padrão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR

LDL	Expressão relativa	Desvio padrão
Controle	1	0
0,45 mg/ml	0,99	0,81
0,65 mg/ml	13,14	3,52
0,85 mg/ml	28,25	6,34
1,05 mg/ml	38,96	7,14

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

Observou-se, na figura 16 e tabela 8, que o aumento da concentração de LDL levou ao aumento da expressão do gene MDR1. Em relação ao controle a expressão do gene MDR1 teve aumento significativo nas células tratadas com as concentrações de 0,65mg/ml ( $p < 0,05$ ), 0,85 mg/ml ( $p < 0,001$ ) e 1,05mg/ml ( $p < 0,001$ ).

#### 4.4.2 HDL

Na figura 17 e tabela 9 as células foram incubadas com diferentes concentrações de HDL. Em relação ao controle as concentrações de 0,45 mg/ml e 0,65 mg/ml apresentaram aumento da expressão do gene MDR1, sendo que a concentração de 0,65mg/ml ( $p<0,01$ ) obteve aumento significativo da expressão. No entanto, também em relação ao controle, as concentrações de 0,85mg/ml ( $p<0,001$ ), 1,05mg/ml ( $p<0,001$ ) e 1,25mg/ml ( $p<0,001$ ) de HDL apresentaram significativa diminuição da expressão do gene MDR1.

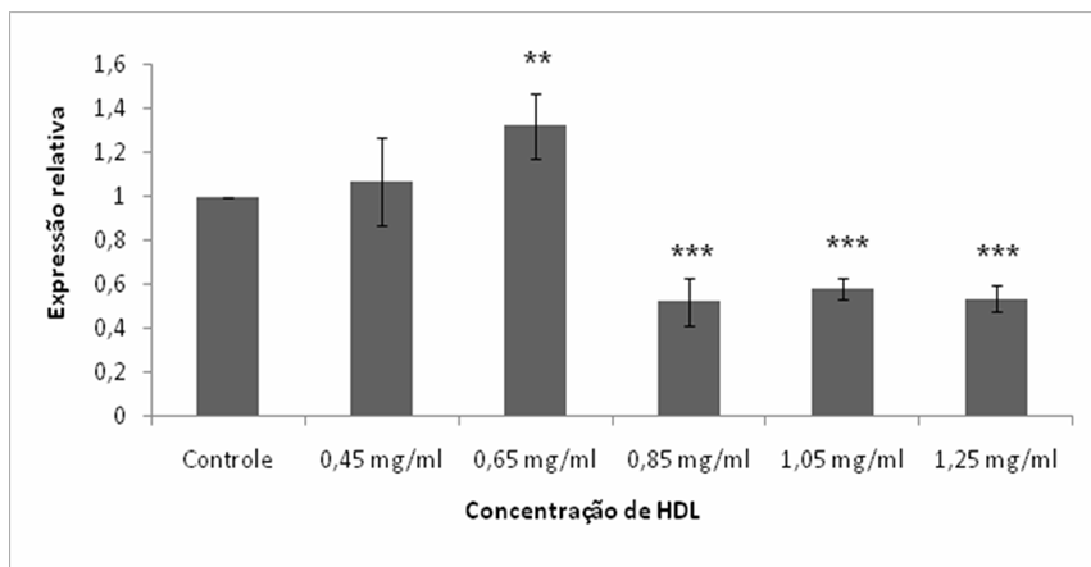


Figura 17. Expressão relativa do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR. \*\*( $p<0,01$ ); \*\*\*( $p<0,001$ )



Tabela 9. Expressão relativa e desvio padrão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR

HDL	Expressão relativa	Desvio padrão
Controle	1	0
0,45 mg/ml	1,07	0,20
0,65 mg/ml	1,32	0,15
0,85 mg/ml	0,52	0,11
1,05 mg/ml	0,58	0,05
1,25 mg/ml	0,54	0,06

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

#### 4.4.3 Ausência de soro fetal bovino

A figura 18 e tabela 10 mostram experimento realizado com células de sarcoma uterino resistentes à doxorubicina, incubadas com meio sem soro fetal bovino pelo período de 24 a 72 horas. Como controle utilizou-se a mesma linhagem celular, porém estas células foram incubadas com meio acrescentado de 10% de SFB. Desta forma, pode-se observar que em todos os tempos testados houve aumento da expressão do gene MDR1. Porém, o aumento mais significativo foi no carenciamento de 24 horas ( $p < 0,001$ ). Em 48 horas ( $p < 0,05$ ) também houve aumento da expressão deste gene.

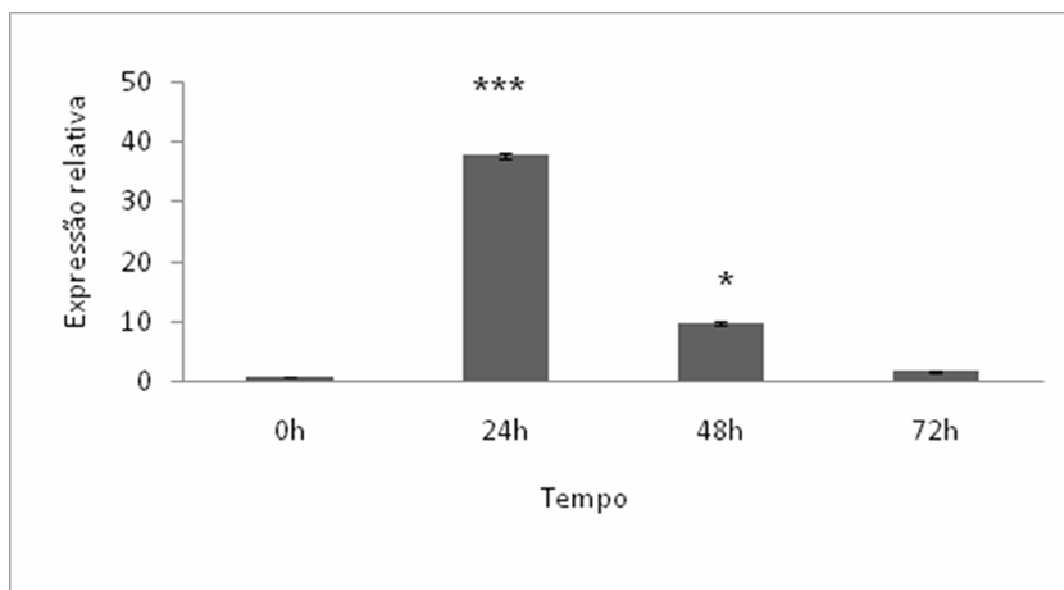


Figura 18. Expressão relativa do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, cultivadas com meio sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR. \*( $p < 0,05$ ); \*\*\*( $p < 0,001$ )

Tabela 10. Expressão relativa e desvio padrão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, cultivadas com meio sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR

Tempo	Expressão relativa	Desvio padrão
0h	1	0,00
24h	37,91	0,45
48h	9,86	0,22
72h	1,79	0,22

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

#### 4.4.4 Metil- $\beta$ -ciclodextrina

Neste experimento as células foram tratadas com 20, 30 e 100 $\mu$ M de metil- $\beta$ -ciclodextrina, por 30, 60 e 120 minutos.

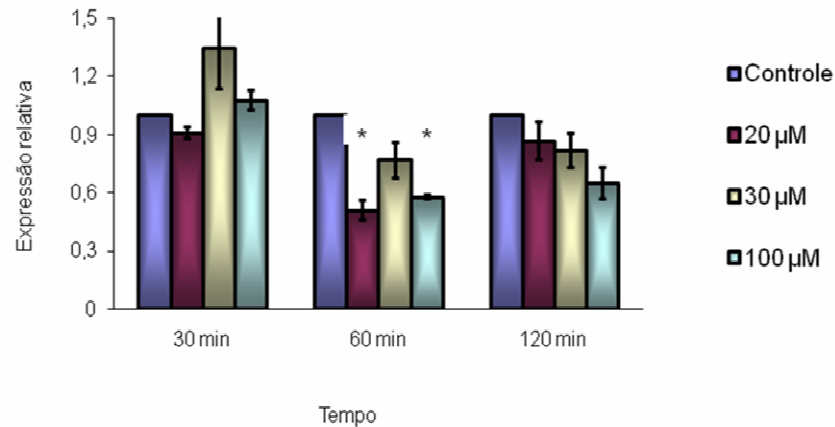


Figura 19. Expressão relativa do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextrina. \*( $p < 0,05$ )

A figura 19 e tabela 11 mostram que após 30 minutos ocorreu, em relação ao controle, aumento da expressão do gene MDR1 nas concentrações de 30 e 100  $\mu$ M, com uma pequena diminuição da expressão na concentração de 20  $\mu$ M. Em 60 e 120 minutos todas as concentrações de M $\beta$ CD utilizadas apresentaram, em relação ao controle, diminuição da expressão gênica. Porém, as concentrações de 20 e 100  $\mu$ M tiveram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da expressão gênica em relação ao controle.

Tabela 11. Expressão relativa e desvio padrão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextrina

	30 minutos		60 minutos		120 minutos	
	ER	DP	ER	DP	ER	DP
Controle	1	0	1	0	1	0
20 $\mu$ M	0,91	0,03	0,51	0,05	0,87	0,1
30 $\mu$ M	1,35	0,21	0,77	0,09	0,82	0,09
100 $\mu$ M	1,08	0,05	0,58	0,01	0,65	0,08

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. ER: expressão relativa; DP: desvio padrão

#### 4.4.5 Sinvastatina

Foi realizado um experimento com células de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina, cultivadas com diferentes concentrações de sinvastatina pelo período de 24 a 72 horas.

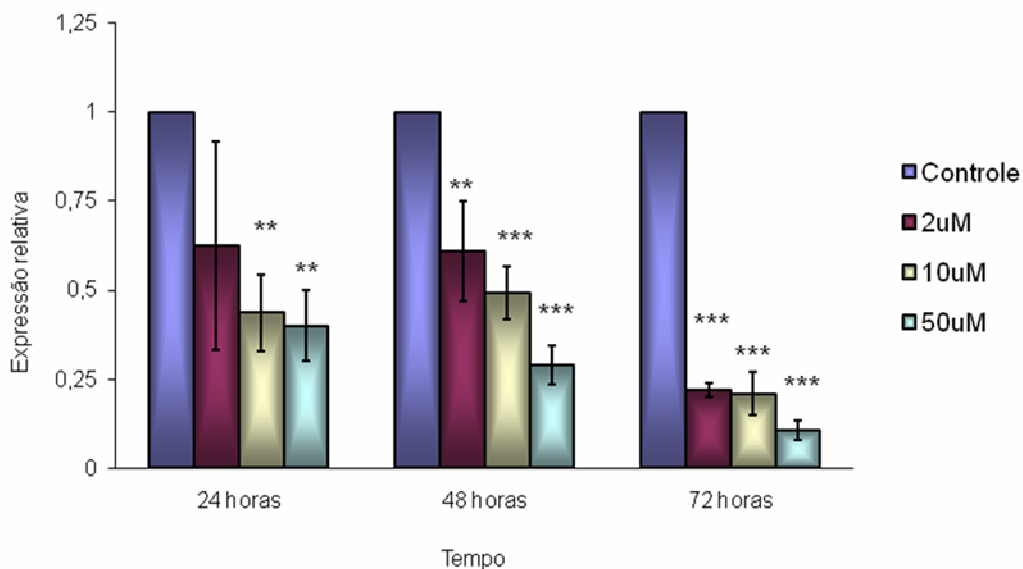


Figura 20. Expressão relativa do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistente, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina. \*\*( $p < 0,01$ ); \*\*\*( $p < 0,001$ )

Na figura 20 e tabela 12 observa-se, em relação ao controle, diminuição da expressão do gene MDR1 no decorrer do tempo. Em 24 horas as concentrações de 10 $\mu$ M ( $p < 0,01$ ) e 50 $\mu$ M ( $p < 0,01$ ) tiveram diminuição significativa da expressão gênica. No período de 48 horas, esta diminuição da expressão em relação ao controle também foi significativa nas concentrações de 2 $\mu$ M ( $p < 0,01$ ), 10 $\mu$ M ( $p < 0,001$ ) e 50 $\mu$ M ( $p < 0,001$ ). Os tratamentos com as concentrações de 2, 10 e 50 $\mu$ M de sinvastatina no período de 72 horas, obtiveram a menor expressão ( $p < 0,001$ ) do gene MDR1 quando comparados ao controle e aos outros períodos de tempo.

Tabela 12. Expressão relativa e desvio padrão do gene MDR1 em células de sarcoma uterino resistente, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina

	24 horas		48 horas		72 horas	
	ER	DP	ER	DP	ER	DP
Controle	1	0	1,00	0,00	1	0
2 $\mu$ M	0,63	0,29	0,61	0,14	0,22	0,02
10 $\mu$ M	0,44	0,11	0,49	0,08	0,21	0,06
50 $\mu$ M	0,40	0,10	0,29	0,06	0,11	0,03

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. ER: Expressão relativa; DP: Desvio padrão

#### 4.5 Expressão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina cultivadas sob influência de LDL, HDL, metil- $\beta$ -ciclodextrina, sinvastatina e ausência de soro fetal bovino

##### 4.5.1 LDL

As células de sarcoma uterino resistentes foram incubadas com diferentes concentrações de LDL, por 48 horas. Como controle utilizou-se células incubadas apenas com meio sem SFB.

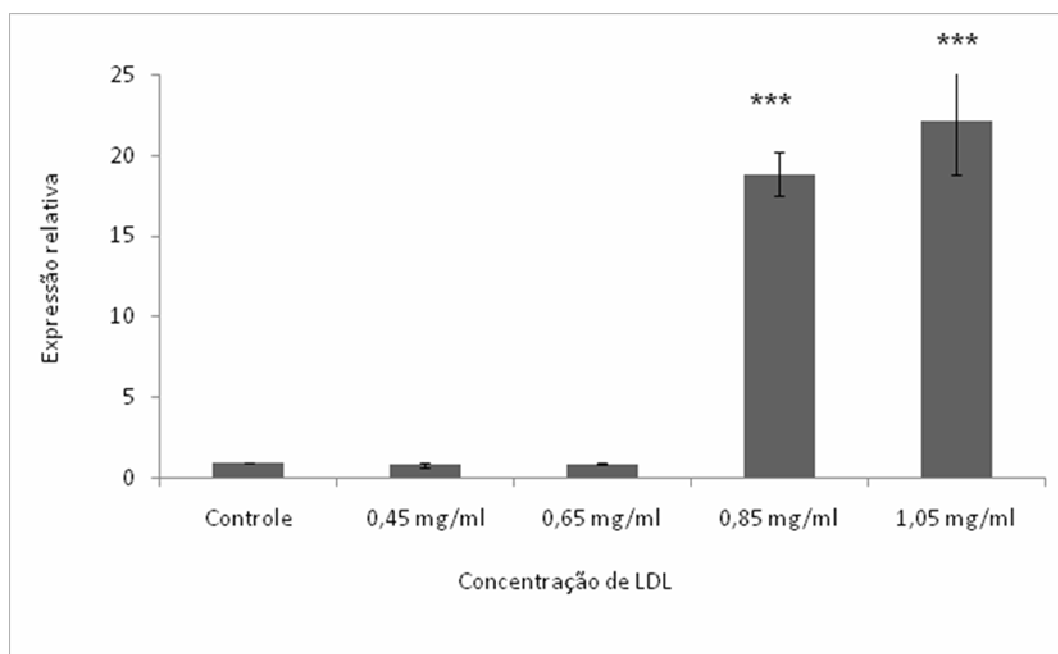


Figura 21. Expressão relativa do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR. \*\*\*( $p < 0,001$ )

A figura 21 e tabela 13, mostram aumento da expressão do gene LRP, em células tratadas com as concentrações de 0,85mg/ml ( $p < 0,001$ ) e 1.05mg/ml ( $p < 0,001$ ) de LDL, quando comparadas ao controle e as concentrações de 0,45mg/ml e 0,65mg/ml.

Tabela 13. Expressão relativa e desvio padrão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR

LDL	Expressão relativa	Desvio Padrão
Controle	1	0,00
0,45 mg/ml	0,82	0,13
0,65 mg/ml	0,91	0,10
0,85 mg/ml	18,86	1,35
1,05 mg/ml	22,12	3,32

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

#### 4.5.2 HDL

Neste caso, as células foram incubadas com diferentes concentrações de HDL, por 48 horas, como controle foram cultivadas células sem SFB.

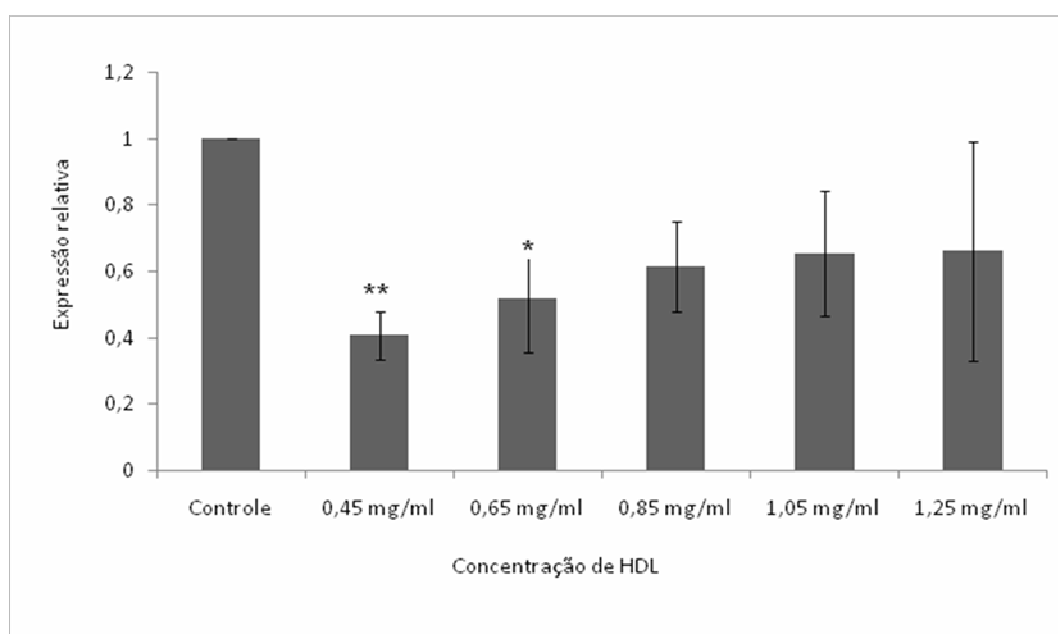


Figura 22. Expressão relativa do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR. \*( $p < 0,05$ ); \*\*( $p < 0,01$ )

Observa-se, na figura 22 e tabela 14, que não houve aumento da expressão do gene LRP em todas as concentrações de HDL administradas, mas, a diminuição desta expressão, em relação ao controle foi elevada. Pois, as concentrações de 0,45mg/ml ( $p < 0,01$ ) e 0,65mg/ml ( $p < 0,05$ ) de HDL tiveram diminuição significativa na expressão do gene LRP.

Tabela 14. Expressão relativa e desvio padrão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR

HDL	Expressão relativa	Desvio Padrão
Controle	1	0
0,45 mg/ml	0,41	0,07
0,65 mg/ml	0,52	0,16
0,85 mg/ml	0,62	0,13
1,05 mg/ml	0,66	0,19
1,25 mg/ml	0,66	0,33

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

#### 4.5.3 Ausência de soro fetal bovino

Na figura 23 e na tabela 15 as células cultivadas com meio sem soro fetal bovino apresentaram aumento da expressão do gene LRP no período de 24 horas quando comparado ao controle, o qual as células receberam 10% de SFB. As expressões diminuíram em 48 e 72 horas em relação ao controle. Tanto o aumento na expressão de 24 horas quanto à diminuição da expressão do gene LRP em 48 e 72 horas, não foi significativa.



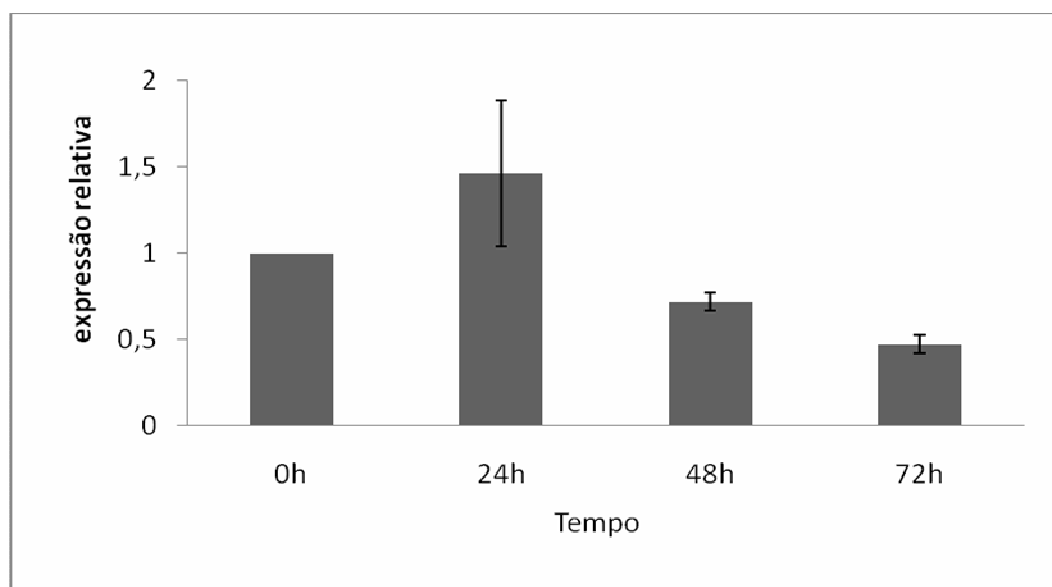


Figura 23. Expressão relativa do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes cultivadas com meio sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR

Tabela 15. Expressão relativa e desvio padrão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes cultivadas com meio sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR.

Tempo	Expressão relativa	Desvio Padrão
0h	1	0,00
24h	1,46	0,43
48h	0,72	0,06
72h	0,47	0,06

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

#### 4.5.4 Metil- $\beta$ -ciclodextrina

As células foram tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextrina, por 3 períodos de tempo. As células controle foram incubadas apenas com meio sem SFB.

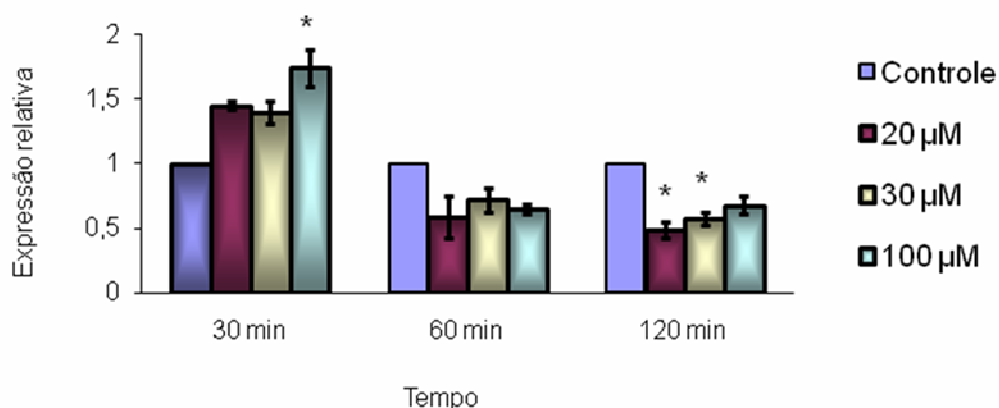


Figura 24. Expressão relativa do gene LRP em células de sarcoma uterino resistente, tratadas com diferentes concentrações de metil-β-ciclodextrina.\*( $p < 0,05$ )

A figura 24 e tabela 16 mostram, em relação ao controle, aumento da expressão do gene LRP nas concentrações 20, 30 e 100μM de MβCD administradas durante 30 minutos. Sendo que na concentração de 100μM este aumento foi significativo ( $p < 0,05$ ). Nos outros períodos de tempo a expressão gênica diminuiu quando comparadas ao controle; esta diminuição também foi significativa nas concentrações de 20 e 30μM ( $p < 0,05$ ) no período de 120 minutos.

Tabela 16. Expressão relativa e desvio padrão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de metil-β-ciclodextrina.

	30 minutos		60 minutos		120 minutos	
	ER	DP	ER	DP	ER	DP
Controle	1	0	1	0	1	0
20 μM	1,45	0,03	0,59	0,16	0,49	0,06
30 μM	1,4	0,09	0,72	0,09	0,58	0,05
100 μM	1,74	0,14	0,65	0,04	0,68	0,07

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. ER: Expressão relativa; DP: Desvio padrão

#### 4.5.5 Sinvastatina

As células foram tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina, por 24 a 72 horas, sendo que o controle foi incubado com células em meio sem SFB.

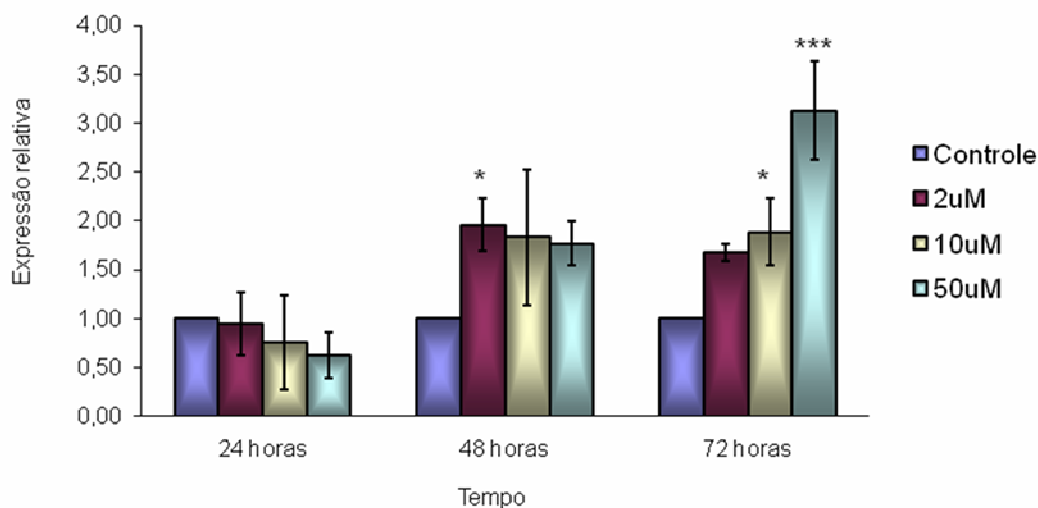


Figura 25. Expressão relativa do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina. \*( $p < 0,05$ ); \*\*\*( $p < 0,001$ )

Observa-se na figura 25 e tabela 17 que em 24 horas houve um decréscimo da expressão do gene LRP em todas as concentrações de sinvastatina quando comparadas ao controle. Nos tratamentos de 48 e 72 horas observou-se aumento na expressão deste mesmo gene quando comparados ao controle e ao experimento de 24 horas. Em 48 horas a concentração de 2µM ( $p < 0,05$ ) de sinvastatina e, em 72 horas as concentrações de 10µM ( $p < 0,05$ ) e 50µM ( $p < 0,001$ ), tiveram aumento significativo na expressão do gene LRP.

Tabela 17. Expressão relativa e desvio padrão do gene LRP em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina

	24 horas		48 horas		72 horas	
	ER	DP	ER	DP	ER	DP
Controle	1,00	0	1	0	1	0
2 $\mu$ M	0,94	0,32	1,96	0,27	1,67	0,09
10 $\mu$ M	0,75	0,48	1,83	0,70	1,89	0,34
50 $\mu$ M	0,62	0,24	1,77	0,23	3,13	0,50

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. ER: Expressão relativa; DP: Desvio padrão

#### **4.6 Expressão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina cultivadas sob influência de LDL, HDL, metil- $\beta$ -ciclodextrina, sinvastatina e ausência de soro fetal bovino**

##### **4.6.1 LDL e HDL**

Neste experimento as células de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina, foram incubadas com diferentes concentrações de LDL e HDL plasmáticas, por 48 horas. As células controles foram cultivadas com meio sem SFB.

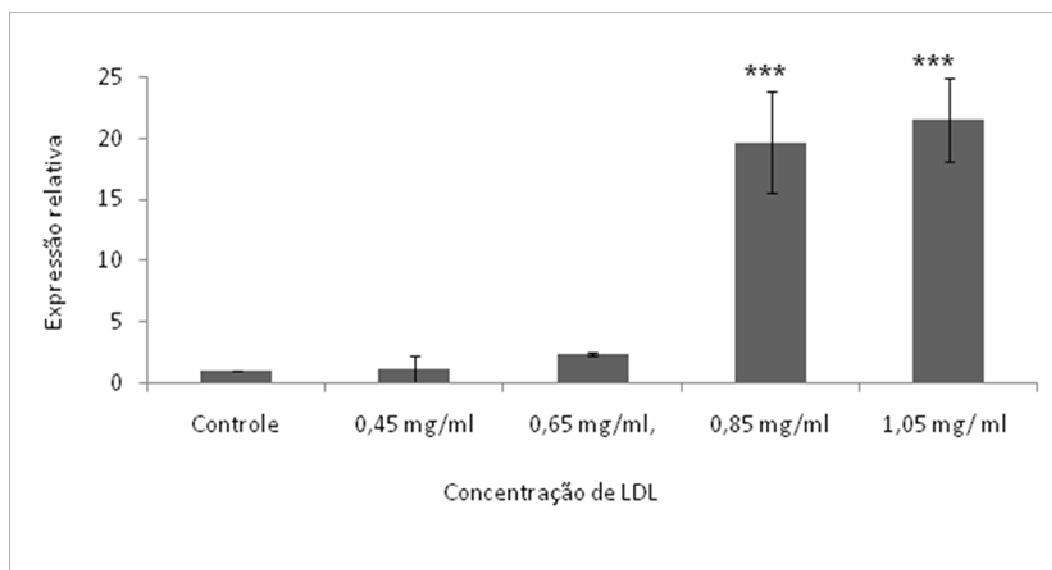


Figura 26. Expressão relativa do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR. \*\*\*( $p < 0,001$ )

A figura 26 e tabela 18 mostram, em relação ao controle, aumento da expressão do gene MRP1 nas células tratadas com as concentrações de 0,65mg/dl, 0,85mg/dl e 1,05mg/ml de LDL. As concentrações de 0,85mg/dl ( $p < 0,001$ ) e 1,05mg/ml ( $p < 0,001$ ) de LDL obtiveram maior aumento da expressão gênica em relação ao controle.

Tabela 18. Expressão relativa e desvio padrão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de LDL plasmáticas. Análise por real time PCR

LDL	Expressão relativa	Desvio padrão
Controle	1	0
0,45 mg/ml	1,09	1,16
0,65 mg/ml	2,33	0,12
0,85 mg/ml	19,69	4,18
1,05 mg/ml	21,60	3,40

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

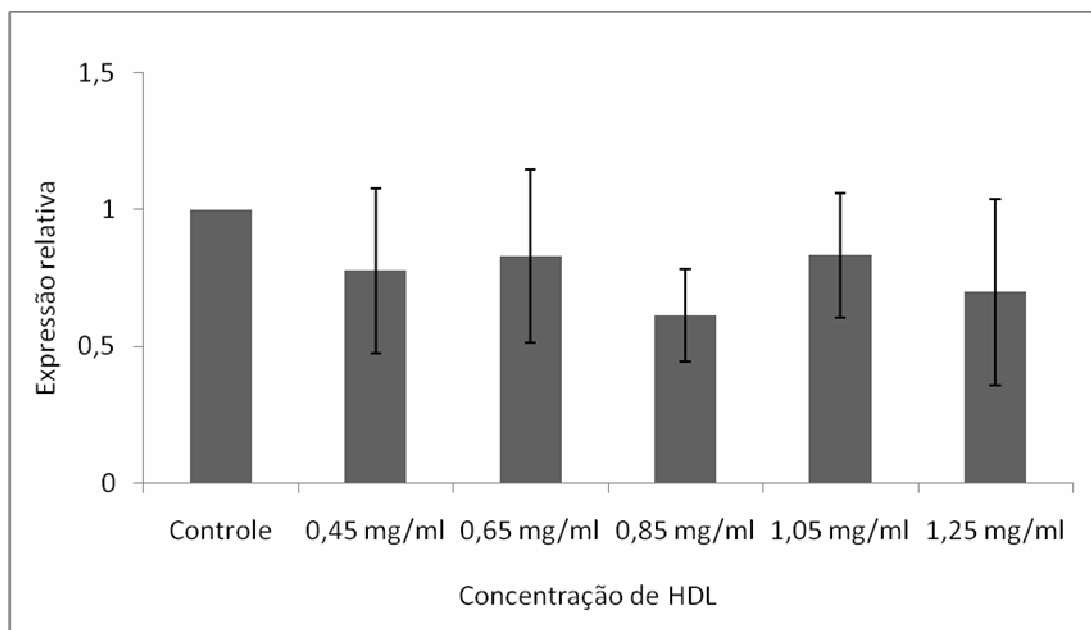


Figura 27. Expressão relativa do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR

Na figura 27 e tabela 19, as células cultivadas com diferentes concentrações de HDL apresentaram diminuição da expressão do gene MRP1 em relação ao controle. No entanto, esta diminuição não foi significativa.

Tabela 19. Expressão relativa e desvio padrão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de HDL plasmáticas. Análise por real time PCR

HDL	Expressão relativa	Desvio padrão
Controle	1	0
0,45 mg/ml	0,78	0,30
0,65 mg/ml	0,83	0,32
0,85 mg/ml	0,61	0,17
1,05 mg/ml	0,83	0,23
1,25 mg/ml	0,70	0,34

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

#### 4.6.2 Ausência de soro fetal bovino

A figura 28 e tabela 20 mostram, em relação ao controle, elevado aumento da expressão do gene MRP1 em células cultivadas com meio sem SFB. Em 24 horas ( $p < 0,01$ ) e 48 horas ( $p < 0,01$ ) o aumento da expressão é maior que o controle (meio com 10% SFB) e o período de 72 horas ( $p < 0,05$ ).

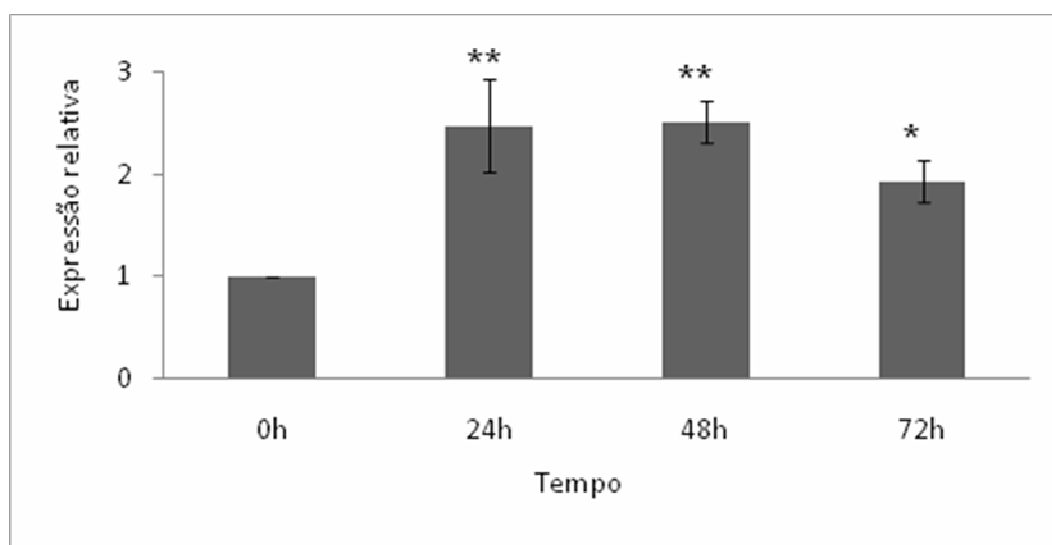


Figura 28. Expressão relativa do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes cultivadas com meio sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR. \*( $p < 0,05$ ); \*\*( $p < 0,01$ )

Tabela 20. Expressão relativa e desvio padrão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, cultivadas com meio sem soro fetal bovino, por 24, 48 e 72 horas. Análise por real time PCR

Tempo	Expressão relativa	Desvio padrão
0h	1	0
24h	2,5	0,5
48h	2,5	0,2
72h	1,9	0,2

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos

#### 4.6.3 Metil- $\beta$ -ciclodextrina

Na figura 29 e tabela 21 houve aumento da expressão do gene MRP1, em relação ao controle, após 30 minutos nas concentrações de 20 e 100 $\mu$ M de M $\beta$ CD. Nos períodos seguintes, pode-se observar diminuição da expressão deste gene em relação ao controle.

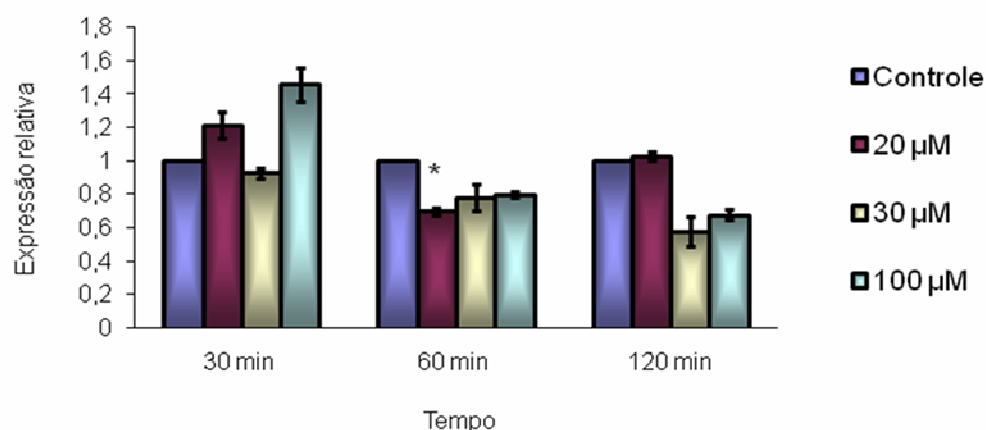


Figura 29. Expressão relativa do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextrina. \*( $p < 0,05$ )

Tabela 21. Expressão relativa e desvio padrão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de metil- $\beta$ -ciclodextrina

	30 minutos		60 minutos		120 minutos	
	ER	DP	ER	DP	ER	DP
Controle	1	0	1	0	1	0
20 $\mu$ M	1,22	0,08	0,7	0,02	1,03	0,03
30 $\mu$ M	0,93	0,03	0,78	0,08	0,58	0,09
100 $\mu$ M	1,46	0,1	0,8	0,02	0,68	0,03

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. ER: Expressão relativa; DP: Desvio padrão



#### 4.6.4 Sinvastatina

Observa-se na figura 30, que as células tratadas com sinvastatina apresentaram aumento da expressão do gene MRP1 em relação ao controle no período de 48 e 72 horas. Em 48 horas este aumento foi significativo nas concentrações de 2 $\mu$ M ( $p < 0,01$ ) e 50 $\mu$ M ( $p < 0,01$ ) de sinvastatina. No período de 72 horas as concentrações de 10 $\mu$ M ( $p < 0,01$ ) e 50 $\mu$ M ( $p < 0,0001$ ) de sinvastatina tiveram aumento significativo na expressão do gene MRP1. Em 24 horas houve pequeno aumento da expressão deste gene, em relação ao controle, apenas na concentração de 2 $\mu$ M; neste mesmo período as concentrações de 10 $\mu$ M e 50 $\mu$ M apresentaram diminuição na expressão do gene MRP1, mas, não foi significativo.

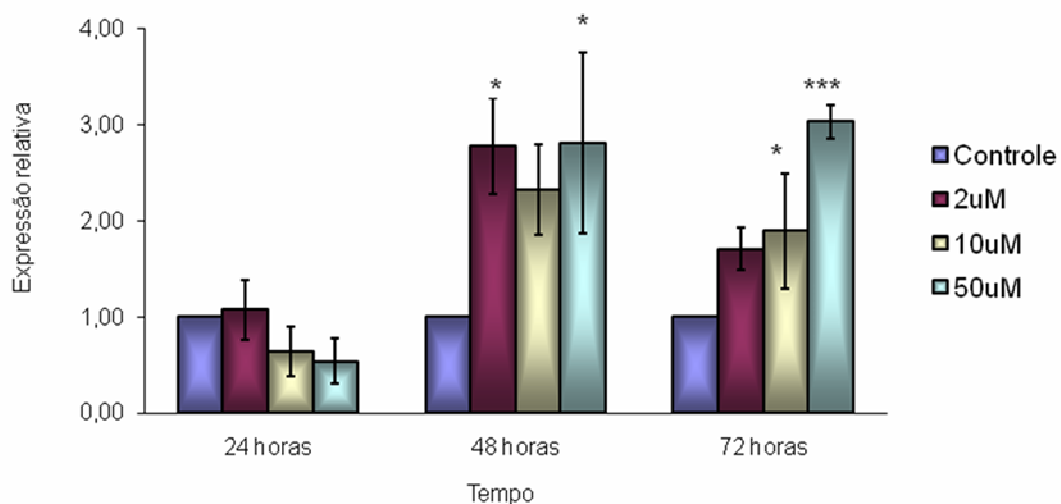


Figura 30. Expressão relativa do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina. \* ( $p < 0,05$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ )

Tabela 22. Expressão relativa e desvio padrão do gene MRP1 em células de sarcoma uterino resistentes, tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina

	24 horas		48 horas		72 horas	
	ER	DP	ER	DP	ER	DP
Controle	1,00	0	1	0	1	0
2 $\mu$ M	1,07	0,31	2,78	0,50	1,71	0,21
10 $\mu$ M	0,63	0,26	2,33	0,48	1,89	0,60
50 $\mu$ M	0,54	0,23	2,81	0,94	3,03	0,18

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. ER: Expressão relativa; DP: Desvio padrão

#### 4.7 Análise da expressão da proteína P-gp

Neste experimento foi realizada a análise da proteína MDR através do uso de anticorpo monoclonal anti-Pgp. Este anticorpo foi incubado em células de sarcoma uterino resistente à doxorrubicina, as quais foram incubadas anteriormente por 48 horas com duas concentrações de LDL e HDL.

Independente do tratamento (LDL ou HDL) e da concentração (0,45 e 0,85mg/ml) utilizada observou-se aumento significativo da expressão da proteína P-gp em relação ao controle. Analisando somente as diferentes concentrações não se observou diferença estatística.

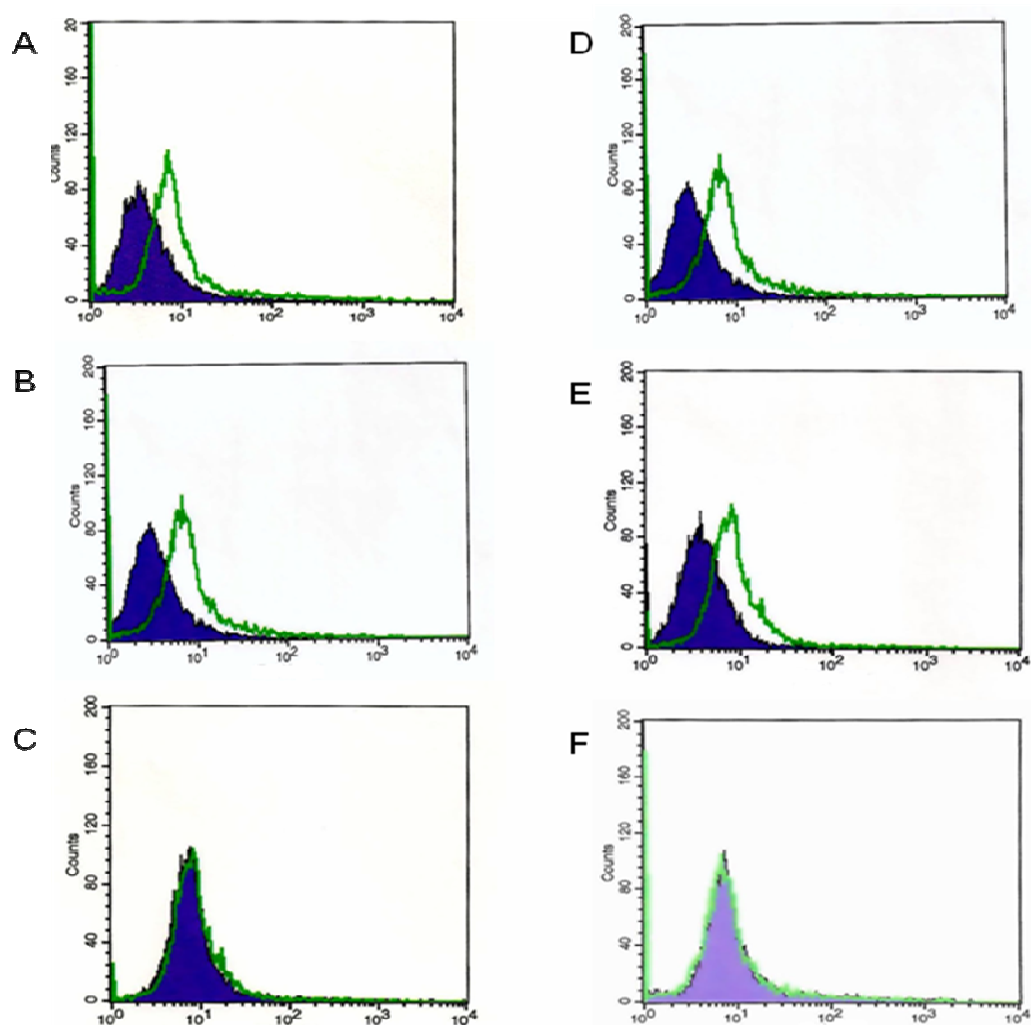


Figura 31. Análise de citometria de fluxo das células de sarcoma uterino resistentes à doxorubicina. (A) Histograma (azul) apresentando a intensidade média de fluorescência das células controles e histograma (verde) a intensidade média de fluorescência das células tratadas com LDL 0,45mg/ml; (B) Histograma (azul) apresentando a intensidade média de fluorescência das células controles e histograma (verde) a intensidade média de fluorescência das células tratadas com LDL 0,85mg/ml; (C) Histograma (azul) apresentando a intensidade média de fluorescência das células tratadas com LDL 0,45mg/ml e histograma (verde) a intensidade média de fluorescência das células tratadas com LDL 0,85mg/ml; (D) Histograma (azul) apresentando a intensidade média de fluorescência das células controles e histograma (verde) a intensidade média de fluorescência das células tratadas com HDL 0,45mg/ml; (E) Histograma (azul) apresentando a intensidade média de fluorescência das células controles e histograma (verde) a intensidade média de fluorescência das células tratadas com HDL 0,85mg/ml; (F) Histograma (azul) apresentando a intensidade média de fluorescência das células tratadas com HDL 0,45mg/ml e histograma (verde) a intensidade média de fluorescência das células tratadas com HDL 0,85mg/ml

## **5. Discussão**

A resistência a drogas é o maior obstáculo no sucesso do tratamento do câncer. Essa resistência pode estar presente antes do início do tratamento ou pode se desenvolver durante a quimioterapia (Hugh *et al.*, 2006). O fenótipo de resistência a múltiplas drogas, observado em células tumorais, é frequentemente associado com alterações de permeabilidade na membrana plasmática a agentes anticancer (Rothnie *et al.*, 2001). A P-glicoproteína (P-gp) codificada pelo gene MDR1, confere este tipo de resistência em várias linhagens de células tumorais por agir como uma bomba de efluxo de droga dependente de ATP; desta forma, promove a diminuição do acúmulo intracelular de agentes quimioterápicos (Rothnie *et al.*, 2001). As interações entre a P-gp e a membrana plasmática são complexas, pois afetam a função do transporte de drogas como também a fluidez da membrana (Troost *et al.*, 2004). A membrana plasmática abriga a P-gp, e sua porção hidrofóbica sustenta o meio em que o transportador de droga possa interagir com seus substratos e exportá-los através da membrana por um processo dependente de ATP (Troost *et al.*, 2004). A P-gp está localizada nos microdomínios da membrana que são resistentes a detergentes (DRMs, membranas resistentes a detergentes), e são regulados positivamente no MDR (Lavie *et al.*, 1998; Liscovitch & Lavie, 2000). Além disso, sugere-se que os próprios microdomínios possam ser importantes no desenvolvimento do fenótipo MDR em células tumorais (Liscovitch & Lavie, 2000).

A proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (MRP) tem semelhança estrutural à P-gp. O substrato específico do MRP é similar, mas

é mais limitado que a P-gp; esta tem função fisiológica na detoxificação de oxidantes intracelulares (Hugh *et al.*, 2006). Quanto a sua localização intracelular há divergências, pois alguns estudos sugerem uma localização predominante no retículo endoplasmático liso, enquanto outros, uma distribuição na membrana plasmática ou nas vesículas de Golgi (Loe *et al.*, 1996).

Uma terceira proteína, denominada proteína relacionada à resistência de pulmão (LRP), age como a principal proteína “vault” em humanos (Hugh *et al.*, 2006). A proteína LRP também está relacionada à resistência a múltiplas drogas. Em seres humanos, pode-se observar a co-expressão da P-gp, MRP1 e da LRP simultaneamente nos casos de leucemia mielóide aguda (Mossink *et al.*, 2003).

No presente estudo, analisamos a modulação do fenótipo de resistência a múltiplas drogas utilizando lipoproteínas. Para isso, utilizou-se uma linhagem de células de sarcoma uterino resistente à doxorrubicina que expressam os genes MDR1, MRP1 e LRP. Estas células foram tratadas com diferentes concentrações de lipoproteínas e, posteriormente foi realizada a análise da expressão destes genes.

Para avaliar a função da P-glicoproteína, uma vez que esta se localiza em domínios ricos em colesterol, alguns estudos relacionam a modulação do colesterol na membrana plasmática celular através do uso da metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD), a qual promove a depleção de colesterol (Le Goff *et al.*, 2006; Kamau *et al.*, 2005). Barakat *et al.*, 2005, demonstraram que a depleção de colesterol da membrana plasmática promovida pela M $\beta$ CD

influenciou a atividade ATPase da P-gp e por conseqüência sua funcionalidade. Assim, o colesterol parece ser essencial componente dos domínios de membrana por manter a estrutura da P-gp que é compatível com sua melhor atividade (Barakat *et al.*, 2005).

Desta forma, os ensaios realizados com M $\beta$ CD mostraram que o tratamento, com as concentrações de 20, 30 e 100  $\mu$ M de M $\beta$ CD por 60 minutos e 120 minutos, diminuiu a expressão dos genes MDR1, LRP e MRP1. KAMAU *et al.*, 2005, determinou o efeito da modulação do colesterol em uma linhagem com MDR1, onde o colesterol foi retirado com o M $\beta$ CD. O tratamento com 100 mM de M $\beta$ CD por 2 horas resultou em uma aparente diminuição da P-gp na membrana plasmática. No nosso estudo, ocorreu diminuição da expressão do gene MDR1 nesta mesma concentração e período de tempo. O mesmo ocorreu com os genes MRP e LRP. Então, pode-se concluir que a retirada de colesterol da membrana plasmática influenciou a diminuição da expressão dos genes estudados.

Acredita-se que a síntese de colesterol e ésteres de colesterol possa interferir na função da P-gp (Shu & Liu 2007; Le Goff *et al.*, 2006). Em humanos, a LDL é a lipoproteína que transporta a maior parte do colesterol plasmático. O evento inicial do metabolismo celular da LDL envolve a ligação da LDL ao seu receptor através da molécula de apo B-100 (Douglas *et al.*, 2000). Esta ligação exhibe saturabilidade, alta afinidade e especificidade (Brown & Goldstein, 1976; Ho *et al.*, 1978). A expressão de receptores de LDL é o maior determinante da concentração plasmática de LDL (Brown & Goldstein, 1976). Assim, a existência no organismo de um número

suficientemente grande de células neoplásicas com aumento da expressão de receptores de LDL leva conseqüentemente a um decréscimo da LDL plasmática. A concentração de colesterol intracelular é o regulador da afinidade dos receptores por LDL, assim como da sua expressão. Paralelamente, há uma diminuição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A-redutase (HMGCoA), responsável pela principal etapa de biossíntese do colesterol (Rall *et al.*, 1983). Então, investigamos o efeito do colesterol na P-gp e em outros dois genes de resistência a múltiplas drogas o MRP1 e o LRP. Obtivemos aumento da expressão dos genes MDR1, MRP1 e LRP nas duas maiores concentrações de LDL nas células de sarcoma uterino resistente à doxorrubicina tratadas por 48 horas. Não há descrição na literatura de trabalhos com células tumorais tratadas com lipoproteínas e posteriormente análise das expressões simultâneas dos genes MDR1, MRP e LRP. Existem estudos que analisam o conteúdo de colesterol total na membrana plasmática de células de leucemia linfoblástica humana (CEM) tratadas ou não com LDL, o crescimento celular dessas células pós tratamento com LDL, o efeito da LDL na entrada de quimioterápicos e o efeito da LDL na P-gp associada à atividade ATPase na membrana plasmática (Shu & Liu 2007). Mas, como grande parte das células tumorais apresenta um maior número de receptores de LDL, pode estar ocorrendo nas células estudadas uma maior captura de colesterol através desses receptores. Assim, pode-se concluir que o colesterol influenciou o aumento da expressão dos genes analisados.



Também analisamos as expressões dos genes MDR1, MRP1 e LRP em células tratadas com lipoproteína de alta densidade, HDL. Neste caso, houve diminuição da expressão dos genes MRP e LRP em todas as concentrações de HDL utilizadas. No entanto, a expressão do gene MDR1 diminuiu significativamente nas concentrações de 0,85; 1,05 e 1,25mg/ml de HDL, mas teve sua expressão aumentada nas concentrações 0,45 e 0,65mg/ml de HDL. Uma hipótese é que o colesterol da membrana plasmática esteja sendo transferido para partículas de HDL para ser esterificado (Huuskonen *et al.*, 2001; Oram 2002; Von Eckardstein *et al.*, 2001); desta forma o colesterol influenciou na expressão dos genes estudados.

As estatinas são os fármacos mais usados para o tratamento das hiperlipidemias em prevenção primária e secundária, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de doenças cardiovasculares. Estes efeitos são resultantes da atividade inibidora das estatinas sobre a enzima HMG-CoA redutase, com a propriedade de bloquear a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese do colesterol (Campo & Carvalho, 2007).

As estatinas têm sido relacionadas às propriedades de inibição de proliferação e indução de apoptose em uma grande variedade de células tumorais, sendo desencadeados efeitos antitumorais em modelos animais contra melanoma, carcinoma mamário, adenocarcinoma pancreático, fibrosarcoma, glioma, neuroblastoma e linfoma, resultando em retardamento

de crescimento tumoral e inibição de processos metastáticos (Campo & Carvalho, 2007). Elas inibem o mevalonato um caminho que leva a mudanças crítica na função celular. As estatinas podem ter um efeito citostático em células de câncer e prolongar a vida de pacientes com câncer. Elas também agem como antioxidantes, antiinflamatório, drogas angiogênicas e pode prevenir o crescimento de células tumorais (Kuoppala *et al.*, 2008). Em estudos pré-clínicos, as estatinas têm demonstrado a capacidade de potencializar os efeitos antitumorais de algumas citocinas e quimioterápicos (Campo & Carvalho, 2007).

Um estudo de caso controle relatou que o uso de estatinas por mais de 5 anos estava associado com uma significativa redução no risco relativo de câncer colorretal (Poynter *et al.*, 2005). Outros estudos indicaram que as estatinas podem reduzir o risco de câncer de próstata (Shannon *et al.*, 2005). Relatos entre o uso de estatinas e o risco de câncer de mama têm produzido resultados confusos, que não associam ou associam positiva e negativamente os resultados observados (Ahmed *et al.*, 2006). Uma recente análise destes estudos concluiu que não há efeito das estatinas na incidência e no risco de morte por câncer (Brown, 2007).

Em 2002, Sakaeda *et al.*, associaram a interação das estatinas (sinvastatina, lovastatina e pravastatina) com o MDR1. Neste estudo mostrou-se que as estatinas são substratos para o MDR1 ou simples inibidores do transporte mediado por este gene, e que isso ocorre devido a capacidade hidrofóbica das estatinas em reconhecer o MDR1.

No presente estudo, utilizaram-se células tratadas com sinvastatina para analisar a expressão dos genes MDR1, MRP1 e LRP. Como esperado, a expressão do gene MDR1 diminuiu significativamente em todas as concentrações de sinvastatina e em todos os períodos de tempo analisados. Nos genes LRP e MRP houve diminuição da expressão gênica nas concentrações de 10 $\mu$ M e 50 $\mu$ M ambos em 24 horas de tratamento. Para estes genes, houve aumento da expressão em todas as concentrações no período de 48 e 72 horas.

O meio de cultura celular é analisado pelas suas propriedades de suportar o crescimento qualitativamente pela análise morfológica das células e, quantitativamente pela estimativa da contagem de células. A capacidade de promoção do crescimento celular no meio de cultura é verificada pela suplementação do meio com soro fetal bovino. Então, depois de realizarmos a depleção do colesterol através da M $\beta$ CD e inibirmos a síntese de colesterol com o uso da sinvastatina, decidimos realizar um ensaio em que as células fossem cultivadas em meio de cultura desprovidas de soro fetal. Queríamos verificar a expressão dos genes estudados quando as células fossem submetidas a uma privação de nutrientes. O gene MDR1 teve aumento muito significativo no período de 24 horas de careciamento celular e, também obteve aumento em 48 e 72 horas. O gene LRP também obteve aumento de expressão em todos os tempos, porém, o aumento mais expressivo foi no período de 24 horas. No entanto, a expressão do gene MRP1 teve aumento significativo em todos os períodos de tempo analisados. Uma hipótese é que esta privação levou a um aumento na síntese de

colesterol através da enzima HMGCoA-redutase. Isto pode ter ocorrido para que as células possam manter a estabilidade da membrana. Desta forma, com uma maior disponibilidade de colesterol na membrana plasmática, os genes MDR1, MRP1 e LRP aumentaram sua expressão.

## **6. Conclusões**

No presente estudo, a LDL promoveu o aumento da expressão dos genes MDR1, MRP1 e LRP; este aumento foi maior no gene MDR1. No entanto, a HDL proporcionou a diminuição da expressão desses genes, sendo mais expressiva no gene MDR1.

Com a retirada de colesterol da membrana plasmática através da M $\beta$ CD, os genes MDR1, MRP1 e LRP tiveram sua expressão diminuída. No tratamento com sinvastatina houve uma diminuição significativa na expressão do gene MDR1. Nos genes MRP1 e LRP esta diminuição ocorreu apenas em 24 horas, nos períodos seguintes houve aumento da expressão destes genes.

Após carenciamento, estes genes tiveram aumento significativo da expressão.

Desta forma, podemos concluir que as lipoproteínas estudadas alteram a expressão dos genes MDR1, MRP1 e LRP.

## **7. Referências**

Ahmed MH, Osman MM, Alokail MS. Statins And Breast Cancer: A smoking gun or guilt by association? *Expert Opin Drug Saf.* 2006;5:599-601.

Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-Glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003;22:7468-7485.

Bachorik PS, Rifkind BM, Kwiterovich PO. Lipídeos e dislipoproteinemias. In: Henry JB. *Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratorias.* 1999. 2ed. São Paulo, Manole.

Barakat S, Gayet L, Dayan G, Labialle S, Lazar A, Oleinikov V, Coleman AW, Baggetto LG. Multidrug- resistant cancer cells contain two populations of P-glycoprotein with differently stimulated P-gp ATPase activities: evidence from atomic force microscopy and biochemical analysis. *Biochem J.* 2005;388:563-571.

Bates SE. Drug Resistance: still on the learning curve. *Clin Cancer Res.* 1999;5:3346-3348.

Bergman PJ, Ogilvie GK, Powers BE. Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. *J of Vet Internal Med.* 1996;10:354-359



Bergman PJ. Mechanism of anticancer drug resistance. *Vet Clin S Animal*. 2003;33:651-667.

Borst P, Zelcer N, Helvoort A. ABC transporters in lipid transport. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2000;1486:128-144.

Breier A, Baracik M, Sulová Z, Uhrik B. P-glycoprotein-implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy. *Curr Cancer Drug Tar*. 2005;5:457-458.

Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science*. 1976;191(4223):743-7.

Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981;212:628-35.

Brown AJ. Cholesterol, statins and cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:135-141.

Campo VL, Carvalho I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Quim. Nova* 2007;2:425-30.

Carmichael J, Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines

using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* 1987;47(22):5875-9.

Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 1981; 22:260-6.

Cheng Sh, Lam W, Lee Ask, Fung Kp, Wu Rss, Fong Wf. Low-level doxorubicin resistance in benzol[a] pyrene-treated kb-3-1 cells is associated with increased LRP expression and altered subcellular drug distribution. *Toxicology and applied pharmacology.* 2000;164:1341-1342.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162:156-9.

Cucco C, Calabretta B. *In vitro* and *in vivo* reversal of multidrug resistance in a human leukemia-resistant cell line by mdr1 antisense oligodeoxynucleotides. *Cancer Res.* 1996;56 4332-7.

Davis RA. Lipoprotein structure and function in: biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. *New York, Elsevier, 1996.*

Dalton WS, Crowley JJ, Salmon SS, Grogan TM, Laufman LR, Weiss GR, Bonnet JD. A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. *Cancer*. 1995; 75:815-820.

Dalton WS, BGM Durie DS, Alberts JH, Gerlach AE. Characterization of a new drug-resistant human myeloma cell line that expresses P-glycoprotein. *Cancer Res*. 1986;46:5125-30.

Deby P, Nash AE, Neklason WD, Metherall EJ. Role Of Multidrug Resistance P-Glycoprotein In Cholesterol Esterification. *J Biol Chem*.1997; 272:1026-1031.

Douglas CR. *Tratado De Fisiologia Aplicada À Ciência Da Saúde*. 4ªed, 2000.

Eisenberg S, Levy RI. Lipoprotein metabolism. *Adv Lipid Res*. 1995;13:1-89.

Filipits M, Jaeger U, Simonitsch I, Chizzali BC, Heinzl H, Pirker R. Clinical relevance of the lung resistance protein in diffuse large b-cell lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2000;6:3417-3423.

Gayet L, Dayan G, Barakat S, Labialle S, Michaud M, Cogne S, Mazane A, Coleman AW, Rigal D, Baggetto LG. *Biochemistry*. 2005;44:4499-4509.

Ginn PE. Immunohistochemical detection of p-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. *Vet Pathol*. 1996; 33:533-541.

Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Del*. 2004;1:27-42.

Goldie JH, Coldman AJ. A mathematical model formulating the drug sensitivity of tumours to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Report*. 1979;63:1727-1733.

Haker WG, Mackintosh FR, Sikic BI. Development and characterization of a human sarcoma cell line, MES-SA, sensitive to multiple drugs. *Cancer Res*. 1983;43: 4943-50.

Havel RJ, Eder H, Bragdon E. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955; 34:1345-53.

Ho YK, Brown MS, Goldstein JL. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*.1978;52:1099-114.

Huh HJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Lee JH, Lee KH, Seo JJ, Moon HN, Ghim T. Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia. *J Korean Med Sci*. 2006;21(2):253-8.

Huuskonen J. *Et Al*. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on hdl metabolism. *Atherosclerosis*. 2001;155:269-81.

Jakóbisiak M, Bruno S, Skierski JS, Darzynkiewicz Z. Cell cyclo-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:3628-3632.

Kanzaki A, Toi M, Nakayama K., Bando H, Mutoh M, Uchida T, Fukumoto M, Takebayashi Y. The expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. *Japan J Cancer Res*. 2001;92:452-458.

Kamau SW, Kramer SD, Gunthert M, Allenspach HW. Effect of the modulation of the membrane lipid composition on the localization and function of P-glycoprotein in MDR1-MDCK cells. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*. 2005;41:207-216.

Kuoppala J, Lamminpaa A, Pukkala E. Statins and cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2008;44:2122-32.

Kwiterovich JR. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerids: a current review. *Am J Cardiol*. 2000;86.

Lage H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Inter J Antimicrob Agents*. 2003;22:188-199.

Lavie Y, Liscovitch M. Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences. *Glyc JL*. 2000;17:253-259.

Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem*. 1998; 273:32380-83.

Lee JJ, Hughes CS, Fine RL, Page RL. P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer*. 1996; 77(9):1892-1898.

Le Goff W, Settle M, Greene DJ, Morton RE, Smith JD. Reevaluation of the role of the multidrug-resistant P-glycoprotein in cellular cholesterol homeostasis. *J Lipid Res.* 2006;47:51-58.

Liscovitch M, Lavie Y. Multidrug Resistance: a role for cholesterol efflux pathways? *Trends Biochem Sci.* 2000;25:530-534.

Liu Q, Ohshima K, Kikuchi M. High expression of mdr-1 gene and p-glycoprotein in initial and rebiopsy specimens of relapsed B-cell lymphoma. *Histopathology.* 2001;38:209-216.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. 2001,25(4):402-8.

Loe DW, Deeley RG, Cole SPC. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur J Cancer.* 1996;32(6):945-957.

Lowry OH, Rosenberg NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.

Mealey KL, Barhoumi R, Rogers K, Kochevar DT. Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line. *Cancer Letters.* 1998;126:187-192.

Mizutani T, Masuda M, Nakai E, Furumiya K. Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1). *Curr Drug Met.* 2008;9:167-174.

Moore AS, Leveille CR, Reimann KA, Shu H, Arias IM. The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Invest.* 1995;13(5):475-479.

Moran E, Cleary I, Larkin A M, Amhlaioibh RN, Masterson A, Scheper RJ, Izquierdo MA, Center M, O'sullivan F, Clynes M. Co-expression of mdr-associated markers P-170, MRP and LRP and cytoskeletal proteins, in three resistant variants of the human ovarian carcinoma cell line, OAW42. *Eur J Cancer.* 1997;33:652-660.

Mossink MH, Van Zon A, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EAC. Vaults: A Ribonucleoprotein Particle Involved In Drug Resistance? *Oncogene.* 2003;22:7458-7467.

Niehans GA, Jaszcz W, Brunetto V, Perri RT, Gajl-Peczalska K, Wick MR, Tsuruo T, Bloomfield CD. Immunohistochemical identification of P-glycoprotein in previously untreated, diffuse large cell and immunoblastic lymphomas. *Cancer Res.* 1992;52:3768-3775.



Ohno N, Tani A, Uozumi K, Et Al. expression of functional lung resistance-related protein predicts poor outcome in t-cell leukemia. *Blood* 2001;98(4):1160-1165.

Oram JF. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol.*2002;13:373-81.

Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005;352:2184-92.

Raaijmakers HGP, Izquierdo HM, Lokhorst HM, Et Al. Lung-Resistance-Related Protein Expression Is A Negative Predictive Factor For Response To Conventional Low But Not To Intencified Dose Alkylating Chemotherapy In Multiple Myeloma. *Blood.* 1998; 91(3):1029-1036.

Radding CM, Steinberg D. Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices. *J Clin Inves.* 1960;39:1560-9.

Rall SC Jr, Newhouse YM, Clarke HR, Weisgraber KH, McCarthy BJ, Mahley RW, Bersot TP. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E phenotype E3/3. Structure and genetics of an apolipoprotein E3 variant. *J Clin Invest.* 1989;83(4):1095-101.

Rothnie A, Theron D, Soceneantu L, Martin C, Traikia M, Berridge G, Higgins CF, Devaux PF, Callaghan R. The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence. *Eur Biophys J*. 2001;30:430-442.

Sakaeda T, Takara K, Kakumoto M. Simvastatin and lovastatin, but not pravastatin, interact with MDR1. *J pharm pharmacol*. 2002; 419-423.

Scartezini M, Zago MA, Chautard-Freire-Maia EA, Pazin-Filho A, Marin-Neto JA, Hotta JK, Nascimento AJ, Dos-Santos JE. The X-X-/E+E+ genotype of the XbaI/EcoRI polymorphisms of the apolipoprotein B gene as a marker of coronary artery disease in a Brazilian sample. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(3):369-75.

Shannon J, Tewoderos S, Garzotto M. Statins and prostate cancer risk: a case control study. *Am J Epidemiol*. 2005;162:318-25.

Schaeffer EJ, Eisenberg S, Levy RI. Lipoprotein apoprotein metabolism. *J Lipid Res. New York*.1978;19:667-87.

Schneider J, Gonzalez-Roces S, Pollán M, Lucas R, Tejerina A, Martin M, Alba A. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2001;3:183-191.

Shu Y, Liu H. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by cholesterol derived from low density lipoprotein in a vinblastine-resistant human lymphoblastic leukemia cell line. *Biochem Cell Biol.* 2007;85:638-646.

Stein, EA. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Textbook of Clinical Chemistry (Ed.: Tietz NW). W.B. Saunders, Philadelphia. 1986; p.829-900.

Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry.* 2008;73:592-604.

Troost J, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells. *Mol Pharmacol.* 2004;66:1332-1339.

Van Zon A, Mossink MH, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EAC. The vault complex. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:1828-1837.

Von Eckardstein A. High-density lipoprotein and atherosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:13-27.

Xiu-Bao Chang. A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Ver.* 2007;26: 15-37.

Wang E, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276:909-916.

Zhan Z, Sandor VA, Gamelin E . Expression of the multidrug resistance-associated protein gene in refractory lymphoma: quantitation by a validated polymerase chain reaction assay. *Blood* .1997;89(10):3797-3800.

Yu Shu and Hu Liu. Reversal of P-glicoprotein-mediated multidrug resistance by cholesterol derived from low density lipoprotein in a vinblastine-resistant human lymphoblastic leukemia cell line. *Biochem Cell Biol.* 2007;85:638-646.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)