



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

***Kelly Araujo Lúcio***

ESTUDO DA ATIVIDADE DO ÁCIDO OLEANÓLICO  
EM LINHAGENS DE CÂNCER DE PULMÃO E NO  
DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES  
PULMONARES POR MELANOMA

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Kelly Araújo Lúcio**

ESTUDO DA ATIVIDADE DO ÁCIDO OLEANÓLICO EM LINHAGENS DE CANCÊR DE PULMÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES PULMONARES POR MELANOMA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas (Biofísica)

Orientador: Cerli Rocha Gattass

Rio de Janeiro

2010

Lúcio, Kelly Araújo.

Estudo da atividade do ácido oleanólico em linhagens de câncer de pulmão e no desenvolvimento de metástases pulmonares por melanoma/ Kelly Araújo Lúcio - 2010.

XV, 142 f. Il.; 29,7cm.

Dissertação (doutorado) – UFRJ/IBCCF/ Programa de Pós- graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Rio de Janeiro, 2010.

Orientador: Cerli Rocha Gattass.

1. Ácido oleanólico. 2. Câncer de pulmão. 3. Apoptose. 4. Triterpenos. I. Gattass, Cerli Rocha. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Estudo da atividade antitumoral do ácido oleanólico em linhagens de câncer de pulmão e no desenvolvimento de metástases pulmonares por melanoma.



Kelly Araujo Lúcio

ESTUDO DA ATIVIDADE DO ÁCIDO OLEANÓLICO EM LINHAGENS DE CÂNCER DE PULMÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES PULMONARES POR MELANOMA.

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Rio de Janeiro, 10 de Maio de 2010.

Aprovada por:

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Cerli Rocha Gattass - Professora Adjunta, IBCCF/UFRJ.

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Janaina Fernandes - Professora Adjunta, IBCCF/UFRJ.

---

Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima - Professor Adjunto, IBCCF/UFRJ.

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Patrícia Torres Bozza - Professora Titular, IOC/FIOCRUZ.

---

Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto - Professor Titular, ICB/UFRJ.

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria da Glória Costa Carvalho – Professora Adjunta, UFRJ

---

Prof. Dr. Robson Coutinho Silva – Professor Associado II, IBCCF/ UFRJ.

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Christina Maeda Takyia - UFRJ.

*Dedico esta tese ao pleno de alegria e amor, que mandou a escuridão da dúvida  
embora, quando não havia mais nenhuma luz;  
Que desfez a nuvem do pecado e da tristeza, quando estas insistiam em se  
manter. Ao provedor de graça eterno, que me encheu de luz o meu espírito e  
tornou meu coração mais aberto para enfrentar as adversidades.  
Ao Deus pai, senhor da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Cerli Rocha Gattass que proporcionou condições para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha co-orientadora Janaina Fernandes por toda a sua paciência e dedicação nos momentos em que tudo parecia confuso e sem explicação, pois dela aparecia explicação para tudo, até mesmo daquilo que parecia não ter explicação e as coisas se tornavam mais fáceis.

A minha mãe Mariléa Leite, que torceu pelo meu sucesso e me proporcionou as melhores condições para meu desenvolvimento intelectual e para a realização deste trabalho de forma incondicional mesmo sem saber o porquê das coisas.

As minhas irmãs (Katy e Keila) que abriram mão da minha atenção quando eu precisava me concentrar nos trabalhos e nos estudos, que me deu sugestões quando eu precisava e me escutou falar sobre coisas que elas não entendiam. E que abriram mão de algo importante para elas em função dos meus objetivos.

Ao meu cunhado Cláudio que mesmo reclamando, socorria o meu computador quando ele dava sinal de que ia “morrer”.

A minha sobrinha Vanessa por continuar a me amar, mesmo por todas as vezes que eu perdia a paciência ao tentar me concentrar e ela não permitia devido às gritarias de criança.

Ao meu namorado Robson Luís, que abria mão da minha companhia por saber o quanto importante era para mim a execução de compromisso referente a esta tese e que me levava e buscava do laboratório em momento em que muitos estavam se divertindo, simplesmente pelo problema ser meu e não dele, e também por me incentivar e acreditar na minha capacidade.

A todos os membros do culto de oração pelo suporte espiritual, em especial René e Jandira.

As minhas mães de coração Regina Gomes e Marinéa Leite por se preocuparem com o meu bem estar e com a minha saúde.

À Gleice da Graça Rocha por ter se mostrado mais que uma colega de trabalho, por todos os momentos em que me ouviu e principalmente nos momentos de desespero e angustia quando eu achava que nada iria dar certo.

A minha ex-estagiária Mariana Massaoka e aos colegas de laboratório, Lívia, Adonis, Claudio, Carol, Igor, Andressa, Amanda, Letícia e Carlos pela amizade, boa convivência, bons conselhos e ótimo astral,

À Gisele P. Faria e Bianca Ortiz pelas conversas de corredor nos momentos de tristeza e desespero quando tudo insistia em dar errado.

A Professora Chistina M.Takiya, por toda a sua dedicação e atenção nos momentos experimentais, pois o que ela fez por mim, “nem Credicard paga”.

A todos os membros do Laboratório de Patologia Celular (Leonardo C. Monção, Luís Fragoso e Tadeu L. Montagnol) pelo trabalho e boa convivência.

Aos colegas de diferentes laboratórios (Camila da Silva, Flávia Vieira e Gladys Corrêa, Alessandra Filardys, Tatiana Luna, Nívia e Mariana) que se dispuseram a me ajudar, a me ensinar e a me alertar quando necessário.

Aos meus amigos da UERJ (Cascaes, Luis, Ana Angélica, Ricardinho, Jean, Coqueiro, Raquel e Raposo) que me apoiaram quando eu questionava se todas as dificuldades enfrentadas valiam apenas.

Aos meus professores que me deram o conhecimento necessário, não só para a realização deste trabalho, como para exercer pesquisa em várias áreas do conhecimento. Que estavam sempre dispostos a esclarecer minhas dúvidas caso elas aparecessem.

À Sandra Brito, que em muitos momentos foi a minha luz, por me lembrar de datas, por tirar minhas dúvidas sobre documentações e procedimentos burocráticos a serem tomados.

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológica (Biofísica)/UFRJ, na pessoa da professora Narcisa Cunha e Silva, pelas preocupações, pelo apoio e compreensão, principalmente na etapa final do meu doutorado.

A todo apoio técnico (Lindomar, Marquinho/estufa de CO<sub>2</sub>, Sr. Gentil, Ari/refrigeração, Gabriela/secretaria da pós-graduação, Ricardo/secretaria da

graduação, Silvio/informática, Wagner/informática; muitos podem pensar que estas pessoas faziam apenas suas obrigações, mais para mim eles fizeram a diferença em diferentes momentos de necessidade.

Ao revisor e aos membros da banca examinadora pelo tempo e pela atenção cedidos a mim para defesa deste trabalho.

## RESUMO

### ESTUDO DA ATIVIDADE DO ÁCIDO OLEANÓLICO EM LINHAGENS DE CÂNCER DE PULMÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES PULMONARES POR MELANOMA

Autor: Kelly Araujo Lúcio

Orientadora: Cerli Rocha Gattass

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas (Biofísica).

Câncer de pulmão é uma das mais freqüentes causas de morte por câncer em todo o mundo. Baseado nas suas características biológicas, o câncer de pulmão pode ser dividido em dois grandes grupos: câncer de pulmão de células pequenas (SCLC), que corresponde aproximadamente 20 % e câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC), que corresponde aproximadamente 80 % dos tumores. Quimioterapia é considerada o principal tratamento para o câncer de pulmão. Contudo, por mais de três décadas o uso de quimioterapia convencional, regimes baseados na quimioterapia tradicional ou terapias-alvo, não tem representado uma melhora substancial na sobrevida média dos pacientes com câncer de pulmão, e a média de sobrevida em 5 anos permanece aproximadamente em torno de 10 %. A falta de resposta quimioterápica em tumores de pulmão tem sido relacionada ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), que pode ser resultante de vários mecanismos intrínsecos ou adquiridos. Entre esses mecanismos, expressão de proteínas transportadoras MDR e alterações das vias apoptóticas têm sido visto com grande relevância. O ácido oleanólico (AO), triterpeno pentacíclico isolado de uma variedade de plantas, apresenta várias atividades farmacológicas, incluindo antitumoral contra várias linhagens celulares sensíveis e de resistência a múltiplas drogas. Esse trabalho investigou a atividade antitumoral do ácido oleanólico em A549 e H460, linhagens NSCLC, que apresenta expressão intrínseca de proteínas MDR e defeito na trajetória apoptótica. Os resultados obtidos demonstraram que, independente da atividade e expressão da proteína MRP1/ABCC1 nessas células, AO diminuiu a viabilidade celular e induziu apoptose nas linhagens A549 e H460 de maneira dose-dependente. Tratamento da A549 com AO não afetou a atividade da proteína MRP1/ABCC1, mas aumentou a expressão de Bax, alterando o balanço Bax/Bcl-2 e, diminuiu a expressão da proteína survivina, condição favorável para o apoptose. Tratamento com AO também diminuiu os níveis de COX-2, uma proteína conhecida por estar envolvida com o fenótipo maligno (proliferação, invasão, angiogênese e resistência apoptose) no câncer de pulmão. Além disso, tratamento com AO reduz de forma significativa a expressão de VEGF, Ki-67 e ADF/cofilina, importantes marcadores da evolução e relapso do tumor, sugerindo que ele pode interferir com o desenvolvimento de metástase. De fato, tratamento com AO significativamente reduz o desenvolvimento de metástase pulmonar em modelo animal. Considerando a resistência do câncer de pulmão a quimioterapia, os resultados apresentados aqui sugerem que o AO possa ser um bom candidato para avaliação adicional como um potencial agente terapêutico para o câncer de pulmão.

Palavras-chave: Ácido oleanólico; Câncer de pulmão; Apoptose; Triterpenos.

## ABSTRACT

### STUDY OF ANTITUMOR ACTIVITY OF OLEANOLIC ACID ON LUNG CANCER CELL LINES AND DEVELOPMENT OF PULMONARY METASTASIS BY MELANOMA

Autor: Kelly Araujo Lúcio

Orientador: Cerli Rocha Gattass.

Abstract da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas (Biofísica).

Lung cancer is the most common cause of cancer related deaths worldwide. Based in its biological characteristics It can be divided into two main groups: small cell lung cancer (SCLC), that correspond to approximately 20 % and non-small cell lung cancer (NSCLC), that correspond to approximately 80 % of tumors. Chemotherapy is considered the main treatment for lung cancer. However, in the last three decades the use of conventional chemotherapy, chemotherapy-based regimens or targeted therapies, have not improved survival rate for patients with lung cancer, and the 5-year survival rate remains at approximately 10 %. Impairing of the chemotherapeutic response in lung tumors has been related to multidrug resistance phenotype (MDR), which can be achieved by several intrinsic and acquired mechanisms. Among these mechanisms, expression of MDR transporter proteins and alterations of apoptotic pathways seems to be very relevant. Oleanolic acid (OA), pentacyclic triterpene isolated from many types of medicinal plants, exhibits various pharmacological activities including anti-tumoral against several sensitive and MDR cells lines. This study investigated the anti-tumoral activity of oleanolic acid on A549 and H460, NSCLC cell lines that present intrinsic expression of MDR proteins and defects in the apoptotic pathway. The results obtained demonstrated that, independently of the MRP1/ACBC1 activity present in these cells, OA decreased the viability and induced a caspase-dependent apoptosis of A549 and H460 in dose-dependent way,. Treatment of A549 with OA had no effect on the activity of MRP1/ABCC1 protein but increased the expression of Bax, altering the balance Bcl-2/Bax and, decreased the expression of survivin, conditions that favors apoptosis. Treatment with OA also decreased COX-2 levels, a protein known to be involved with the malignant phenotype (proliferation, invasiveness, angiogenesis and apoptosis resistance) in lung cancer. In addition, treatment with OA significantly reduced the expression of VEGF, Ki-67 and ADF/cofilin important markers of tumor evolution and relapse suggesting that it may interfere with metastasis development. Indeed, treatment with OA significantly suppressed the development of pulmonary metastasis in animal models. Considering the resistance of lung cancer to chemotherapy, the results presented here suggested that AO may be a good candidate for additional evaluation as a potential therapeutic agent for human lung cancer.

Key words: Oleanolic acid; Lung cancer; Apoptosis; Triterpene.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Evolução no tratamento do câncer de pulmão.	6
<b>Figura 2:</b> Efeito dos membros da família de VEGF e seus receptores na angiogênese tumoral. A ligação dos receptores aos ligantes de VEGF causa sua dimerização e ativação, causando fosforilação do domínio do receptor de tirosina cinase e uma subsequente cascata de sinalização que leva a angiogênese e/ou linfangiogênese. A estimulação do VEGFR-1 e VGFR-2 por VEGF/VEGF-A e VEGFB em células endoteliais induzem a proliferação, migração e sobrevivência, assim como permeabilidade vascular, todos esses efeitos levando a angiogênese tumoral. VEGF-C e VEGF-D interagem com VEGFR-3 na superfície de células endoteliais linfáticas, levando a linfangiogênese (Adaptado de HICKLIN & ELLIS, 2005).	8
<b>Figura 3:</b> Mecanismo da atividade dos diferentes inibidores do fator de crescimento epitelial vascular (VEGF).	10
<b>Figura 4:</b> Trajetória de sinalização de EGFR.	12
<b>Figura 5:</b> Fatores celulares que causam resistência a drogas	14
<b>Figura 6:</b> Modelo de estrutura das proteínas MDR. (A) Glicoproteína P, (B) Proteína Associada à Múltipla Resistência 1 e (C) Proteína de Resistência de Câncer de Mama.	15
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática das principais via de sinalização apoptótica.	25
<b>Figura 8.</b> Diagrama esquemático das proteínas da família Bcl-2.	27
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática da família das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) em humanos.	29
<b>Figura 10:</b> Diagrama esquemático da conversão do ácido araquidônico à prostaglandinas (PGs) e outros eicosanóides pela enzima ciclooxigenase -1 e -2.	31
<b>Figura 11:</b> Cascata metastática. (1) As células do tumor primário passam por uma transição epitélio-mesenquimal (EMT) e adquirem propriedades evasivas; (2) degradação da membrana basal e remodelamento da matriz extracelular (ECM) por proteinases; (3) células tumorais invadem os tecidos circundantes com células simples ou coletivas; (4) intravasão das células tumorais; (5-6) as células tumorais são transportadas através dos vasos onde elas extravasam; (7) as células extravasadas podem ainda ficar dormentes por anos, e (8-9) eventualmente algumas células disseminadas crescem e estabelecem um tumor secundário.	34



<b>Figura 12:</b> Estrutura do ácido oleanólico (AO).	36
	49
<b>Figura 13:</b> Protocolo experimental para experimento animal. As setas indicam a série de tratamento com PBS ou AO (5 ou 10 mg Kg <sup>-1</sup> dia).	
<b>Figura 14:</b> AO diminui a viabilidade celular de linhagens NSCLC. As células A549 e H460 foram incubadas com meio, diferentes concentrações de AO (10, 25, 40 ou 50 µg/mL) ou DMSO (nas concentrações carregadas pela droga) por 48h. Após o período de incubação a viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT e a percentagem de viabilidade foi calculada usando as células incubadas com DMSO como controle. Os resultados expressam a média ± DP de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.	51
<b>Figura 15:</b> Alterações morfológicas induzida pelo AO na linhagem A549 (200x). As células foram plaqueadas e tratadas por 48h de com meio (controle) e AO 50µg/mL. As células tratadas com AO 48h mostram morfologia típica de apoptose (setas).	52
<b>Figura 16:</b> AO induz fragmentação celular na linhagem A549. As células foram tratadas com meio ou diferentes concentrações de AO (10, 25 ou 50 µg/mL) por 48h, após período de incubação as células foram ressuspensas em tampão hipotônico contendo triton-X e iodeto de propídeo e a fragmentação de DNA foi medida por citometria de fluxo. <b>(A)</b> Histograma representativo da média de três experimentos independentes; a população sub-G1 (população apoptótica) está demarcada em M1. <b>(B)</b> Quantificação da % de células fragmentadas. *** p< 0,001 comparado com o controle e AO (10 e 25 µg/mL). Os resultados expressam a média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.	53
<b>Figura 17:</b> AO induz fragmentação celular na linhagem H460. As células foram tratadas com meio ou diferentes concentrações de AO (10, 25 ou 50 µg/mL) por 48h, após período de incubação as células foram ressuspensas em tampão hipotônico contendo triton-X e iodeto de propídeo e a fragmentação de DNA foi medida por citometria de fluxo. <b>(A)</b> Histograma representativo da média de três experimentos independentes; a população sub-G1 (população apoptótica) está demarcada em M1. <b>(B)</b> Quantificação da % de células fragmentadas. *** p< 0,001 comparado com o controle e AO (10 e 25 µg/mL). Os resultados expressam a média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.	54
<b>Figura 18:</b> AO induz ativação de caspase-3 nas linhagens de NSCLC. Após 24 de plaqueamento, as células A549 e H460 foram tratadas com meio (controle) ou diferentes com concentrações de AO (10, 25 ou 50 µg/ mL) por 48h. Após o tratamento as células foram incubadas com um reagente para detecção de caspase-3 ativada (CaspGlow, BioVision) e a	56

percentagem de células positivas foi determinada por FACS. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata.

**Figura 19:** Efeito dos bloqueadores Verapamil (Vp) e MK571 (MK) sobre o carregamento de Rho123 e 5-CFDA. As células A549 e H460 foram incubadas por 30 minutos na presença de meio (autofluorescência/AF) ou Rho 123 ou 5-CFDA, na presença ou ausência de inibidores específicos para Pgp (VP) ou MRP1 (MK), respectivamente e a fluorescência intracelular foi medida por citometria de fluxo (FL-1). Histograma representativo de 3 experimentos independentes. CF (carboxifluoreceína). 57

**Figura 20:** Efeito do AO sobre a atividade da MRP1/ABCC1. As células foram incubadas por 30 minutos na presença de meio (AF) ou 5-CFDA, na presença do bloqueador MK571 ou diferentes concentrações de AO (6,25; 12,5; 25 ou 50 µg/mL) e a fluorescência intracelular foi medida por citometria de fluxo (FL-1/ 10.000 eventos). \*\* p< 0,001 \*\*\*, p< 0,001 comparado com o controle (CF/ carboxifluoreceína). Os resultados expressam a média da intensidade de fluorescência (MIF) ± DP de três experimentos independentes. 58

**Figura 21:** AO não altera a expressão de MRP1. As linhagens celulares (A549 ou H460) foram tratadas com meio ou AO (25 e 50 µg/mL). Após 24 h de incubação as células foram recolhidas, permeabilizadas e incubadas com anticorpo anti-MRP1-PE (1:200) por cerca de 30 minutos a 4 °C e a fluorescência média intracelular foi medida por citometria de fluxo (FL-2/ 20.000 eventos). 59

**Figura 22:** Imunofluorescência de células A549 tratadas com AO (200x). Células foram tratadas com meio (controle) ou AO 50 µg/mL por 24h, fixadas, marcadas com anticorpo primário específicos para Bax e Bcl-2, com o anticorpo secundário (conjugado a Cy3) e contracoradas com DAPI. A percentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI. 60

**Figura 23:** AO não altera os níveis de expressão de Bcl-2. A linhagem A549 foi tratada com meio (AF) ou AO 50 µg/mL. Após 24h de incubação, as células foram recolhidas, permeabilizadas e incubadas com anticorpo anti-Bcl-2-PE (1:20) por cerca de 30 minutos a 4 °C e a fluorescência média intracelular foi medida por citometria de fluxo (FL-2/20.000 eventos). 61

**Figura 24:** Imunofluorescência de células A549 tratadas com AO (200x). Células foram tratadas com meio (controle) ou AO 50 µg/mL por 24h. Após a incubação as células foram fixadas, marcadas com anticorpo primário anti-survivina, com o anticorpo secundário (conjugado a Cy3) e contracoradas com DAPI. A percentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI 62

**Figura 25:** Imunofluorescência de células A549 tratadas com AO (200x). 63

As células A549 foram tratadas com meio (controle) ou AO50 µg/mL por 24h. Após o período de incubação as células foram fixadas, marcadas com anticorpo primário anti- ki-67, com o anticorpo secundário (conjugado a Cy3) e contracoradas com DAPI. A percentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI.

**Figura 26:** Imunofluorescência de células A549 tratadas com AO (200x). 64  
Células foram tratadas com meio (controle) ou AO50 µg/mL por 24h, fixadas, marcadas com anticorpos para proteína VEGF e com o anticorpo secundário (conjugado a Cy3) e contracoradas com DAPI. A percentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI.

**Figura 27:** Efeito de AO sobre a expressão da proteína ADF/cofilina. As 64  
células A549 foram tratadas com meio (controle) e AO50 µg/mL em diferentes tempos. As células foram lisadas, e o *pellet* utilizado para análise em western blotting.

**Figura 28:** AO modula os níveis de expressão de proteínas envolvidas 65  
com a resistência tumoral. O gráfico representa a percentagem de células positivamente marcadas. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o controle (Meio). A percentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI.

**Figura 29:** Efeito de AO na expressão da proteína COX-2. (A) Células 67  
A549 foram tratadas com meio (controle) ou AO50 µg/mL em diferentes tempos. As células foram lisadas e o *pellet* utilizado para análise em western blotting. (B) Imunofluorescência de células A549 tratadas com meio (controle) ou AO50 µg/mL por 24h. Após a incubação as células foram fixadas, marcadas com anticorpos anti-COX-2, com anticorpo secundário (conjugado a Cy3) e contracoradas com DAPI. A percentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI.

**Figura 30:** AO inibe o desenvolvimento de metástase. Grupo de 68  
camundongos (n= 5-7) injetados na veia da cauda (i.v.) com células do melanoma murino B16F10. Após três dias de inoculação, os animais foram tratados com salina (A) ou AO (5 mg Kg<sup>-1</sup> ou 10 mg Kg<sup>-1</sup> dia)(B) como descrito no material e métodos e, C) número de metástases pulmonares foram contadas no 18<sup>o</sup> dia. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com PBS e DMSO. Os resultados expressam a média ± DP de 3 experimentos independentes

**Figura 31:** Fotomicrografia do pulmão de camundongos C57BL/6 (20x). 69  
Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10<sup>6</sup> células do melanoma B16F10 e tratados com salina (A) ou AO (10 mg Kg<sup>-1</sup> dia) (B) como descrito no esquema da figura 13. Os animais foram sacrificados, os pulmões retirados, fixados e parafinados. Foram realizados cortes de 4 µm do tecido pulmonar e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina

(HE). As setas indicam a área tumoral. **(C)** Quantificação da área tumoral de animais tratados com PBS e AO (5 e 10 mg Kg<sup>-1</sup> dia). \*\* p>0,01 \*\*\* p>0,001 comparados com PBS.

**Figura 32:** Mecanismo de ativação da trajetória de MAPK/ERK pela COX-2.

78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Mudanças genético-moleculares freqüentes no câncer de pulmão.	4
<b>Tabela 2:</b> Quimioterápicos substratos dos transportadores ABC.	17
<b>Tabela 3:</b> Inibidores das proteínas MDR.	21
<b>Tabela 4:</b> Diferentes Atividades do Ácido Oleanólico (AO).	36

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1:** Expressão de MRP1/ABCC1 na linhagem B16F10. As células foram plaqueadas ( $5 \times 10^4$  células / 450 $\mu$ l) por 48h e incubadas na presença do anticorpo primário (anti-MRP1/ Alexis Biochem., US- diluição 1:20) seguido do anticorpo secundário IgG anti-rato conjugada a FITC, SIGMA - diluição 1:1000. A fluorescência intracelular média foi medida por citometria de fluxo (20.000 eventos; canal FL-1). 106
- Anexo 2:** Efeito do bloqueador MK71 sobre a atividade da MRP1/ABCC1. A linhagem celular B16F10 foi incubada por 30 minutos na presença meio (AF), 5-CFDA (C) e na presença de diferentes concentrações de MK571. A fluorescência média intracelular referente à quantidade CF (carboxifluoreceína) acumulada após o carregamento foi medida por citometria de fluxo (FL-1/20.000 eventos). 106
- Anexo 3:** Oleanolic acid induced death of NSCLC cell lines expressing resistance proteins and inhibited development of metastasis *in vivo* 107

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido araquidônico.

AB: Ácido betulínico

ANT: Translocador de nucleotídeo adenina.

AO: Ácido oleanólico.

ABCP: Proteína ABC placenta.

ABC: Família “ATP-Binding Cassete”.

AIF: Fator indutor de apoptose.

ATP: Adenosina trifosfato.

Apaf-1: Fator-1 ativador de protease apoptótica.

BCRP: Proteína de resistência de câncer de mama .

COX-1: Ciclooxigenase-1.

COX-2: Ciclooxigenase-2.

CSA: Ciclosporina A.

CAD: DNase ativada por caspase .

DNA: Ácido desoxirribonucléico.

dATP: Deoxiadenosina trifosfato.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DISC: Complexo sinalizador da indução de morte.

$\Delta\psi_m$ : Potencial de membrana mitocondrial.

ECM: Matriz extracelular

EGF: Fator do crescimento epidermal.

EGFR: Receptor do fator do crescimento epidermal.

EMT: Transição epitélio-mesenquimal.

ERK: “Extracellular signal-regulated kinase”.

FACS: “Fluorescence-activated cell sorter”.

FADD: Domínio de morte associado ao Fas.

GSH: Glutathiona reduzida.

HIF-1: Fator-1 induzível por Hipóxia.

ICAD: Inibidor de DNase ativada por caspase.

IAP: Proteína inibidora de apoptose.

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol.

MXR: Proteína de resistência a mitoxantrona.

MRP1/ABCC1: Proteína-1 associada à resistência a múltiplas drogas.

MDR: Resistência a múltiplas drogas.

NSAIDs: Drogas anti-inflamatória não-esteroidais .

NSCLC: Câncer de pulmão de células não- pequenas.

PARP: Poli-ADP ribose polimerase.

PBS: Solução fosfato tamponada.

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaqueta.

PGD2: Prostaglandina D2.

PGE2: Prostaglandina E2.

PGF2: Prostaglandina F2.

PGF2 $\alpha$ : Prostaglandina F2 $\alpha$ .

PGG2: Prostaglandina G2.

PGH2: Prostaglandina H2.

PGI2: Prostaciclina I2.

Pgp: Glicoproteína P.



PI: Iodeto de propídio.

PTP: Poro de permeabilidade de transição.

QT: Quimioterapia.

RNA: Ácido ribonucléico.

RTKs: Receptores de tirosina cinase.

SMAC/DIABLO: "Second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low pH".

SCLC: Câncer de pulmão de células pequenas.

SFB: Soro fetal bovino.

siRNA: Ácido ribonucléico de interferência.

STAT3: Sinal transdutor e ativador de transcrição 3

STAT5: Sinal transdutor e ativador de transcrição 5.

TGF- $\alpha$ : Fator transformante de crescimento- $\alpha$ .

TIKs: Inibidores de tirosina cinase.

TM: Trans membrana

TNF: Fator de necrose tumoral.

TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral.

TRADD/FADD: Domínio de morte associado ao TNF-R/ domínio de morte associado ao Fas.

TXA2: Tromboxanos A2.

VDAC: Canal aniônico dependente de voltagem.

VEGF: Fator de crescimento epitelial vascular.

VEGFR: Receptor do fator de crescimento epitelial vascular.

VP: Verapamil.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	1
1.1. O Câncer.	1
1.2. Câncer de Pulmão.	1
1.3. Terapias do Câncer de Pulmão.	4
1.3.1. Terapias Convencionais.	4
1.3.2. Terapias alvo- direcionada.	6
1.3.2.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).	6
1.3.2.2 Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR).	10
1.4. Resistência Múltiplas Drogas (MDR).	13
1.5. Estratégias Terapêuticas contra a Resistência a Múltiplas Drogas.	19
1.6. Mecanismos de Resistência a Apoptose.	22
1.7. Ciclooxigenase-2 como Alvo na Quimioterapia do Câncer.	30
1.8. A Falta da Resposta Quimioterápica e o Desenvolvimento Metástase.	33
1.9. Triterpenos e Câncer.	35
<b>2. Objetivos</b>	38
2.1. Geral	38
2.2. Específicos	38
<b>3. Material e Métodos</b>	39
3.1. Material	39
3.2. Métodos	42
3.2.1. Linhagens Celulares e Condições de Cultura	42
3.2.2. Avaliação da Viabilidade Celular	42
3.2.3. Avaliação da Fragmentação de DNA	43
3.2.3.4 Avaliação da Ativação de Caspase	43

3.2.5. Avaliação da Atividade das Proteínas MDR	44
3.2.6. Avaliação da Expressão de MRP1	45
3.2.7. Western Blotting	45
3.2.8. Imunofluorescência	46
3.2.9. Atividade Tumoricida em Modelos animais	47
3.2.10. Processamento Histológico	48
3.2.11. Histomorfometria	48
3.2.11. Análise Estatística	49
<b>4. Resultados</b>	<b>50</b>
4.1. Ácido oleanólico inibe a viabilidade celular e induz fragmentação de DNA mediada por caspase 3.	50
4.2. Efeito do AO sobre as proteínas MDR	55
4.3. AO interfere com a expressão de proteínas envolvidas na resistência a apoptose.	59
4.4. AO interfere com a expressão de proteínas envolvidas na proliferação, angiogênese e metástase.	62
4.5. Efeito do AO sobre COX-2	65
4.6. Efeito do AO sobre o Desenvolvimento de Metástases	67
<b>5. Discussão</b>	<b>70</b>
<b>6. Conclusões</b>	<b>79</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	<b>80</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>106</b>
Anexo 1	106
Anexo 2	106
Anexo 3	107

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. O Câncer**

O câncer, um grupo heterogêneo de mais de 100 doenças, é caracterizada por uma proliferação celular desorganizada e desregulada. Em nível molecular, o câncer é uma doença genética que se desenvolve devido ao acúmulo de mutações em células somáticas, gerando um fenótipo que inclui instabilidade genômica e aneuploidia cromossomal e causando uma aceleração de mudança genética. A transformação maligna e progressão tumoral de qualquer célula requerem imortalização, perda do controle de “checkpoint”, desregulação do crescimento e sobrevivência.

Devido à sua alta incidência e morbidade o câncer é considerado um importante problema de saúde pública em nível mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008) o câncer causa 7 milhões de mortes todos os anos, totalizando 12,5 % dos óbitos mundiais, e a expectativa é que esse índice continue aumentando, com uma estimativa de 9 milhões de mortes em 2015. No Brasil, o câncer é a segunda doença em *causa mortis* só perdendo para as doenças cardiovasculares. Até 2020 são estimados 15 milhões de novos casos no Brasil, caso seja mantida a tendência atual de crescimento da doença (BRASIL/INCA, 2009).

## **1.2. Câncer de Pulmão**

Dentre os vários tipos de neoplasias, o câncer de pulmão é um dos mais agressivos. Na primeira década do século XX, o câncer de pulmão era uma afecção rara, porém, ao final deste século ele se tornou uma das principais causas de morte.

A taxa de sobrevivência média cumulativa em 5 anos varia entre 13-21 % em países desenvolvidos e entre 7-10 % nos países em desenvolvimento. Atualmente o câncer de pulmão é a causa mais comum de morte por câncer em ambos os sexos, representando cerca de 28 % da taxa global de mortes por câncer (BRASIL/INCA, 2009; JEMAL et al., 2007). No Brasil, são previstos aproximadamente 27.000 novos casos de câncer de pulmão em 2010. Em termos de número de óbitos e de anos de vida perdidos, o impacto do câncer de pulmão é maior que o dos cânceres de mama, próstata e colón e combinados (JEMAL et al 2007; LANDIS et al., 1999). Prevê-se que, a âmbito mundial, o câncer de pulmão continuará sendo um importante problema no século XXI, devido ao uso do tabaco que é considerado o principal agente causador deste tipo de câncer (DOLL, 2000).

A maioria dos tumores pulmonares malignos originam-se do epitélio respiratório e são denominados carcinomas broncogênicos. Os carcinomas broncogênicos podem ser divididos em dois grandes grupos histopatológicos: câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC - Non-Small Cell Lung Cancer), que representa cerca de 80 % e câncer de pulmão de células pequenas (SCLC - Small Cell Lung Cancer), que corresponde cerca de 20 % dos casos de câncer de pulmão. O NSCLC inclui os subtipos, adenocarcinoma, carcinoma broncoalveolar, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes (TRAVIS et al., 2002). Destes, o adenocarcinoma constitui o subtipo histológico mais freqüente, sendo mais comum entre as mulheres e não fumantes, o carcinoma de células escamosas é o mais comum em homens e o carcinoma de células grandes, o mais comum entre fumantes (ROBBINS & COTRAN, 2005).

Histologicamente, o SCLC caracteriza-se por pequenas células de coloração escura, com pouco citoplasma, cromatina nuclear finamente distribuída e nucléolos

imperceptíveis. Dentre os subtipos de NSCLC o **adenocarcinoma** geralmente se origina na periferia do pulmão ou nas vias aéreas centrais e caracteriza-se por sua tendência de formar glândulas. O **carcinoma broncoalveolar**, uma subcategoria do adenocarcinoma tem sua origem na periferia e tende a se espalhar de modo descamativo ao longo dos septos alveolares preexistentes. O **carcinoma de células escamosas** origina-se nas vias aéreas centrais e caracteriza-se por queratinização, com formação de núcleos centrais de queratina circundados por células achatadas e por apresentar grande quantidade de desmossomos. O **carcinoma de células grandes** é freqüentemente descrito como carcinoma de células indiferenciadas por não apresentar morfologia definida (ou característica) à microscopia ótica (GOLDMAN & BENNET, 2002; BRAMBILIA et al., 2001).

Até hoje, a caracterização histopatológica ainda é usada como critério para definir o esquema inicial de tratamento dos pacientes de câncer de pulmão. Nos últimos anos, estudos de genética e biologia molecular permitiram a identificação de alguns genes dominantes e genes supressores de tumor que estão freqüentemente presentes nos grupos histológicos SCLC e NSCLC (Tabela 1) (PANANI & RUSSOS, 2006; ROBBINS & COTRAN, 2005). Entretanto, embora essa informação já seja usada na escolha do esquema terapêutico para alguns pacientes, como mostrado na tabela 1, diferentemente do que acontece para leucemia mielóide crônica (LMC) que é caracterizada pela presença do cromossomo Filadélfia, as alterações detectadas ainda são insuficientes para definir grupos de pacientes e, portanto, para substituir a caracterização histológica. Assim, o uso rotineiro de marcadores moleculares como parâmetro para escolha do esquema de tratamento no câncer de pulmão requer a implantação da tecnologia específica em todos os centros de triagem de pacientes, o que ainda não foi feito.

**Tabela 1:** Mudanças genético-moleculares frequentes no câncer de pulmão.

Genes	Anomalias	Frequência	
		NSCLC	SCLC
FHIT	Deleção/ mutação	~40	~80
K-RAS	Mutação	~20	Raro
ERB1/EGFR	Superexpressão	~60	-
ERB2/HER2/NEU	Superexpressão	~20	-
Família de MYC	Superexpressão	~5-10	~15-30
Bcl-2	Superexpressão	~10-35	~75-95
Rb	Inativação (deleção /mutação)	~15-30	~90
P53	Inativação (mutação/deleção)	~50	~80-90

Adaptado de PANANI & RUSSOS, 2006.

### 1.3. Terapias do Câncer de Pulmão

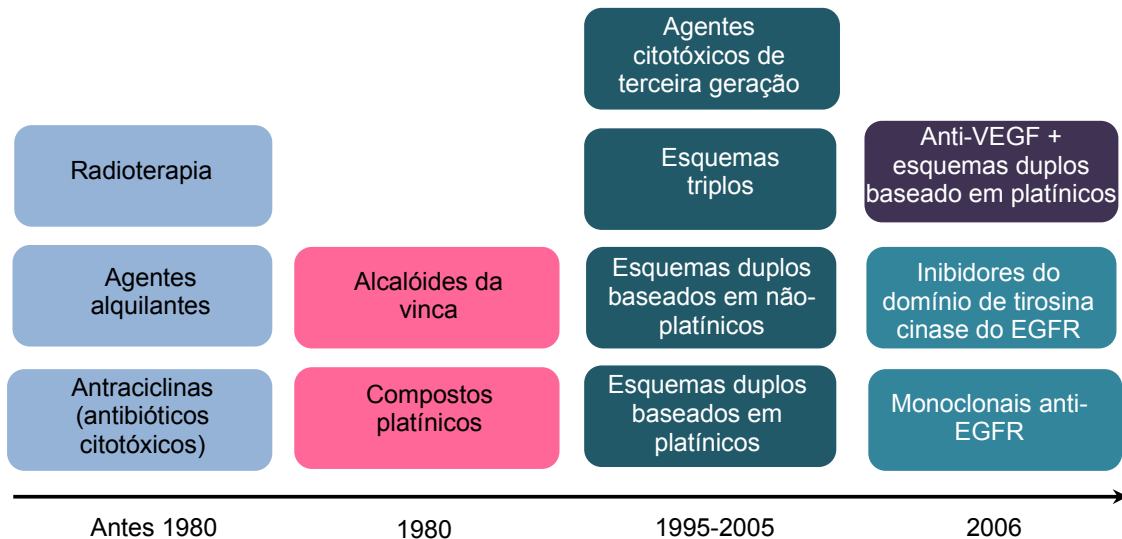
#### 1.3.1. Terapias Convencionais

O tratamento utilizado para o câncer de pulmão é essencialmente o mesmo usado para os outros tipos de câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A escolha do tipo de tratamento vai depender do subtipo histológico e do estadiamento, pois estas são as duas variáveis mais importantes na análise prognóstica do câncer de pulmão (JASSEM, 2007; SIMON & WAGNER, 2003). Para um tumor localizado e em estágio inicial a cirurgia geralmente é indicada podendo ser acompanhada por radio-e/ou quimioterapia. Entretanto, o câncer de pulmão permanece clinicamente silencioso durante a maior parte de sua evolução sendo na maioria dos casos diagnosticado já em estágios avançados. Devido a isto, a quimioterapia ainda constitui uma das principais modalidades terapêutica para o tratamento do câncer de pulmão.

De acordo com Rossi e colaboradores (2004) a cirurgia é o único tratamento para o NSCLC, porém apenas 15–20 % dos tumores podem ser ressecados radicalmente com uma sobrevida de cerca de 40 % em 5 anos. Embora o NSCLC normalmente responda mal à quimioterapia, essa modalidade ainda é utilizada como tratamento para pacientes com doença avançada (RAMALINGAN & BELANI, 2004). No caso de SCLC, a quimioterapia também é o tratamento mais utilizado porque em geral quando a doença é diagnosticada já há presença de metástases extratorácicas que dificultam o uso de cirurgia ou radioterapia (JACKSON & JOHNSON, 2005; STUPP et al., 2004). Entretanto, apesar de responder inicialmente à quimioterapia, o SCLC recidiva em um curto período de tempo, com células de crescimento mais rápido, agressivo e propenso à formação de novas metástases (SIMON & WAGNER, 2003).

Embora por três décadas tenham sido propostos novos esquemas quimioterápicos para o tratamento do câncer de pulmão, essas tentativas não têm obtido bons resultados na melhora substancial dos pacientes (Figura 1). Assim, apesar dos compostos platínicos (cisplatina, carboplatina e outros) serem a base para o tratamento do câncer de pulmão, esquemas de tratamento utilizando esses compostos sozinhos ou em combinação com outros quimioterápicos como gencitabina e/ou paclitaxel e erlotinibe apresentam alta toxicidade para diferentes tipos de órgãos (KIM et al., 2008; RABIK & DOLAN, 2006) e seu impacto no aumento da taxa de sobrevida é pequeno (RECK & GETZEMEIR, 2008; THATCHER, et al., 2006) indicando a necessidade de quimioterápicos direcionados a alvos mais específicos.





**Figura 1:** Evolução no tratamento do câncer de pulmão (Adaptado do RECK & GATZEMEIR, 2008).

### 1.3.2. Terapias Alvo-Direcionadas

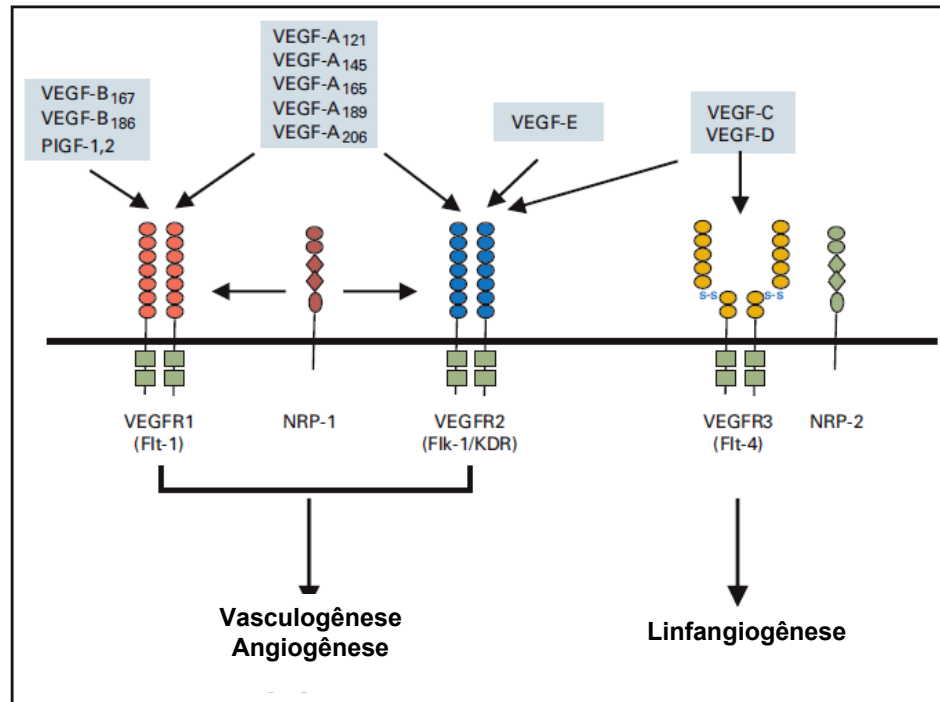
Avanços no estudo da biologia celular do câncer de pulmão têm permitido o desenvolvimento de novos agentes alvo-direcionados envolvidos em vias celulares que promovem crescimento e sobrevivência celular (PEEBLES et al., 2007). Dentre esses se destacam o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), o Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) (GETTINGER, 2008; DANNEBERG et al., 2005). Atualmente uma grande quantidade de dados pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* tem sido gerado com agentes direcionados contra esses alvos (CASCONI et al., 2007; ARAKI et al., 2005; EL-RAYES & LORUSSO, 2004; STUPP et al., 2004).

#### 1.3.2.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

VEGF é uma glicoproteína de 45 kDa, homodimérica que apresenta diferentes membros, VEGF-A, B, C, D, E, e fator de crescimento de placenta (PlGF – do inglês, *placenta growth factor*). VEGF é produzido em células normais e células tumorais, sugerindo que a sinalização de VEGF é mediada através de um mecanismo autócrino e parácrino (KERBEL, 2008) A expressão de VEGF é induzida por Fator 1 induzível por Hipóxia (HIF-1 - do inglês, *hypoxia-inducible factor*), fator de crescimento

derivado de plaqueta (PDGF- do inglês, *platelet derived growth factor*), fator  $\alpha$  – necrose tumoral (TNF- $\alpha$  - do inglês, *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) e fator transformante de crescimento  $\beta$  (TGF-  $\beta$  - do inglês, *transforming growth factor-  $\beta$* ) (NEUFELD et al., 1999).

Todos os membros da família VEGF estimulam a resposta celular. Os VEGFs se ligam a receptores que exibem atividade de tirosina cinase (VEGFRs/ RTK) na superfície da célula, causando a dimerização deles e os tornando ativados através da auto-fosforilação dos resíduos de tirosina cinase na porção citoplasmática. Os membros da família de receptores de tirosina cinase (RTKs) são componentes essenciais na via de transdução de sinais, pois eles desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular, que afeta a proliferação, diferenciação, migração e metabolismo celular (HUBBARD, 1999; STRAWN et al., 1998). Os membros da família de VEGF mostram afinidades por diferentes receptores (Figura 2). Existem três receptores de VEGF já identificados: VEGFR-1/ Flt1, VEGFR-2/ Flk-1/ KDR e VEGFR-3/ Flt-4 e dois co- receptores, NRP-1 e NRP-2. De maneira simplificada, VEGFR-1 e VEGFR-2 estão principalmente envolvidos com a angiogênese e o VEGFR-3 está associado com linfangiogênese e o papel dos co-receptores NRP-1 e NRP-2 ainda não está bem definido (HICKLIN & ELLIS, 2005; PAAVONEN et al., 2000). VEGFR-1 e VEGFR2 são expressos na maioria das células endoteliais enquanto VEGFR-3 é expresso no endotélio linfático e vascular (DVORAK, 2002).

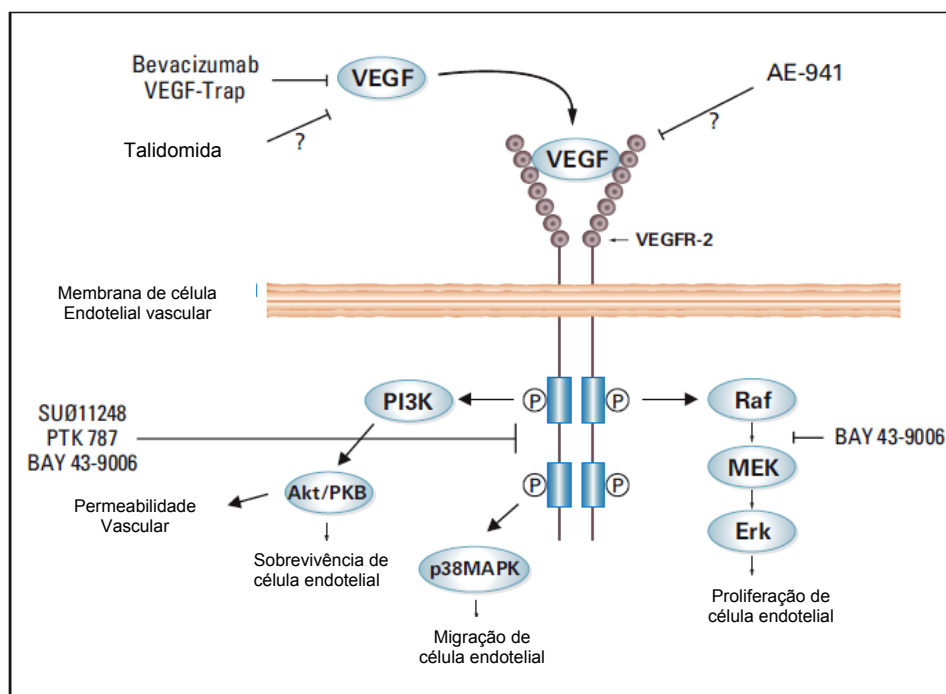


**Figura 2:** Efeito dos membros da família de VEGF e seus receptores na angiogênese tumoral. A ligação dos receptores aos ligantes de VEGF causa sua dimerização e ativação, causando fosforilação do domínio do receptor de tirosina cinase e uma subsequente cascata de sinalização que leva a angiogênese e/ou linfangiogênese. A estimulação do VEGFR-1 e VEGFR-2 por VEGF/VEGF-A e VEGFB em células endoteliais induzem a proliferação, migração e sobrevivência, assim como permeabilidade vascular, todos esses efeitos levando a angiogênese tumoral. VEGF-C e VEGF-D interagem com VEGFR-3 na superfície de células endoteliais linfáticas, levando a linfangiogênese (Adaptado de HICKLIN & ELLIS, 2005).

VEGFR-1 é o receptor do VEGF-A e pode também se ligar ao VEGF-B e ao PGF. Ele é o receptor chave no desenvolvimento da angiogênese (como por exemplo, desenvolvimento de vasos durante a embriogênese), mas parece não ter uma função crítica na angiogênese patogênica; seu papel parece variar com o estágio do desenvolvimento, condições fisiológicas e patofisiológicas e tipo celular. VEGFR-2 medeia à maioria dos efeitos angiogênicos (permeabilidade microvascular, proliferação de células endoteliais, invasão, migração e sobrevivência) por se ligar primariamente ao VEGF-A. Além disso, ele também pode ser ativado por VEGF-C e VEGF-D e trabalhos recentes sugerem que ele pode se auto-ativar. A ativação e sinalização de VEGFR-2 pode ser positivamente e negativamente influenciadas por

co-expressão e ativação de VEGFR-1. VEGFR-3 promove a linfangiogênese e é encontrado apenas em células endoteliais linfáticas. Há evidências que VEGFR-3 tenha um importante papel na manutenção da integridade vascular por modular a atividade de VEGFR-2. Sua ativação tem sido observada em vários tipos de tumores sólidos, incluindo pulmão, e elevados níveis de VEGFR-3 e ligantes (VEGF-C) estão associados com pior prognóstico de pacientes NSCLC (ARINAGA et al., 2002)

Como já mencionado VEGF é considerado um mediador chave da angiogênese e esta (angiogênese) é considerada um fator crítico, para a proliferação e crescimento do tumor tanto quanto para metástase. Assim, o bloqueio do VEGF e conseqüentemente da angiogênese (VEGF), se oferece como uma nova estratégia de tratamento para pacientes com câncer. Como mostrado na figura 3, vários agentes anti-angiogênicos como, por exemplo, bevacizumab, VEGF-Trap e talidomida (inibidores do VEGF), vendetanib e sorafenib (inibidor do VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3), AE-941 (inibidor do VEGFR-2) SUO11248, PTK787 e BAY 43-90006 (inibidores da atividade de tirosina cinase) (RINI & SMALL, 2005) já foram descritos na literatura. Entretanto, além de não modificar significativamente a sobrevida dos pacientes, o uso de compostos contra VEGF apresenta uma série de efeitos secundários (CABEBE et al., 2007).



**Figura 3:** Mecanismo da atividade dos diferentes inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Adaptado de RINI & SMALL, 2005).

### 1.3.2.2 Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR)

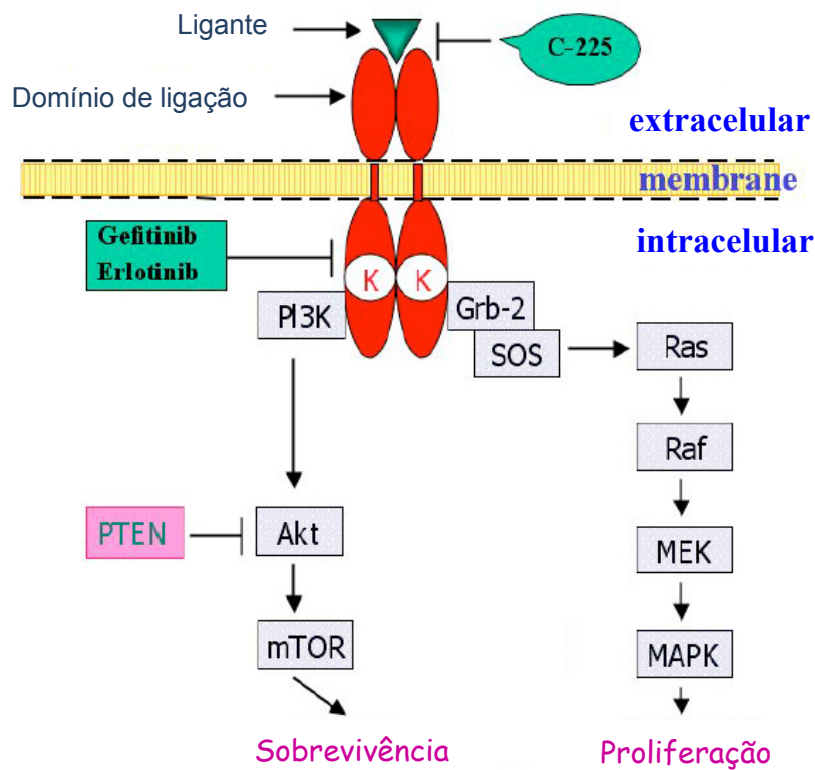
O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) é uma glicoproteína de membrana plasmática composta de um domínio de ligação extracelular e de um domínio intracelular com atividade de tirosina cinase. O EGFR é um membro da família de fatores de crescimento HER que inclui HER-1 (EGFR/ ErbB-1), HER-2 (ErbB-2), HER-3 (ErbB-3) e HER-4 (ErbB-4). São importantes mediadores do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. Existem vários ligantes que se acoplam ao EGFR, tais como o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator transformador de crescimento alfa (TGF- $\alpha$ ), anfirregulina, e outros (DANNENBERG et al., 2008). A ligação do EGF ao seu receptor ativa uma cascata de eventos mediada pela via de Ras/MAPK que resulta na fosforilação de ERK/MEK e na transcrição de fatores que levam à progressão do ciclo celular. A ativação dessa via

estimula a proliferação de células tumorais, a produção de fatores angiogênicos (VEGF), metastático (de invasão) e de fatores responsáveis pela inibição da apoptose e desse modo, promove o crescimento e progressão do tumor (CITRI & YARDEN., 2006).

Cerca de um terço de todos os tumores epiteliais, tais como câncer colorretal, de cabeça e pescoço, pâncreas, mama e pulmão superexpressam os receptores de EGF. No câncer de pulmão, vários relatos têm demonstrado que a superexpressão de EGFR em NSCLC (62 % de casos) está correlacionada com um mau prognóstico (HIRSCH et al., 2003). Essa expressão é maior em carcinoma de células escamosas (~80 %) seguida de adenocarcinoma (~40 %) (RUSCH et al., 1993).

A terapia dirigida contra o EGFR tornou-se realidade com a criação de anticorpos específicos para os membros da família de EGFR, como cetuximab, lapatinib e também de agentes que atuam diretamente na tirosina cinase, tais como o gefitinib (Iressa®) e Erlotinibe (OSI-774/ Tarceva®) (CIARDIELLO & GIAMPAOLO, 2008; SHARMA et al., 2007 e CHEN et al., 2005). Dentre os diferentes compostos alvo-específicos para EGFR alguns têm ganhado destaque como, por exemplo, o Gefitinib®, uma anilinoquinazolina que funciona como um inibidor do receptor do fator crescimento epidermal de tirosina cinase (EGFR-TK), por se ligar ao domínio intracelular de tirosina cinase de EGFR (Figura 4). O efeito desse composto tanto em células em cultura como em pacientes com NSCLC é bloquear a transdução de sinal (SEQUIST & LINCH, 2008). Outro composto que tem sido proposto como alternativa para o tratamento de pacientes com NSCLC é o cetuximab (C225), um anticorpo monoclonal quimérico, que age diretamente no domínio extracelular de ligação do EGFR, bloqueando a ligação do fator de crescimento e a transdução de sinal (Figura 4) (CIARDIELLO & GIAMPAOLO, 2008; ROSSI et al., 2006).

Por se tratar de agentes que especificamente bloqueiam vias críticas para o desenvolvimento e progressão de células neoplásicas, eles têm fornecido uma nova direção à terapêutica antineoplásica e também na angiogênese. Entretanto, apesar da dramática melhora observada em alguns pacientes de NSCLC tratados com inibidores de tirosina cinase (TIKs), de forma específica o composto só age sobre pacientes que apresentam mutações dos exons 17-22 (ENGELMAN & JANNE, 2008; CHEN, 2005), o aumento da sobrevida é reduzido e o desenvolvimento de resistência adquirida é um fenômeno freqüente (ENGELMAN & JANNE, 2008).



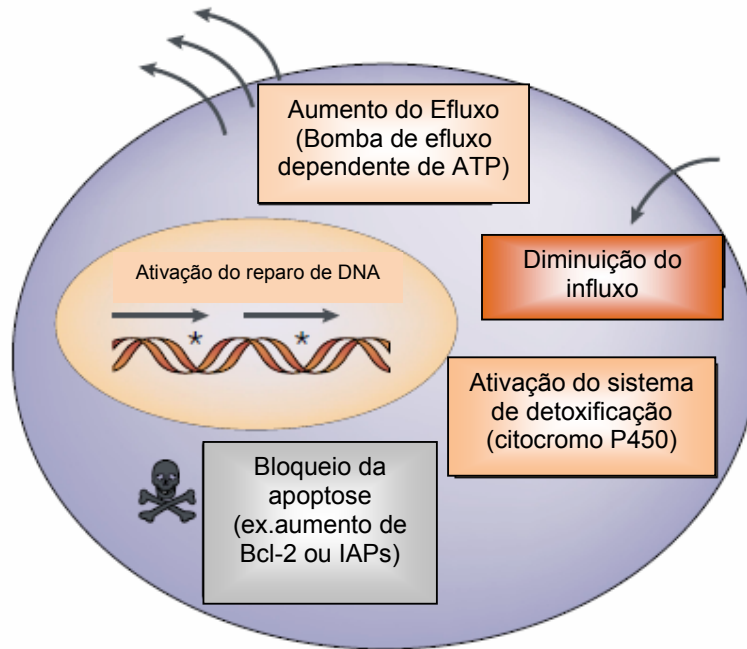
**Figura 4:** Via de sinalização de EGFR (Adaptado de CHEN, 2005).

#### **1.4. Resistência Múltiplas Drogas (MDR)**

Como descrito nos tópicos anteriores, mesmo com o advento de drogas alvo-direcionadas, as estratégias usadas para o tratamento do câncer de pulmão resultaram em um aumento significativo na sobrevida dos pacientes (RECK & GATZEMEIR, 2008). Tem sido proposto que esse quadro seja devido à expressão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) que, sendo um dos responsáveis pela falha quimioterápica no câncer de pulmão, propiciaria condições favoráveis ao desenvolvimento de metástases, a principal causa da morte no câncer.

Clinicamente, a MDR é definida pela resistência cruzada a diversos quimioterápicos não relacionados, que divergem entre si quanto à estrutura, modo de ação e alvo celular (GOTTESMAN & PASTAN, 1993). A princípio acreditava-se que a MDR estava relacionada a um único mecanismo molecular. Hoje, está bem claro que esse fenótipo é multifatorial podendo ser conferido por vários mecanismos de resistência, que coexistem numa mesma célula tumoral tornando-a refratária ao tratamento (BAIRD & KAYE, 2003). Dentre os mecanismos responsáveis pela MDR, podemos destacar (Figura 5): (1) ativação ou superexpressão de moléculas transportadoras que levam à diminuição do acúmulo de droga pela célula; (2) detoxificação do quimioterápico na célula; (3) alterações de alvos da droga ou aumento de reparo do alvo danificado e (4) inibição de apoptose (via mutações de p53, ativação de Bcl-2) e superexpressão de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) (GOTTESMAN et al., 2002).

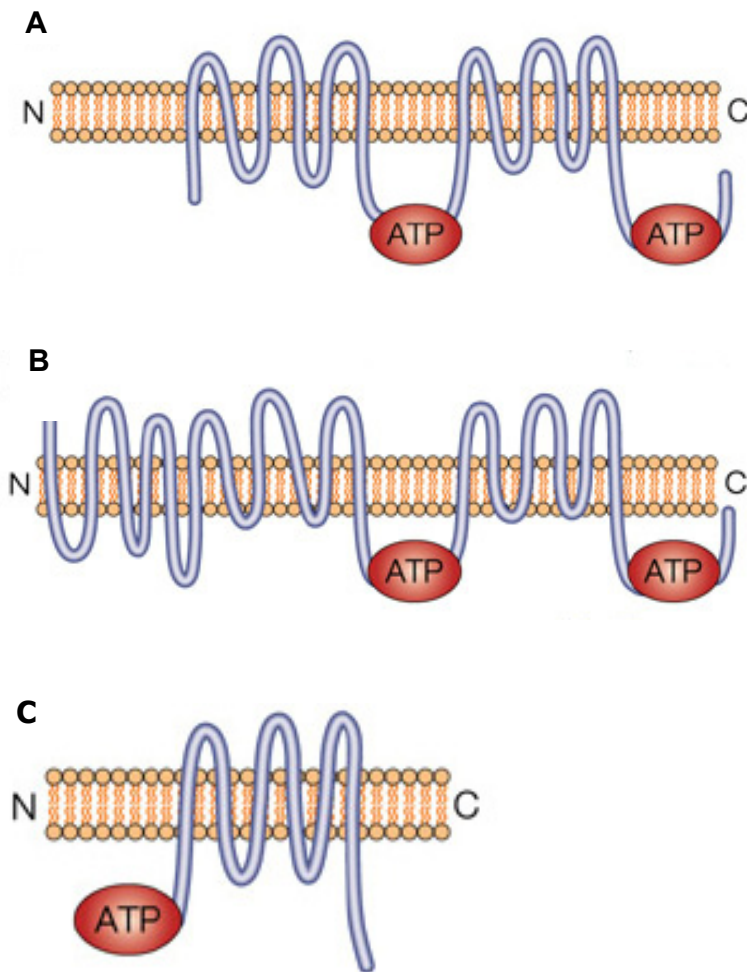




**Figura 5:** Fatores celulares que causam resistência a drogas (Adaptado de GOTTESMAN et al., 2002).

Um dos mecanismos de MDR mais bem conhecido resulta da ativação ou superexpressão de proteínas da família de transportadores ABC (do inglês, *ATP Binding-Cassette*), como a glicoproteína P, Pgp/ABCB1 (JULIANO & LING, 1976), a proteína associada à multiresistência MRP1/ABCC1 (COLE et al., 1992) e a proteína relacionada à resistência à mitoxantrona MXR/BCRP/ABCG2 (DOYLE, 1998; BATES et al., 2001). Muitos quimioterápicos são substratos para essas proteínas, que os translocam para o exterior da célula reduzindo sua concentração a níveis sub-letais e desse modo, evitando a morte da célula.

A glicoproteína P (Pgp/ABCB1) (Figura 6A), produto do gene MDR1 foi inicialmente identificada em linhagens de células tumorais associada com resistência cruzada e múltiplos agentes citotóxicos não relacionados estruturalmente ou



**Figura 6:** Modelo de estrutura das proteínas MDR. **(A)** Glicoproteína P, **(B)** Proteína Associada à Múltipla Resistência 1 e **(C)** Proteína de Resistência de Câncer de Mama (Adaptado de GOTTESMAN et al., 2002).

funcionalmente (JULIANO & LING, 1976). A Pgp/ABCB1 humana é uma proteína transmembranar glicosilada e fosforilada, de 170 kDa, composta por 1200 aminoácidos que formam doze domínios transmembranares hidrofóbicos e contém dois sítios intracelulares de ligação de ATP. A Pgp/ABCB1 transporta, principalmente, substratos hidrofóbicos, compostos orgânicos neutros e catiônicos. Dentre essas substâncias, podem destacar-se várias classes de quimioterápicos como as antraciclina (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina), alcalóides da vinca

(vinblastina e vincristina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), epipodofilotoxinas (etoposídeo, teniposídeo), topotecan e mitoxantrona (CASCORBI, 2006; NOBILI *et al.*, 2006) (Tabela 3). Além de drogas citotóxicas, a Pgp/ABCB1 também é capaz de transportar outros tipos de substâncias, tais como cortisol e aldosterona (UEDA *et al.*, 1992), agentes retrovirais utilizados no tratamento da AIDS (Ritonavir, Indinavir, Saquinavir) (LEE *et al.*, 1998) e corantes fluorescentes (como a Rodamina 123 e a Calceína-AM) (AMBUDKAR *et al.*, 1999).

A proteína associada à resistência a múltiplas drogas 1 (MRP1/ABCC1- do inglês, *Multidrug Resistance Protein 1*), foi descoberta por Cole e colaboradores (1992) (Figura 6B). É uma proteína de 190 kDa e 1531 aminoácidos com 17 segmentos transmembrana e, como a Pgp/ABCB1 possui dois sítios intracitoplasmáticos de ligação de ATP mas sua porção N-terminal extracelular. Embora vários membros da família ABCC tenham sido identificados, a MRP1/ABCC1 é a mais bem estudada. Em geral, a MRP1/ABCC1 transporta substâncias hidrofóbicas, aniônicas e ânions orgânicos como a glutationa (GSH), glucoronídeo e sulfato (LESLIE *et al.*, 2005). Dentre as substâncias transportadas pela proteína MRP1/ABCC1 podemos citar: drogas antineoplásicas, antivirais, antibióticos e sondas fluorescentes (Tabela 3). Ela também faz o transporte de drogas conjugadas à GSH (Doxorubicina-SG e Clorambucil-SG) ou a glucoronídeo (Etoposídeo-Gluc) além dos metabólitos endógenos conjugados ou não à GSH, glucoronídeo ou a sulfato (SHAROM, 2008; COLE & DEELEY, 2006; CASCORBI, 2006; NOBILI *et al.*, 2006; HAIMEUR *et al.*, 2004; LESLIE *et al.*, 2003).

**Tabela 2:** Quimioterápicos identificados como substratos de alguns dos transportadores ABC.

<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Sistemático</b>	<b>Quimioterápicos Transportados</b>
MDR1	ABCB1	Doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, mitoxantrona, vincristina, vinblastina, paclitaxel, docetaxel, etoposídeo, teniposídeo, actinomicina D, irinotecano, topotecano, imatinibe.
MDR2	ABCB4	Paclitaxel, cisplatina, etoposídeo, alcaloide da vinca, antraciclinas, vinblastina.
MRP1	ABCC1	Daunorubicina, doxorubicina, etoposídeo, metotrexato, clorambucil, vincristina, vinorelbina.
MRP2	ABCC2/cMOAT	Doxorubicina, mitoxantrona, metotrexato, vincristina, etoposídeo, cisplatina, SN38G.
MRP3	ABCC3	Doxorubicina, teniposídeo, metotrexato, vincristina, etoposídeo, cisplatina.
MRP4	ABCC4	Metotrexato, tiopurinas.
MRP5	ABCC5	Tiopurinas, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina.
MRP6	ABCC6	Daunorubicina, doxorubicina LTC4, glutationa, cisplatina,
MRP7	ABCC10	Vincristina, vinblastina, paclitaxel, docetaxel
MRP8	ABCC11	5-fluoracil, MTX (edatrexato, ZD1694)
MRP9	ABCC12	Desconhecido
BCRP, MXR, ABCG2	ABCG2	Doxorubicina, daunorubicina, mitoxantrona, topotecano, lurtotecano.

Adaptado de LIU et al., 2010; NOBILI et al., 2006, GOTTESMAN et al., 2002.

Células que superexpressam a proteína MRP1/ABCC1 são resistentes a um grande número de quimioterápicos disponíveis na clínica, dentre eles vários compostos hidrofóbicos que também são substratos da Pgp/ABCB1 (CHANG, 2007).

A proteína da resistência do câncer de mama humano (BCRP/MXR/ABCG2- do inglês, *Breast Cancer Resistance Protein*) (Figura 6C), descoberta em uma linhagem celular de câncer de mama (MCF-7/Adr/Vp) (DOYLE, 1998), é uma proteína de 72 kDa que possui seis domínios transmembranares e apenas um sítio de ligação para nucleosídeo. Sua expressão está relacionada à baixa resposta a quimioterapia. Ela tem capacidade de extrair moléculas grandes e hidrofóbicas tanto positiva quanto negativamente carregados que incluem diversos quimioterápicos, anti-virais, antibióticos, etc. (PÉREZ-TOMÁS, 2006; POLGAR et al, 2008).

Ao contrário das proteínas transportadoras da família ABC, a proteína relacionada à resistência pulmonar (LRP- do inglês, *Lung Resistance Protein*), descrita por Scheper e colaboradores (1993) em uma linhagem derivada do câncer de pulmão, é uma proteína citoplasmática que atua interferindo no tráfego núcleo-citoplasma (STAVROVSKAYA, 2000; IZQUIERDO et al., 1996) e não extrai compostos das células como fazem as proteínas descritas anteriormente.

A resistência a múltiplas drogas ainda é considerada um dos principais entraves terapêuticos para o câncer. A presença de proteínas de resistência (Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1, BCRP e LRP) já foi descrita em células de linhagens e de pacientes com câncer de pulmão (DOUBRE et al., 2005; VAN DE DEEN et al., 2005). A observação de que células do epitélio pulmonar expressam proteínas MDR (GIACCOME et al., 1996) e de que essa expressão aumenta durante o processo de diferenciação das células, poderia explicar a baixa resposta do câncer de pulmão à quimioterapia. Em NSCLC, a expressão de MRP1/ABCC1 tem sido correlacionada com a resistência à quimioterapia e à baixa taxa de sobrevida global (D'AMATO et al., 2006; OTA et al, 1995; OSHIKA et al., 1998). Os níveis de expressão de Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1 estão aumentados nas metástases pulmonares

detectadas após o relapso, sugerindo um papel dessas proteínas na sobrevivência das células tumorais durante a quimioterapia e desenvolvimento de metástases (TRILLER et al., 2006; BERGER et al., 2005).

### **1.5. Estratégias Terapêuticas contra a Resistência a Múltiplas Drogas**

Devido ao fato da maioria dos tumores de pulmão não poderem ser ressecados cirurgicamente devido ao estágio avançado, a quimioterapia acaba se tornando a modalidade terapêutica mais utilizada e, dentre os diferentes quimioterápicos, os platínicos são consideradas drogas chave no tratamento do câncer de pulmão. A resistência a compostos platínicos tem sido reportada como um entrave na melhora dos pacientes tratados com esses compostos, pois os tumores que não são intrinsecamente resistentes, rapidamente desenvolvem resistência adquirida a outros agentes quimioterápicos com ação não relacionada aos platínicos. Tem sido mostrado que a resistência aos platínicos é devido a diferentes fatores, dentre eles o aumento do efluxo de bombas e detoxificação intracelular pela glutathione (RABIK & DOLAN, 2006; STEWART et al., 2007; STEWART et al., 2004).

Uma das estratégias clínicas desenvolvidas para reverter o fenótipo de MDR mediado pelas bombas de efluxo envolve o uso de compostos capazes de inibir os transportadores ABC e, conseqüentemente, aumentar o acúmulo intracelular de agentes antitumorais (CHOI, 2005). Os estudos com inibidores das proteínas transportadoras iniciaram na década de 80, utilizando drogas já em uso na clínica para outras finalidades (THOMAS & COLEY, 2003; LISCOVITCH & LAVIE, 2002). Como a afinidade desses compostos para a Pgp/ABCB1 era baixa, sua inibição requeria o uso de altas doses dos mesmos, o que resultou em uma toxidez inaceitável. Essas limitações fizeram com que, nas últimas décadas, um grande

esforço fosse dedicado ao desenvolvimento de inibidores mais potentes e menos tóxicos. Assim, uma segunda geração de moduladores, composta, principalmente, por análogos dos inibidores da primeira geração, incluía drogas como o dexverapamil e o PSC833/valsopodar (derivados do verapamil e da ciclosporina A, respectivamente) (LISCOVITCH & LAVIE, 2002). Entretanto, embora mais eficientes que os compostos originais, esses inibidores ainda apresentavam alta toxidez e baixa seletividade, o que limitava sua utilização clínica. Numa terceira geração foram obtidos compostos que inibiam especificamente a proteína transportadora e não alteravam a farmacocinética plasmática de agentes anti-câncer co-administrados (THOMAS & COLEY, 2003). Vários desses compostos estão em fase de testes clínicos em diversos tipos de tumores (OZBEN, 2006). Um dos compostos mais promissores, o tariquidar (XR-9576), que se encontra em fase III de testes clínicos, tem mostrado tanto um alto potencial inibidor quanto uma alta seletividade para a Pgp; porém, ainda não foi aprovado para uso clínico (FOX & BATES, 2007) (Tabela 4). Existem alguns inibidores específicos para os membros da família MRP, como

**Tabela 3:** Inibidores das proteínas MDR.

---

<b>Pgp/ABCB1:</b>	<b>MRP1/ABCC1:</b>
Antranilamida	MS-209*
Ciclosporina D	XR-9576 (Tariquidar)*
NSC-38721	VX-710 (Biricodar)*
Pipecolinato	Isotiocianatos*
Quinolina	tRA 98006*
OC-144-093	Agosterol A*
PSC-833 (Valspodar)	Rifampicina
MS-209*	MK571
LY-335979 (Zosoquidar)	Quercetina
XR-9576 (Tariquidar)*	Indometacina
R-101933 (Laniquidar)	Genesteina
VX-710 (Biricodar)*	ONO-1078
GF-120918 (Elacridar)*	LY475770
ONT-093	LY402913
Isotiocianatos*	NSAIDs
Diallil sulfido	
PK 11195	<b>BCRP/ABCG2:</b>
Amooranina	GF-120918 (Elacridar)*
siRNA	tRA 98006*
tRA 98006*	Flavonóides*
Agosterol A*	Fitoestrógenos
Flavonóides*	Imatinibe mesilato
	Fumitremorgina C
	TAG- 139

---

Adaptado de LIU et al., 2010; OZBEN, 2006.

\* Inibidores não específicos.

por exemplo, o MK571 antagonista o do receptor LTD<sub>4</sub>, ele inibe ambas MRP1 e MRP2; ONO1078, outro antagonista do receptor de leucotrieno, e tem sido demonstrado que este inibidor é capaz de reduzir o efluxo de LTC<sub>4</sub> em linhagens de câncer de pulmão bloqueando assim função de MRP1/ABCC1 (ZHOU et al., 2008;



BORST et al., 2002) e inibidores com alta especificidade para MRP1/ABCC1 (LY475770 e LY402913) (MAO et al., 2002).

Apesar dos esforços desenvolvidos, até o momento, nenhum inibidor específico para os transportadores MDR foi aprovado para uso clínico. Uma vez que as proteínas MDR também são expressas em tecidos normais, onde desempenham funções fisiológicas, o uso dessas substâncias é acompanhado de uma série de efeitos colaterais indesejáveis, como mielosupressão (LEE, 2004). Na tentativa de resolver esse problema novas estratégias para reverter o fenótipo MDR, tais como o uso de oligonucleotídeos e tecnologia de RNA de interferência (siRNA) tem sido desenvolvidas. Essas abordagens têm se mostrado efetivas *in vitro*, mas ainda não estão em uso clínico (RUMPOLD et al., 2005; LAGE, 2006; STEIN et al., 2008). Outra estratégia de grande interesse é a utilização de compostos citotóxicos que não sejam substratos para as proteínas transportadoras e que exerçam seu efeito independente da presença de transportadores (NOBILI et al., 2006). Dada a inespecificidade das proteínas transportadoras e o seu impacto na sobrevivência dos pacientes, a busca por esse tipo de compostos é de grande interesse clínico.

### **1.6. Mecanismos de Resistência a Apoptose**

Independente de sua origem, natural ou sintética, os quimioterápicos são substâncias que possuem alta atividade citotóxica e são capazes de inibir o crescimento ou causar a morte celular tumoral via indução de necrose ou apoptose. Na necrose, que geralmente ocorre em resposta a uma injúria aguda, o aumento do volume causa o rompimento da membrana plasmática e a liberação do conteúdo citosólico no espaço extracelular induzindo uma resposta inflamatória. Já a apoptose, é um programa de morte celular evolutivamente conservado que ocorre,

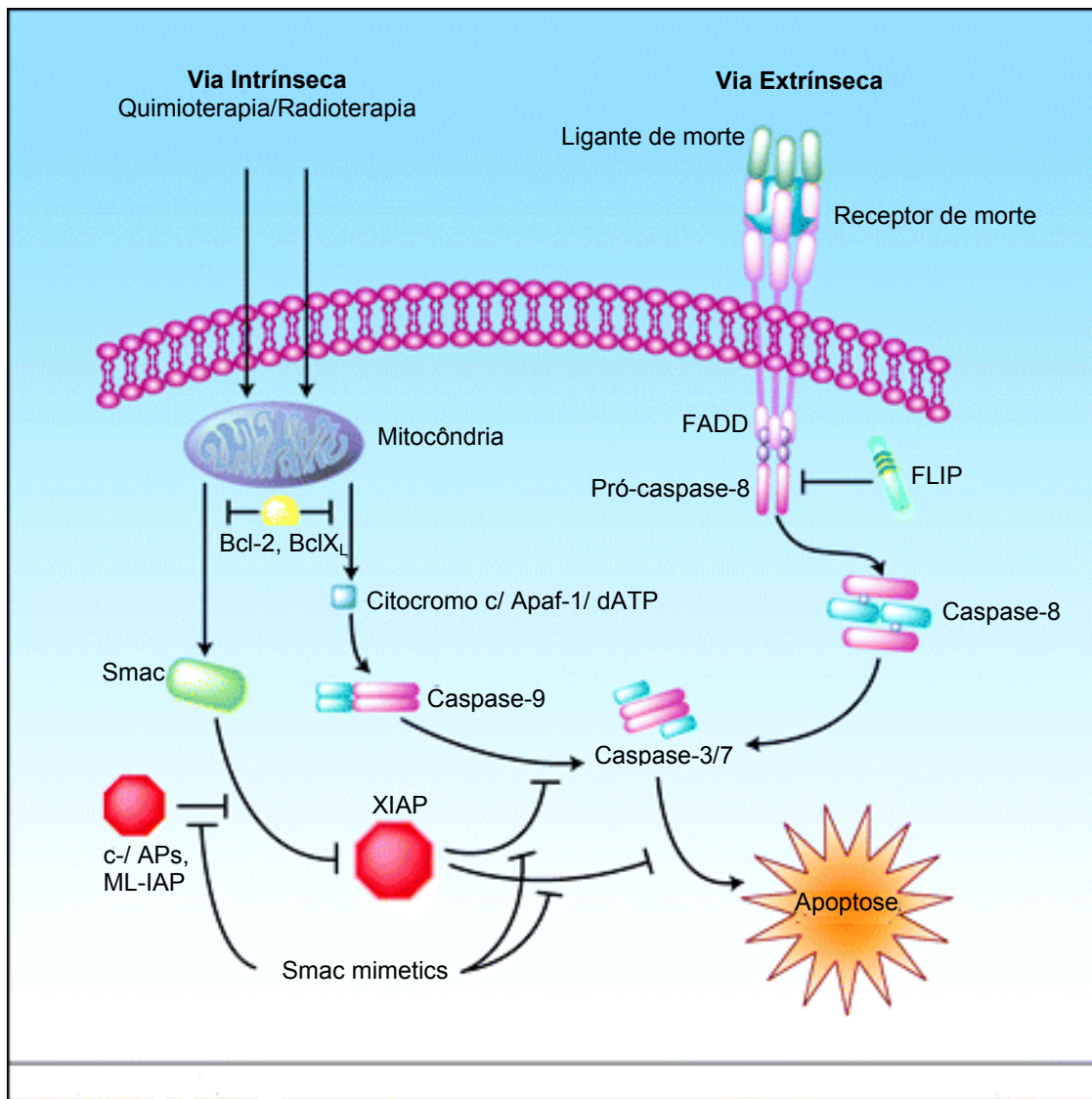
na maioria das células, em diversas situações fisiológicas e patológicas (LEIST, 2001). O processo apoptótico é caracterizado por diversas alterações morfológicas que incluem a diminuição do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, “blebs” de membrana e formação de corpos apoptóticos. Esse processo é mediado por uma série de reações bioquímicas que incluem a ativação de uma cascata de cisteína-proteases denominadas caspases (do inglês, *cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) (FUENTES-PRIOR & SALVESSEN, 2004; EARNSHAW et al., 1999). As caspases podem ser divididas em dois grupos: iniciadoras e efetoras. Uma vez ativadas, as caspases iniciadoras (-2, -8, -9 e -10) são capazes de ativar as efetoras (-3, -6 e -7) que são as responsáveis pela clivagem de substratos intracelulares, tais como ICAD (do inglês, *Inhibitor Caspase Activated DNase*) com conseqüente liberação de CAD (do inglês, *Caspase Activated DNase*) endonuclease responsável pela degradação internucleossomal do DNA. As caspases efetoras também são responsáveis pela clivagem e ativação de gelsolina, uma proteína que regula a dinâmica da actina; clivagem da lamina, proteína estrutural mais abundante do envelope nuclear; ativação do fator condensador de cromatina (Acinus), clivagem de PARP (PARP- do inglês, *Poli-ADP Ribose Polimerase*), enzima envolvida no reparo do DNA. Este conjunto de eventos leva ao desmantelamento e morte celular (HENGARTNER, 2000; ZÖRNIG et al., 2001; KAUFMANN & EARNSHAW, 2000).

A indução da apoptose pode ser mediada por duas vias principais: a via extrínseca e a via intrínseca (Figura 7). A via extrínseca, também conhecida como via dos receptores de morte, requer o envolvimento de receptores da membrana citoplasmática (Figura 7) que são membros da superfamília de Receptores de Fatores de Necrose Tumoral (TNFR). Os mais bem caracterizados são TNFR, Fas e

TRAIL-R, possuem um domínio de morte (DD). Quando um ligante, TNF, Fas ligante ou TRAIL respectivamente, se associa a um dos desses receptores, ele se oligomeriza e sofre mudanças conformacionais e recrutando as moléculas adaptadoras FADD ou TRADD/FADD (FULDA & DEBATIN, 2006) que medeiam a interação do receptor ativado com a procaspase-8. Juntos, receptor, FADD ou TRADD/FADD e procaspase-8 formam o complexo indutor de morte conhecido como DISC (do inglês, *Death Inducing Signaling Complex*), no qual a procaspase-8 sofre uma auto-ativação proteolítica passando a ser chamada de caspase-8 (WAJANT et al., 2005). Esta por sua vez ativa diretamente a procaspase-3, uma caspase efetora que então cliva outras proteínas envolvidas na morte celular (FULDA & DEBATIN, 2006; BUDIHARDJO, et al., 1999).

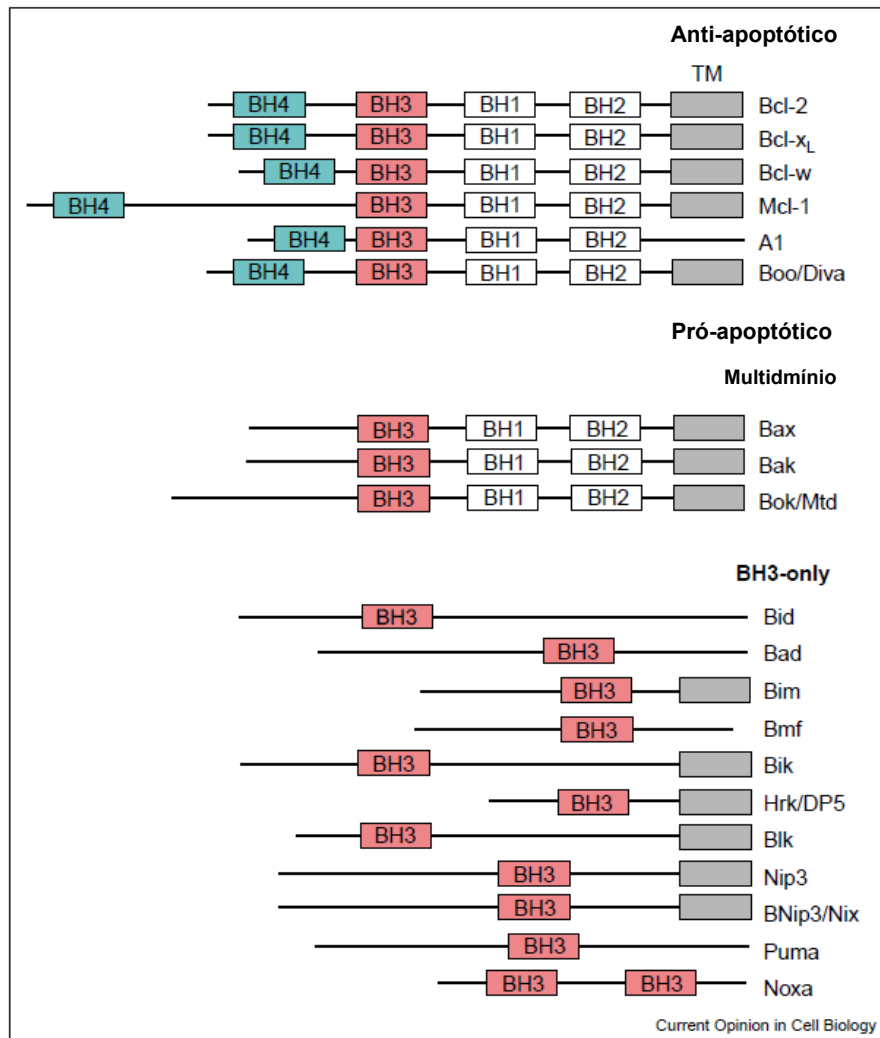
Ativação da via intrínseca é caracterizada pelo envolvimento da mitocôndria no processo apoptótico. Nesta via alguns tipos de agentes anti-neoplásicos, radiação UV e outros estímulos citotóxicos são capazes de perturbar a estabilidade das membranas mitocondriais e levar a liberação para o citosol de proteínas pró-apoptóticas anteriormente presentes no espaço intermembranar mitocondrial. Entre elas pode-se citar o citocromo c (BOSSY-WETZEL & GREEN, 1999), que interage com a molécula adaptadora Apaf-1 (do inglês, *Apoptotic Protease Activating Factor-1*) na presença de desoxiadenosina trifosfato (dATP) ou trifosfato de adenosina (ATP) e pró-caspase 9, formando um complexo denominado apoptossomo (BOSSY-WETZEL & GREEN, 1999) onde a pró-caspase-9 é processada e ativada (KUMAR et al., 2002; CAI et al., 1998). Uma vez ativada, a caspase -9 cliva as caspases efectoras -3, -6 e -7 possibilitando que exerçam suas atividades (KROEMER et al., 2007; SRINIVASULA et al., 1998). Outras proteínas mitocondriais liberadas no citosol têm atividade pro-apoptótica. Entre elas encontram-se o fator indutor de

apoptose (AIF) que induz condensação e fragmentação de DNA independente de caspase e Smac/Diablo que neutraliza o efeito inibitório das proteínas inibidoras de caspases (LOO et al., 2002) (Figura 7).



**Figura 7:** Representação esquemática das principais vias de sinalização apoptótica (Adaptado de VUCIC & FAIRBROTHER, 2007).

Para que possa haver liberação das proteínas pro-apoptóticas do espaço intermembranar é necessário que a membrana externa da mitocôndria se torne permeável a estas proteínas. Dois mecanismos tem sido proposto para explicar o processo de permeabilização da membrana mitocondrial externa. O primeiro envolve a indução de uma alteração transitória da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria ocasionada pela abertura do Poro de Permeabilidade de Transitória (PTP) (GOGVADZE et al., 2006) que é um canal iônico aberto em resposta ao aumento da concentração de cálcio na mitocôndria ou ao estresse oxidativo (SHARPE et al., 2004). O segundo mecanismo de permeabilização de membrana externa mitocondrial envolve a atividade de membros da família de proteínas Bcl-2. As proteínas da família Bcl-2 podem ser divididas em três grupos de acordo com sua função: pró-apoptóticas Bax-like (Bax, Bak e Bok) e BH3-only (Bid, Bad, Bim, etc.) e anti-apoptóticas Bcl-2-like (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1, Mcl-1) (Figura 8). As proteínas anti-apoptóticas do grupo Bcl-2-like são funcionalmente opostas às proteínas dos grupos Bax-like e BH3-only, que são pró-apoptóticas. A maioria das proteínas Bcl-2-like contém quatro domínios de homologia com os domínios BH de Bcl-2: BH1, BH2, BH3, e BH4. Proteínas Bax-like contém dois ou três domínios BH e proteínas BH3-only contém apenas o domínio BH3. Maioria dos membros da família Bcl-2 também expressam um domínio de trans-membrana (TM) que facilita a localização na membrana mitocondrial (KARIST et al., 2007; ADAMS et al., 2007; FESIK et al., 2005; BURLACU, 2003). As proteínas da família Bcl-2 interagem entre si formando homo- e heterodímeros e o balanço dessas interações pode definir o estado pró ou anti-apoptótico da célula (OLTAVI & KORSMEYER, 1993).

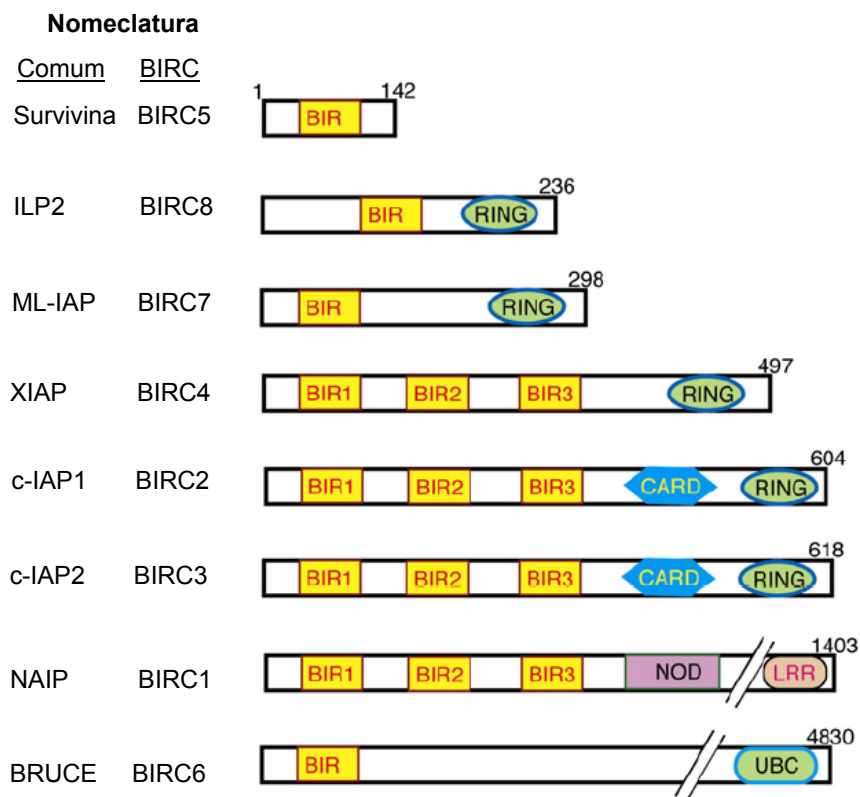


**Figure 8.** Diagrama esquemático das proteínas da família Bcl-2 (Adaptado KUWANA & NEWMAYER, 2003).

A proteína pró-apoptótica Bax, que em células saudáveis se localiza no citosol na forma de monômeros, em células apoptóticas sofre uma mudança conformacional, a qual favorece a exposição de um sítio específico possibilitando a formação de homodímeros que se translocam para a mitocôndria onde se inserem na membrana mitocondrial externa (BURLACU, 2003). O complexo protéico composto por Bax dimerizado forma um canal que leva à permeabilização da membrana mitocondrial externa e à conseqüente liberação de citocromo c e outras

moléculas pro-apoptóticas (CORY & ADAMS, 2002). Proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 representam um atrativo alvo para o tratamento do câncer. Elas são superexpressas em diferentes tipos de câncer: pulmão (DUAN et al., 2009), pâncreas (MORTENSON et al., 2007), ovário (ANDERSON et al., 2009), mama (FERENC et al., 2009) entre outros e a sua superexpressão está correlacionada com baixa sobrevida, progressão da doença, resistência a vários agentes citotóxicos e radioterapia (MANO et al., 1999). Baseando-se nestas observações uma variedade de inibidores das proteínas da família Bcl-2 têm sido desenvolvido e utilizado na clinica com o objetivo de restaurar o processo natural de morte celular programada (apoptose). Dentre estas agentes podemos citar: G3139 (BEDIKIAN et al., 2006), ABT-263 (TSE et al., 2008), ABT -737 (DAÍ & GRANT, 2007; STEPHEN, et al., 2007) alguns são citotóxicos e capazes de induzir a apoptose e outros são capazes apenas de potencializar a atividade de outros quimioterápicos.

Outro grupo de proteínas capazes de inibir a apoptose é a família das IAP (do inglês, *Inhibitor of Apoptosis Protein*) da qual já foram descritos oito membros em humanos: survivina, XIAP, c-IAP1, c-IAP-2, NAIP, ILP2, ML-IAP, e BRUCE (NACHIMIAS et al., 2004) (Figura 9). As IAPs exercem o seu papel anti-apoptótico através da capacidade de inibir a atividade das caspases iniciadora -9 e efetoras -3 e -7 (SCOTT et al., 2005; DEBATIN, 2004). Durante a apoptose as IAPs são removidas por um fator/proteína mitocondrial denominada Smac/DIOBLO (do inglês, *Second mothocondria-derived activator of caspase/Direct IAP-Binding Protein with Low pl*). Após o dano mitocondrial, a Smac/DIABLO é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo c. Enquanto o citocromo c liga-se à APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9, Smac/DIABLO remove as IAP de sua ligação inibitória com as caspases promovendo uma maior



**Figura 9:** Representação esquemática da família das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) em humanos (Adaptado SRINIVASULA et al., 2008)

susceptibilidade a apoptose (DOHI et al., 2004; DU et al., 2000). Superexpressão de membros desta família de inibidoras de apoptose estão associadas ao aumento de casos de diversos tipos de câncer e a resistência do tumor a quimioterapia. Dentre os diferentes tipos de IAPs descritas pode-se citar a survivina, proteína essencial na regulação do processo de mitose e inibição da apoptose, cuja superexpressão tem sido descrita em diversos tipos de câncer (KREPELLA et al., 2009; KIM et al., 2009; ROMAGNOLI et al., 2008; HOFMANN et al., 2002). As estratégias terapêuticas que têm sido desenvolvidas para bloquear a atividade anti-apoptótica desta proteína, incluem oligonucleotídeos anti-sense (LY2181308 - segunda geração) e oligonucleotídeo 4003 (OLIE et al., 2000) e moléculas inibidoras da função da survivina como YM115 (IWASA et al., 2008; KARAVASILIS et al., 2007) e EM011



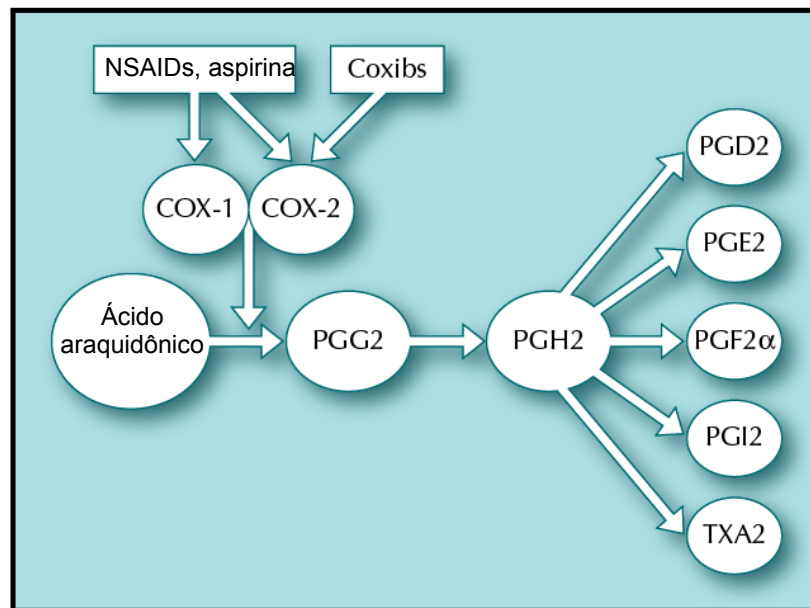
(KARNA et al., 2009). Entretanto, apesar de sua alta especificidade, a atividade antitumoral, desses inibidores é modesta e tem sido sugerido que elas podem ser melhor usados em combinação com a quimioterapia convencional (MITA et al 2008).

Apesar da resposta a quimioterapia pode ser modulada em diversos pontos, como demonstrado até momento, a expressão constitutiva de algumas proteínas-chave constitui um evento central que regula diversas vias que juntas podem levar a resistência. A participação direta ou indireta dessas proteínas-chave, na modulação de respostas envolvidas em diferentes vias que levam a progressão do tumor, as torna um alvo multi-fatorial. Uma das proteínas com estas características que está sob intensa investigação é a ciclooxigenase-2.

### **1.7. Ciclooxigenase-2 como Alvo na Quimioterapia do Câncer.**

Estudos epidemiológicos mostrando que pacientes que fazem uso continuado de anti-inflamatórios tem menor incidência de câncer (MOYSICH et al., 2002) indicam a ciclooxigenase-2 (COX-2) como possível alvo terapêutico no câncer. Ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) são enzimas centrais na conversão do ácido araquidônico (AA). O primeiro passo dessa reação é a conversão de PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> levando a formação de outros prostanóides, como PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  e PGE<sub>2</sub>, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxanos (TXA<sub>2</sub>) (Figura 10) (RASPELLINI & TADDEI, 2007). Enquanto COX-1 é constitutivamente expressa na maioria de células e tecidos normais, a COX-2 tem sua expressão induzida durante a inflamação e transformação celular em resposta a citocinas, fatores de crescimento e outros estímulos. Entretanto, vários estudos têm demonstrado uma alta expressão constitutiva de COX-2 em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de pulmão (RASPELLINI & TADDEI, 2007; KRYSAN et al., 2006; HOSOMI et al., 2000) e a

existência de uma correlação entre essa expressão e o mau prognóstico dos pacientes (KIM et al., 2003; KHURI et al., 2001).



**Figura 10:** Diagrama esquemático da conversão do ácido araquidônico à prostaglandinas (PGs) e outros eicosanóides pela enzima ciclooxygenase -1 e -2 (Adaptado de RASPOLLINI & TADDEI, 2007).

Ao longo dos últimos anos, várias evidências sugerem que a COX-2 e seus metabólitos como a PGE2 desempenham um papel relevante na modulação de fatores responsáveis pelo crescimento e progressão do tumor. De fato, dados da literatura mostram o envolvimento da COX-2, através de seus prostanóides, na ativação da transcrição de fatores de proliferação do tumor (MAO et al., 2006, KRYSAN et al., 2005; SHENG et al., 2001) no aumento da transcrição de fatores anti-apoptóticos como Bcl-2 (SINGH et al., 2008; YU & JOVE, 2004) e survivina (KRYSAN et al., 2004a; KRYSAN et al., 2004b) que contribuem para a resistência à apoptose; no aumento da resistência à quimioterapia mediada por bombas de efluxo (LIU et al., 2010; SOROKIN et al., 2004); na produção de fatores angiogênicos e

metastáticos (VEGF) (NIU et al., 2002) e na invasão (DOHADWALA et al., 2001). Esse conjunto de fatores, que contribuem para o agravamento da doença, apontam o possível papel do uso de inibidores de COX-2 no tratamento dos tumores de pulmão.

As drogas anti-inflamatória não-esteroidais (NSAIDs) como a aspirina, indometacina, ibuprofen e sulindac, etc, são inibidores inespecíficos da ciclooxigenase e atuam sobre a COX-1 e COX-2. A utilização de NSAIDs sozinhos ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos e/ou terapia de radiação, tem ganhado atenção no tratamento do câncer de pulmão, pois além de inibirem o crescimento de células tumorais, o uso contínuo desses anti-inflamatórios está associado com redução do risco de desenvolvimento de câncer de pulmão em fumantes e em modelos animais (SMITH et al., 2006; RAO & REDDY, 2004; MOYSICH et al., 2002). E foi proposto que a atividade antiinflamatória dos NSAIDs seja devido à sua habilidade em inibir a COX-2 e a produção de PGE<sub>2</sub> (LEE et al., 2008). Esses estudos levaram ao desenvolvimento de uma série de novos compostos, com alta especificidade para a COX-2, os COXIBs (celecoxib, refocoxib, paracecoxib, valdecoxib, lumiracixib e etoricoxib) cujo efeito sobre a progressão do câncer de pulmão tem sido investigada (HARRIS et al., 2007; KRYSAN et al., 2006).

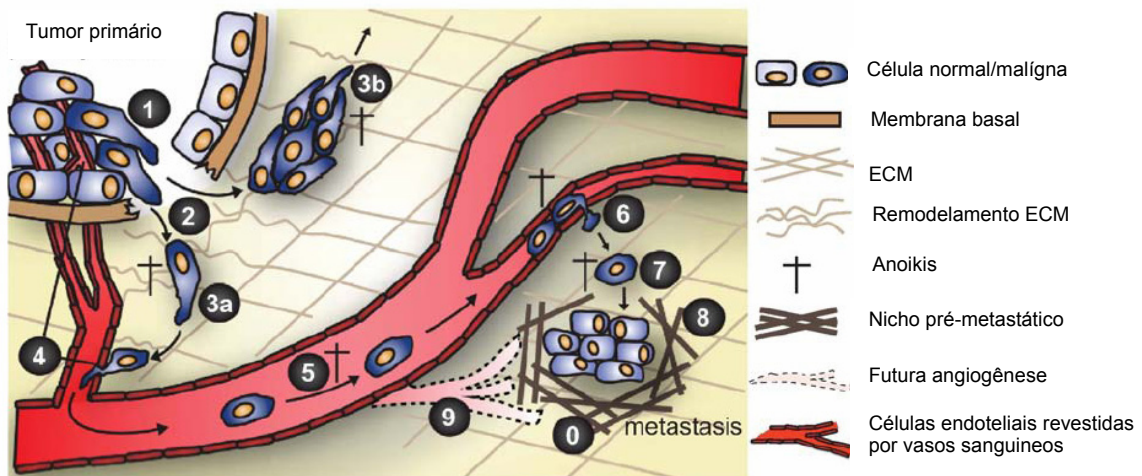
Dados obtidos por vários grupos confirmam o papel relevante desempenhado pela COX-2 na tumorigênese do câncer de pulmão. Entretanto, embora a utilização de inibidores de COX-2 contribua de maneira positiva para o bloqueio de fatores envolvidos nesse processo, essa estratégia ainda é insuficiente para garantir uma melhora substancial na sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão em estagio avançado. Além disso, as limitações particulares de cada estratégia terapêutica utilizada em combinação com vários compostos acaba levando ao desenvolvimento

de resistência, o que favorece a progressão do tumor e o desenvolvimento de metástases, que é um dos grandes problemas enfrentados no tratamento do câncer

### **1.8. A Falta da Resposta Quimioterápica e o Desenvolvimento Metástase**

A metástase resulta da migração de uma célula tumoral de seu sítio de origem para outro órgão onde se estabelece dando origem a um novo tumor. (Figura 11). O desenvolvimento de metástases é considerado um evento tardio na tumorigênese e um processo muito complexo. A conversão de um tumor de estágio inicial para invasivo envolve múltiplos processos e várias mudanças citofisiológicas, incluindo mudança na capacidade adesiva entre a célula e matrix extracelular (ECM). A degradação da ECM por células tumorais via proteases, assim como, metaloproteinases pode levar separação da matrix intercelular e promover a motilidade de células tumorais e eventualmente levar a metástase. Além destas proteínas o processo de desenvolvimento de metástase também pode ser controlado por uma rede complexa de vias de sinalização que regula processos chave tais como proliferação, sobrevivência, migração e invasão celular. A migração e invasão celular parecerem resultar de uma interação entre numerosas famílias de proteínas que participam desse processo (WANG et al., 2006). De maneira simplificada o processo de metástase se dá através dos seguintes passos: a) desligamento das células tumorais do tumor primário, b) invasão para tecidos circundantes c) intravasão para vasos linfáticos, d) disseminação através da corrente sanguínea e finalmente, e) extravasão e povoamento para sítios secundários. Cada passo durante o processo de metástase requer um distinto programa molecular em que modula a capacidade adesiva e migratória (YILMAZ & CHRISTOFORI, 2009).

Uma das etapas do processo metastático presente durante a perda da capacidade adesiva é a transição epitélio-mesênquimal (EMT - do inglês, *Epithelial-Mesenchymal Transition*) que se inicia pela perda do contacto célula-célula no sítio tumoral primário (perda da E-caderina), seguida pelo aumento da motilidade (ganho de integrinas) e da ativação de marcadores mesênquimais, envolvidos na reorganização do citoesqueleto (PEEBLES et al., 2007; WANG et al., 2006; LEE et al., 2005;). A expressão de ADF/cofilina, uma proteína que desempenha um papel fundamental na reorganização do citoesqueleto de actina, tem sido diretamente relacionada com a mobilidade e invasão celular em vários tipos de câncer (VAN TROYS et al., 2008; WANG et al., 2006).



**Figura 11:** Cascata metastática. (1) As células do tumor primário passam por uma transição epitélio-mesênquimal (EMT) e adquirem propriedades evasivas; (2) degradação da membrana basal e remodelamento da matriz extracelular (ECM) por proteinases; (3) células tumorais invadem os tecidos circundantes com células simples ou coletivas; (4) intravasão das células tumorais; (5-6) as células tumorais são transportadas através dos vasos onde elas extravasam; (7) as células extravasadas podem ainda ficar dormentes por anos, e (8-9) eventualmente algumas células disseminadas crescem e estabelecem um tumor secundário (Adaptado de GEGER & PEEPER, 2009).

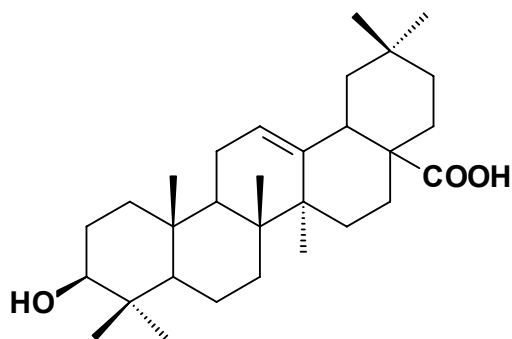
Acredita-se que o insucesso da quimioterapia (QT) na cura de várias formas de câncer metastático seja devido à perda da eficácia das drogas ao longo do tratamento. Respostas iniciais favoráveis e remissão completa de doenças têm sido

visto em diferentes tipos de câncer. Assim a combinação das drogas disponíveis com o avanço da biologia do tumor ainda não são suficiente para causar um impacto significativo na sobrevivência dos pacientes com câncer de pulmão, de maneira que, se faz necessário a busca de compostos capazes de matar ou sensibilizar as células tumorais e conseqüentemente inibir o desenvolvimento de metástases.

### **1.9. Triterpenos e Câncer**

As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas para serem exploradas com finalidade terapêutica. Hoje já se sabe que produtos bioativos de origem vegetal lideram as estruturas que se tornaram a principal fonte de novos agentes com potencial tumoricida. Um grande número de produtos naturais com diversas estruturas químicas tem sido analisado, tais como, camptothecin, vincristina, vinblastina, taxol, podophylloxin, entre outros, como agentes anti-câncer. De fato, estima-se que 60 % das drogas anti-tumorais e anti-infecciosas já no mercado ou sob teste clínico sejam de origem vegetal (CRAGG & NEWMANN, 2005). Muitas delas têm sua estrutura modificada com o intuito de melhorar sua atividade, toxicidade e solubilidade.

Uma classe de compostos de origem natural originado através do metabolismo secundário de plantas, que tem recebido considerável atenção são os terpenos. Dentre os terpenos, os triterpenos pentacíclicos, apresentam diferentes atividades biológicas tais como antiinflamatória, bactericida, fungicida, antiviral, analgésica, anti-hipertensiva, anti-tumoral e Anti-MDR (ROCHA et al., 2007; BRAGA et al., 2007; FERNANDES et al., 2003; LEE et al., 2003; PISHA et al., 1995). Um desses triterpenos, o ácido oleanólico (AO) (Figura 12) é muito abundante, sendo encontrado numa grande variedade de plantas.



**Figura 12:** Estrutura do ácido oleanólico (AO).

Como pode ser observado na tabela 4, o AO é capaz de matar diferentes linhagens tumorais (côlon, leucemia e astrocitoma), como linhagens que expressam

**Tabela 4:** Diferentes Atividades do Ácido Oleanólico (AO).

<b>Atividades Biológicas</b>	<b>Referências</b>
Anti-HIV	ZHU et al., 2001.
Antiviral	SERRA et al., 1994
Antibacteriana	HICHRI et al., 2003
Antiangiogênica	SOHN et al., 1995.
Anti-inflamatória	TSAI et al., 2008; BANNO et al., 2004;GINER-LARZA et al., 2001; KAPIL & SHARMA, 1995; SINGH et al., 1992.
Antitumoral	JANAKIRAM et al., 2008; ZHANG et al., 2007; MARTÍN et al., 2007; WANG et al., 2006; LIU et al., 2005; OVESNÁ, 2006; HSU et al., 1997.
Anti-MDR	FERNANDES et al., 2003; BRAGA et al., 2007
Antioxidante	TSAI et al., 2008; OVESNÁ et al., 2006; BALANEHRU & NAGARAJAN, 1992.
Gastroproptetora	RODRIGUEZ et al., 2003.
Hepatoprotetora	LIU et al., 2008; ABDEL-ZAHER et al., 2007; TANG et al., 2005.
Nefroprotetora	PATIL et al., 2009; ABDEL-ZAHER et al., 2007.
Imunomoduladora	KHAJURIA et al., 2007; RAPHAEL & KUTTAN, 2003; CHIANG et al., 2003; HSU et al., 1997
Inibidor de STAT3 e STAT5	BUTLER et al., 2008.

o fenótipo MDR, um importante fator de falha quimioterápica. Também foi mostrado que o AO inibe a angiogênese (SOHN et al., 1995). Além dessas atividades que qualificam o AO como um candidato a quimioterápico, ele apresenta outra importante característica, que é a ausência de toxidez inespecífica. Assim, teste de toxicidade aguda em camundongos, a administração de AO (600 mg/kg) não mostrou nenhuma toxicidade (ASTUDILLO et al., 2002). Também foi demonstrado que AO (25 a 80 mg/Kg/dia) apresenta atividade hepatoprotetora (ABDEL-ZAHER et al., 2007) e nefroprotetora (PATIL et al., 2009; ABDEL-ZAHER et al., 2007). Esses efeitos são acompanhados por normalização dos níveis séricos de marcadores bioquímicos de danos hepáticos e renais (uréia, creatinina, albumina, transaminases pirúvica e transaminases oxaloacética, fosfatase alcalina e bilirubina). Em adição foi mostrado que o AO restaura o sistema hematopoiético de camundongos irradiados (HSU et al., 1997). Devido à eficácia e ausência de efeitos colaterais esse triterpeno foi patenteado no Japão com um aditivo na alimentação (OKUDO et al., 1990).

Considerando que muitos compostos usados na terapia do câncer são tóxicos e substratos para as proteínas MDR, o fato o AO apresentar ausência de toxidez e capacidade de matar linhagem MDR, despertou nosso interesse em investigar o efeito desse triterpeno sobre linhagens de câncer de pulmão que expressam proteínas de resistência. Considerando o papel da COX-2 na modulação de fatores que contribuem para o estabelecimento e progressão do tumor, o fato do AO apresentar propriedade anti-inflamatória pode ser uma característica interessante para seu uso no tratamento de neoplasias que expressam constitutivamente essa enzima no câncer de pulmão.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

- Avaliar a atividade tumoricida do AO sobre as linhagens A549 e H460 (NSCLC) *in vitro* e seu efeito sobre o desenvolvimento de metástases *in vivo*.

### **2.2. Específicos**

- Estudar efeito anti-tumoral do AO sobre diferentes linhagens de câncer de pulmão;
- Avaliar o efeito do AO sobre a atividade e expressão de proteínas MDR em linhagens de câncer de pulmão;
- Avaliar o efeito do AO sobre fatores envolvidos na modulação da apoptose e metástase;
- Avaliar o efeito do AO sobre o desenvolvimento de tumores e de metástases em modelos animais.

### **3. MATERIAL e MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

- Ácido oleanólico (AO): Sigma (St Louis, MO).
- Anticorpo primário policlonal anti-Bax (P-19): Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA- sc -526), IgG de coelho. Mantido a 4°C e diluído 1:200 no momento do uso.
- Anticorpo primário monoclonal anti-Bcl-2 (Clone 124): DAKO (M0887), IgG1 de camundongo. Mantido de 2-8 °C e diluído 1:100 no momento do uso.
- Anticorpo anti-Bcl-2-PE: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), diluído 1:50 no momento do uso em PBS.
- Anticorpo primário monoclonal anti-Cofilina (Clone 5): Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA - sc-53934), IgG de camundongo. Mantido 2-8 °C e diluído 1:500 no momento do uso.
- Anticorpo primário monoclonal anti-COX-2 (M-19): Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA- sc-1747), IgG de cabra. Mantido 2-8 °C e diluído 1:500 no momento do uso.
- Anticorpo primário policlonal anti-COX-2 (M-19): Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA- sc-1747), IgG de coelho. Mantido a 4°C e diluído 1:200 no momento do uso.
- Anticorpo primário policlonal anti-Ki-67: ABCAN (ab66155), IgG de coelho. Mantido a -20°C ou -80°C e diluído 1:200 no momento do uso.
- Anticorpo anti-MRP1-PE: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), diluído 1:200 no momento do uso em PBS.
- Anticorpo monoclonal anti-MRP1 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA /ALX-801-007-C125): IgG2a de rato, reconhece epítopo interno de MRP1

humana e de camundongo. Mantido à -20°C e diluída 1:20 no momento do uso.

- Anticorpo primário policlonal anti-survivina: ABCAN (ab469), IgG de coelho. Mantido a -20°C ou -80°C e diluído 1:100 no momento do uso.
- Anticorpo primário monoclonal anti-VEGF (C-1): Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA- sc-7269), IgG de camundongo. Mantido a 4°C e diluído 1:100 no momento do uso.
- Anticorpo secundário anti-rato/FITC: Sigma, St Louis, MO. Mantido a -20°C e diluída 1:1000 em PBS no momento do uso.
- Anticorpo secundário anti-coelho/peroxidase: Amersham Bioscience (ECL, WesternBlotting Analysis System). Mantido a 4-8°C. e diluído 1:2000 no momento do uso.
- Anticorpo secundário anti-coelho biotilado: Sigma- Aldrich (B6648), IgG. Mantido a 2-8 °C e diluído 1:80 no momentodo uso.
- Anticorpo secundário anti-cabra/peroxidase: Nordic Immunology (Notterlandis). Mantido a 4-8°C. e diluído 1:2000 no momento do uso.
- Anticorpo secundário anti-camundongo biotilado: Sigma-Aldrich (B6398), IgG. Mantido a -20°C e diluído 1:80 no momento do uso.
- Anticorpo secundário anti-camundongo/peroxidase: Amersham Bioscience (ECL, WesternBlotting Analysis System). Mantido a 4-8°C. e diluído 1:2000 no momento do uso.
- Anticorpo secundário anti-cabra biotilado: Vector Laboratories (BA5000), IgG. Mantido a -20°C e diluído 1:80 no momento do uso.
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) – Sigma (St Louis, MO). A concentração da solução, foi de 2,5 mg/mL em PBS 1X e mantida sob refrigeração (4 °C).

- 5(6)-carboxifluorecein diacetato (5-CFDA): CalBiochem. Solução estoque 10 mM (em PBS) será armazenada a -20°C e a concentração utilizada de 2µM (em PBS)
- Dimetilsulfóxido (DMSO): Sigma (St Louis, MO). Usado para dissolver os reagentes.
- DMEM (Life Technologies, INC., USA) complementado com HEPES (3 g/L) (Promega, USA), estreptomicina (100 mg/mL), penicilina (100 U/mL) e água miliq. q.s.p um litro.
- MK571: Solução estoque 4 mM (em PBS) armazenaa a -20 °C.
- Rodamina 123: CalBiochem. Solução estoque a 0,5 mg/mL (em PBS) foi armazenada a -20°C. A concentração utilizada foi 200 ng/mL (em PBS).
- RPMI (Life Technologies, INC., USA) complementado com HEPES (3 g/l) (Promega, USA), glicose (2g/L), estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 U/mL) e água miliq. q.s.p um litro.
- Solução de HFS: Para um estoque de 10x, utilizou-se 1% de Triton X-100, 1% Citrato de sódio (1g/100 mL) e 0,5 mg/ mL de Iodeto de Propídeo.
- Solução de Lise: BD (Franklin Lakes, NJ). Mantido a 4 °C, usado na proporção 1:10. Diluído com PBS no momento do uso.
- Soro fetal bovino (SFB): GIBCO (Carlsbad, CA). Inativado a 56 °C e mantido a -20 °C até o uso. Utilizado no meio de cultura a 10 % (v/v).
- Verapamil - Sigma (St Louis, MO). Dissolvido em DMSO, diluído com meio de cultura até a concentração de 100 mM e estocado a -20 °C. No momento do uso essa solução será diluída com meio de cultura até as concentrações de 10, 25 e 50 µM.

- Solução de Lise: Fornecido pela BD (Franklin Lakes, NJ). Mantido a 4°C, usado na proporção 1:10. Diluído com PBS no momento do uso.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Linhagens Celulares e Condições de Cultura**

As linhagens humanas de câncer de pulmão ( A459 e H460) foram mantidas em RPMI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), complementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U penicilina e 100 µg/ml streptomicina, em garrafs de plástico a 37°C com 5 % CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada 3 dias. As células foram sub-cultivadas usando tripsina-EDTA a cada 3-4 dias. A linhagem de melanoma murino, B16F10, foi usada nos experimentos *in vivo*, foi cultivada nas mesmas condições porém em DMEM (Life Technologies Inc., USA)

### **3.2.2. Avaliação da Viabilidade Celular**

O método de MTT (MOSMANN, 1983) foi utilizado para medir o efeito do AO sobre a viabilidade celular. Para o experimento, 180 µl de uma suspensão celular ( $1 \times 10^4$  ou  $2,5 \times 10^4$  de células/ poço para A459, H460 e, respectivamente) foram distribuídos em placas de cultura (96 poços) e mantidos em estufa de CO<sub>2</sub> (5 %) a 37 °C por 24 horas. Após esse tempo, as células foram incubadas com meio, diferentes concentrações de AO ou DMSO (nas mesmas concentrações carregadas pelo AO) e mantidas na estufa por 48 horas. Após esse período, as células foram tratadas com 20 µL de MTT (2,5 mg/mL) e mantidas na estufa por 4 horas. Em seguida as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet dissolvido em 150 µL de DMSO. A densidade ótica foi medida em um leitor de ELISA (Benchmark / BioRad) a 570 nm com filtro de referência a 655 nm. Para o cálculo da

percentagem de inibição da viabilidade celular foram utilizadas como controle as culturas tratadas com DMSO nas mesmas concentrações carregadas pelo triterpeno. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de, pelo menos, três experimentos diferentes, realizados em triplicatas.

### **3.2.3. Avaliação da Fragmentação de DNA**

A avaliação da fragmentação de DNA foi feita por citometria de fluxo (FACS) e baseada na análise do ciclo celular de células marcadas com iodeto de propídeo (PI) (NICOLETTI et al., 1991). Para isso as células foram plaqueadas como descrito no item anterior e, após 24 horas, tratadas com meio ou diferentes concentrações de AO. Após 48 horas de incubação, as células foram recolhidas e centrifugadas a 240G por 13 seg. O precipitado foi ressuspensão em 200  $\mu$ L de solução de HFS (solução hipotônica contendo 0,1% de Citrato de Sódio, 0,1 % de Triton X-100 e 50  $\mu$ g/mL de PI) e incubado a 4 °C por cerca de 1 h na ausência de luz. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo (Beckton Dickinson) utilizando o canal FL-2 (5.000 eventos), onde a população hipodiploide (pico subG1) foi considerada apoptótica. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de no mínimo, três experimentos diferentes realizados em triplicata.

### **3.2.4. Avaliação da Ativação de Caspases**

A ativação de caspase-3 foi medida utilizando-se o Kit comercial CaspGlow (BioVision) conforme instruções do fabricante. Em resumo, a linhagem tumoral foi plaqueada e tratada como descrito nos itens anteriores. Em seguida, as células foram recolhidas em tubos especiais para Facs, centrifugadas a 1200 rpm por 7 minutos. O pellet foi ressuspensão em 100 $\mu$ l da solução do Kit (1:200) e incubado

por até 1 hora em estufa à 37°C. Após esse período as células foram lavadas duas vezes com o tampão de lavagem do Kit. A solução do Kit possui moléculas conjugadas ao fluorocromo FITC que se ligam irreversivelmente as caspases-3 ativadas. O percentual das células com caspase-3 ativada foi medido por citometria de fluxo, canal FL-1 (10.000 eventos). Os resultados foram expressos como média ± desvio.

### **3.2.5. Avaliação da Atividade das Proteínas MDR**

A atividade moduladora das bombas MDR foi avaliada através do acúmulo dos corantes fluorescentes 5-carboxifluoreceína diacetato (5-CFDA/ Calbiochem), uma molécula não fluorescente que é convertido a uma molécula fluorescente (CF) por esterases intracelulares e Rhodamina 123 (Rho 123/ Calbiochem), substratos específicos para as proteínas MRP e Pgp, respectivamente. Para o ensaio de acúmulo de 5-CFDA e Rho 123, 1 mL de suspensão celular ( $10^5$ /poço) foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços, incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com 30 µL 5-CFDA (5 µM) ou Rho 123 (20 ng/mL) e 30 µL dos bloqueadores MK571 (50 µM), Verapamil (25 µM/ Alexis) ou com diferentes concentrações de AO (6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL) e incubadas por 30 min. Em estufa a 37 °C. Em seguida as células foram lavadas, recolhidas em tubos de FACS e a fluorescência foi avaliada em citômetro de fluxo utilizando o canal FL-1 com aquisição de no mínimo 10.000 eventos. Os resultados foram expressos como histogramas ou média de intensidade fluorescência (MIF).

### **3.2.6. Avaliação da Expressão de MRP1**

Para essa avaliação as células foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células/poço em placas de 24 poços na ausência e na presença de AO nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  e incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Após esse período, as células foram recolhidas, centrifugadas a 1200 rpm por 7 minutos, o pellet ressuspense em uma solução de lise (Becton, Dickinson) e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas, e lavadas com uma solução de PBS com 5 % de SFB e centrifugadas. Após a centrifugação, o sobrenadante será descartado e as células ressuspensas em PBS contendo o anticorpo MRP1-PE (1:200) e então incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos), canal FL-2. As células do melanoma B16F10 foram processadas do mesmo modo, utilizando-se como anticorpo primário uma IgG2a de rato anti MRP1, (Alexis Biochem., US) - diluição 1:20, seguido de um anticorpo secundário (IgG anti-rato conjugada a FITC, SIGMA - diluição 1:1000) marcado com FITC. As amostras foram então analisadas por citometria de fluxo canal FL-1 (20.000 eventos).

### **3.2.7. Western Blotting**

Resumidamente, a expressão das proteínas Bcl-2 e ADF/cofilina foram avaliadas por Western Blotting (FERNANDES et al., 2005). Para isto, 450  $\mu\text{L}$  de suspensão celular da linhagem A549 ( $2,5 \times 10^6$  células /poço) foi distribuída em placa de 24 poços e incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Após esse período as células foram tratadas com meio ou 50  $\mu\text{g/mL}$  de AO e, após 24h de incubação as células foram centrifugadas, lavadas com PBS e o pellet ressuspense



em tampão de lise. As amostras foram fervidas por 5 min. a 100 °C e mantidas no freezer até o momento de uso. Após resolução em gel de poliacrilamida a 12 %, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueada com leite 5 %/PBST por 1h e incubadas por 2h com anticorpos específicos para as proteínas de interesse (COX-2 e Cofilina/ADF). Decorrido esse tempo foram feitas 3 lavagens em PBS/Tween e a membrana foi incubada com os anticorpos conjugados a peroxidase e revelada utilizando um sistema de ECL (do inglês, *Enhanced ChemiLuminescence*).

### **3.2.8. Imunofluorescência**

Células A459 cells ( $3 \times 10^4$ /poço) foram distribuídas em lâminulas em placas de 24 poços, deixadas aderir por 24 horas e então tratadas com meio ou 50 µg/mL OA. Após 24 horas de incubação as células foram fixadas em paraformaldeído 4 % acrescido de sacarose 4 % por 40 minutos e lavadas em PBS pH 7.4 por 3 vezes de 5 minutos. Após as lavagens as células foram incubadas com cloreto de amônio 50 mM pH 8.0 por 40 minutos para o bloqueio das ligações inespecíficas oriundas da fixação. As células foram lavadas em PBS pH 7.4 por 3 vezes de 5 minutos e bloqueadas com PBS/BSA 10 % - Triton 0,1% - Tween 0,05 % por 40 minutos. Após estes procedimentos, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos na solução de PBS/BSA 3% - Triton 0,1 % - Tween 0,05 %, permanecendo até o dia seguinte em câmara úmida, a 4 °C. No dia seguinte, após alcançar a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 2x em Tampão PBS pH 7.4 e 1x em PBS - Tween 0,25 % por 10 min. cada e incubadas com o anticorpos secundários diluídos na solução de PBS/BSA 3 % - Triton 0,1 % - Tween 0,05 % cada por 1h. Ao final desse período e após duas lavagens com PBS - Tween 0,25

%, as lâminas foram incubadas com a Estreptavidina – conjugada a Cy3 (1:800, Sigma Immunochemical – S6402) diluída em PBS por 1 hora e contracoradas com o corante nuclear DAPI por 5 min. Após 2 lavagens com tampão PBS pH 7.4 - Tween 20 0,25 % por cinco minutos e uma lavagem em água destilada duas vezes de 10 minutos. As lâminas foram montadas em Vectashield (VECTOR). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: IgG de coelho anti-survivina (1:100), IgG de coelho anti-Ki67 (1:200), anticorpo monoclonal IgG2a anti-Bcl-2 de camundongo (1:100), IgG de coelho anti-Bax (1:200), IgG de coelho anti-COX-2 (1:200) e anticorpo monoclonal IgG2a anti-VEGF camundongo (1:100). E secundários: IgG anti-coelho (1:80), IgG anti-camundongo (1:80) e IgG anti-cabra (1:80). Foram contados em média 20 campos na direção horizontal ( $\sim 10^3$  células) de células marcadas com Cy3 e contracoradas com DAPI (para cada marçãõ).

### **3.2.9. Atividade Tumoricida em Modelos animais**

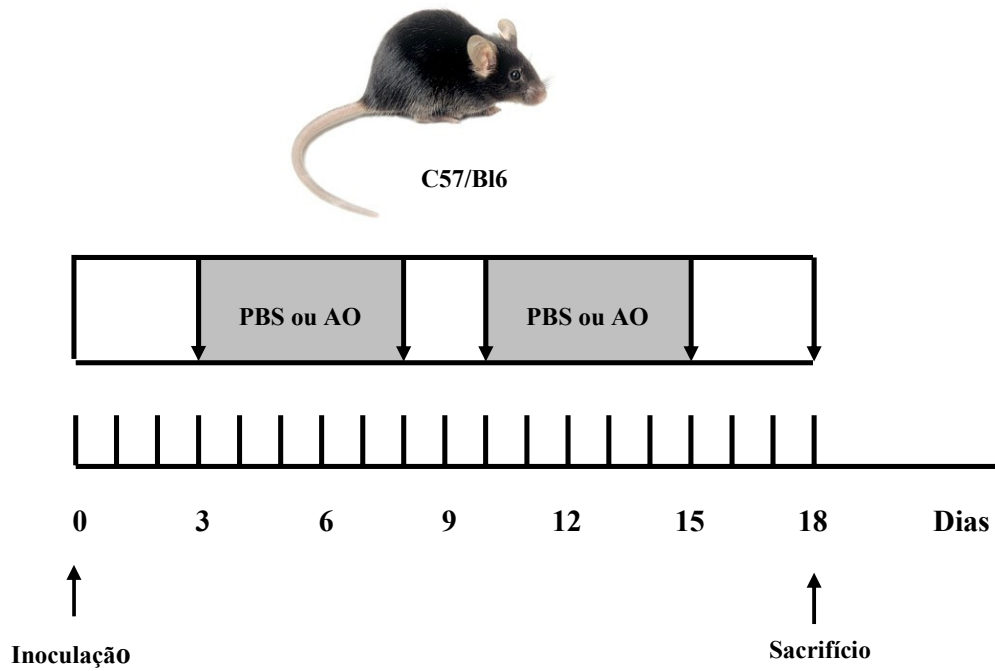
O efeito do AO sobre o desenvolvimento de metástases foi avaliado segundo o protocolo descrito por Sawada e colaboradores (2004). Camundongos C57BL/6 de quatro meses de idade foram inoculados por via intravenosa (i.v.) com  $10^6$  células do melanoma murino B16F10, para induzir metástases pulmonares. Os camundongos foram divididos em lotes de 5-7 animais e tratados por via oral com 20  $\mu$ L de salina ou AO (5 ou 10 mg  $\text{Kg}^{-1}$  dia) segundo o esquema da figura 13. No 18º dia os animais foram eutanasiados, os pulmões retirados e o número de metástases pulmonares foram contados.

### **3.2.10. Processamento Histológico**

Os pulmões dos animais anestesiados e eutanasiados por secção medular utilizados no ensaio anterior foram fixados em formol tamponado a 10 % por um período de 12 horas. Após fixação estes foram processados em séries crescentes de etanol e banhos de xileno (100 %) objetivando desidratação e diafanização do material. Em seguida os mesmos foram impregnados em parafina. Cortes de 4 µm do tecido pulmonar foram obtidos por microtomia em Micrótopo Leica (USA), corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) e analisados por histomorfometria.

### **3.2.11. Histomorfometria**

O estudo morfométrico foi realizado através de um sistema de captura de imagens constituído de câmara fotográfica digital EVOLUTION (Media Cybernetics, USA) acoplada a microscópio de luz E 500 NIKON (Japão) e a um computador contendo o programa de análise de imagens IMAGEPRO-PLUS 5.0 Media Cybernetics, USA). Para a quantificação da área tumoral, foram feitas 10 a 15 fotos da área tumoral utilizando-se objetiva de 10x. Após a contagem da densidade de superfície, foram comparados os tumores tratados com PBS e AO (5 e 10 mg Kg<sup>-1</sup> dia).



**Figura 13:** Protocolo experimental para experimento animal. As setas indicam a série de tratamento com PBS ou AO (5 ou 10 mg Kg<sup>-1</sup> dia).

### 3.2.11. Análise Estatística

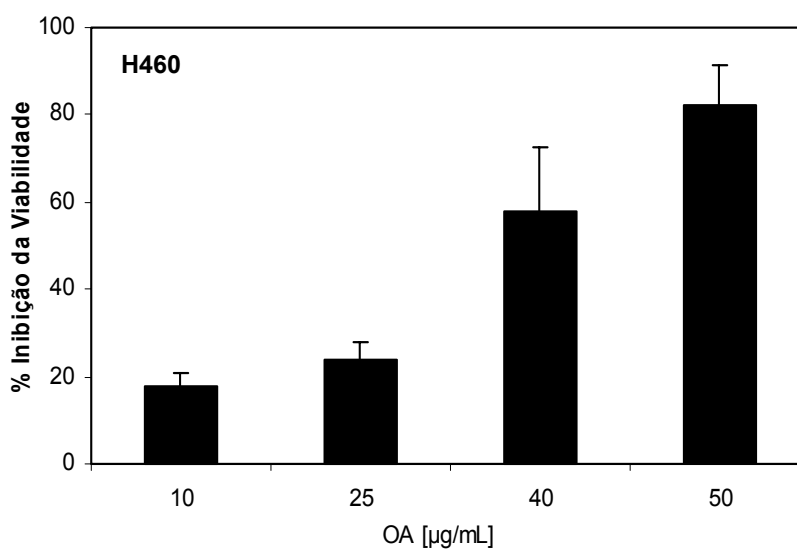
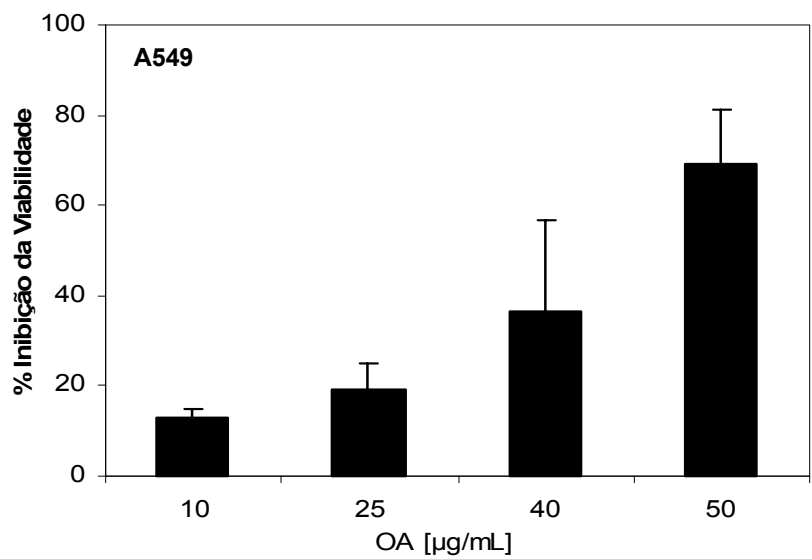
Os dados são representados como  $\text{media} \pm \text{SD}$ . Student's t-test é conduzido usando InStat software. Um valor de  $p < 0.05$  é considerado estatisticamente significativo.

## **4. RESULTADOS**

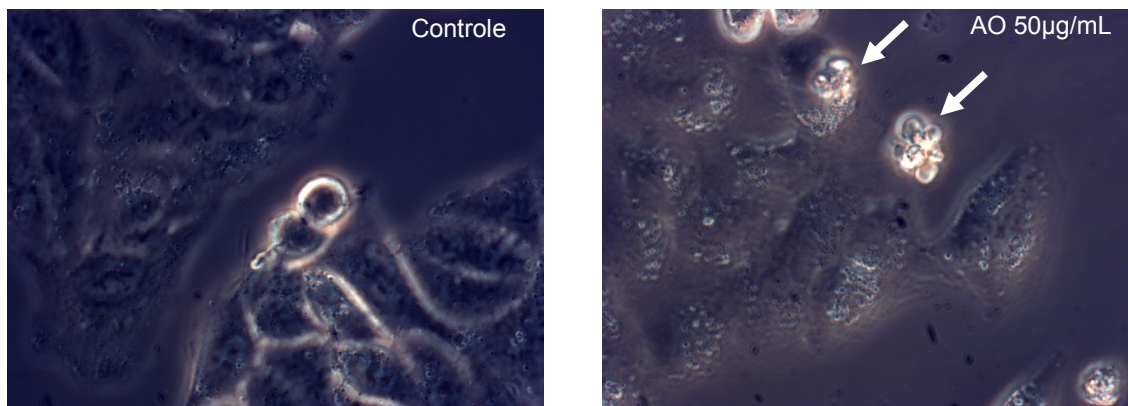
### **4.1. Ácido oleanólico inibe a viabilidade celular e induz fragmentação de DNA mediada por caspase 3.**

A capacidade do AO em inibir a viabilidade das linhagens de câncer de pulmão, A549 e H460, foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983). Para isso, após 24 h de plaqueamento, células foram incubadas com meio, diferentes concentrações de AO ou DMSO (nas concentrações carregadas pela droga) e a viabilidade foi avaliada 48h depois. Como mostrado na figura 14, o tratamento com AO reduz a viabilidade das linhagens de maneira dose-dependente. O efeito máximo de inibição, observado com 50 µg/mL de AO, foi de  $69,05 \pm 12,12$  % na linhagem A549 e  $82,10 \pm 9,38$  % para H460.

Durante o processo de avaliação da viabilidade celular, observações por microscopia óptica mostraram que as linhagens celulares tratadas com AO apresentavam características típicas de morte celular programada (Figura 15). Para confirmar essa hipótese, após 48h de incubação com meio ou diferentes concentrações do triterpeno (10, 25 e 50 µg/ mL), as células foram recolhidas, tratadas com um tampão hipotônico contendo triton e iodeto de propídeo e o ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo. A fragmentação de DNA foi avaliada pela quantificação da % de núcleos hipodiplóides (população considerada apoptótica) por citometria de fluxo. Os resultados das figuras 16 e 17 mostram um aumento da percentagem de células apoptótica em resposta ao aumento da concentração de AO indicando que a inibição de viabilidade observada anteriormente seja devida à indução de apoptose.



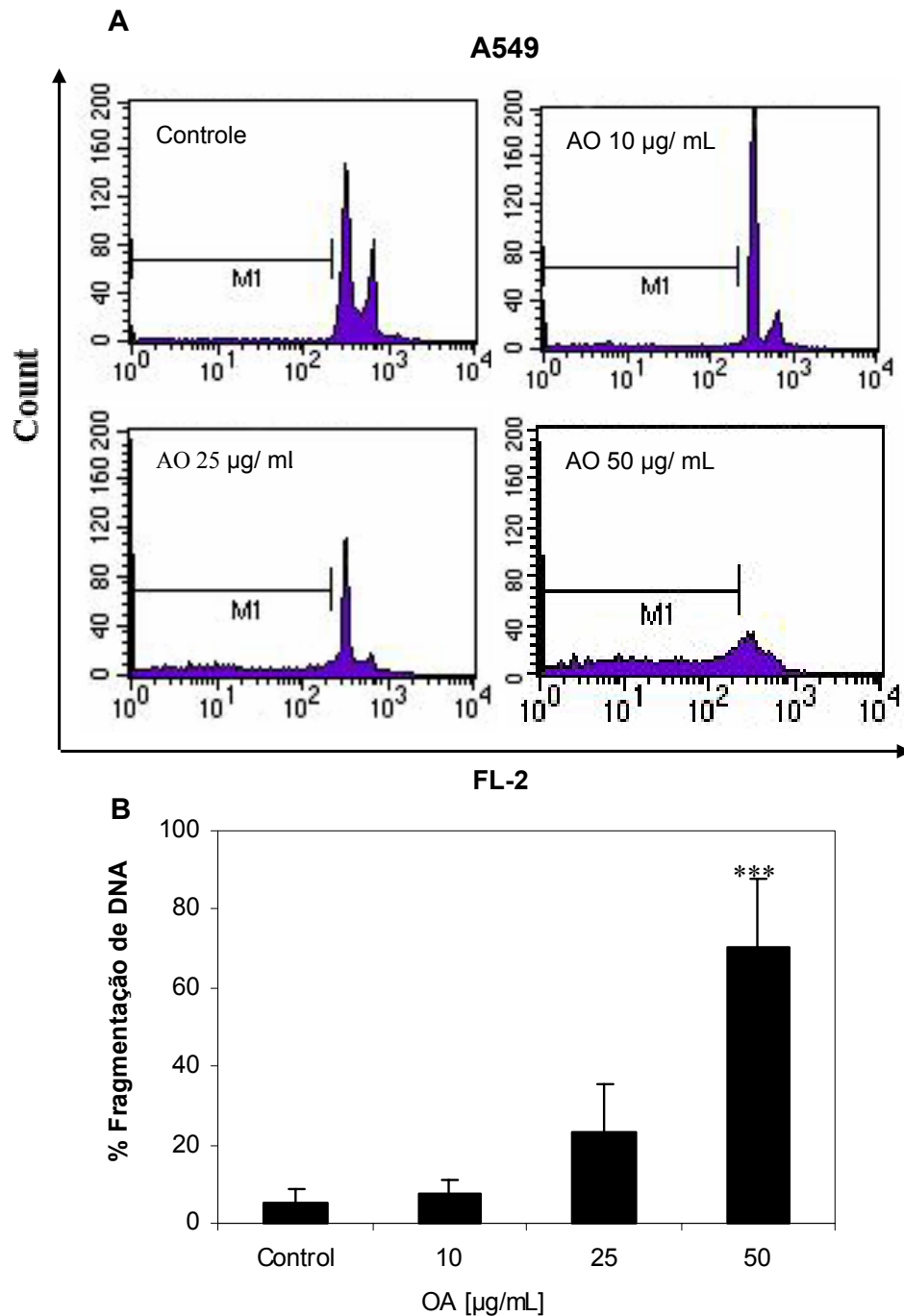
**Figura 14:** AO diminui a viabilidade celular de linhagens NSCLC. As células A549 e H460 foram incubadas com meio, diferentes concentrações de AO (10, 25, 40 ou 50 µg/mL) ou DMSO (nas concentrações carreadas pela droga) por 48h. Após o período de incubação a viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT e a percentagem de viabilidade foi calculada usando as células incubadas com DMSO como controle. Os resultados expressam a média  $\pm$  DP de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.



**Figura 15:** Alterações morfológicas induzida pelo AO na linhagem A549 (200x). As células foram plaqueadas e tratadas por 48h de com meio (controle) e AO 50µg/mL. As células tratadas com AO 48h mostram morfologia típica de apoptose (seta).

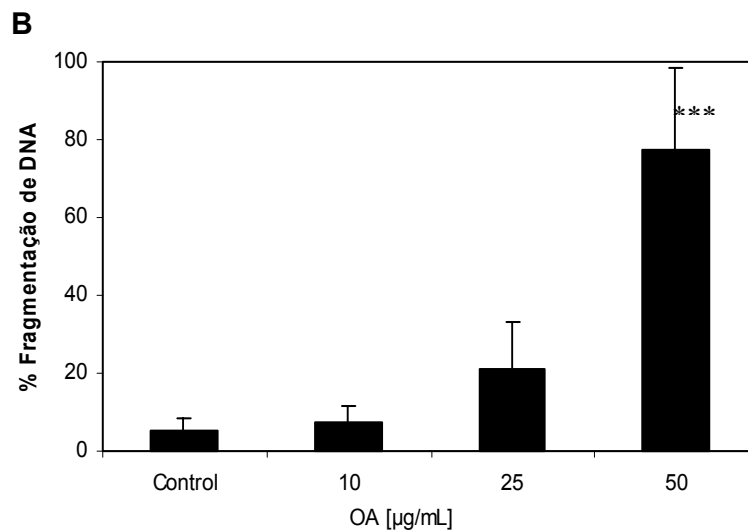
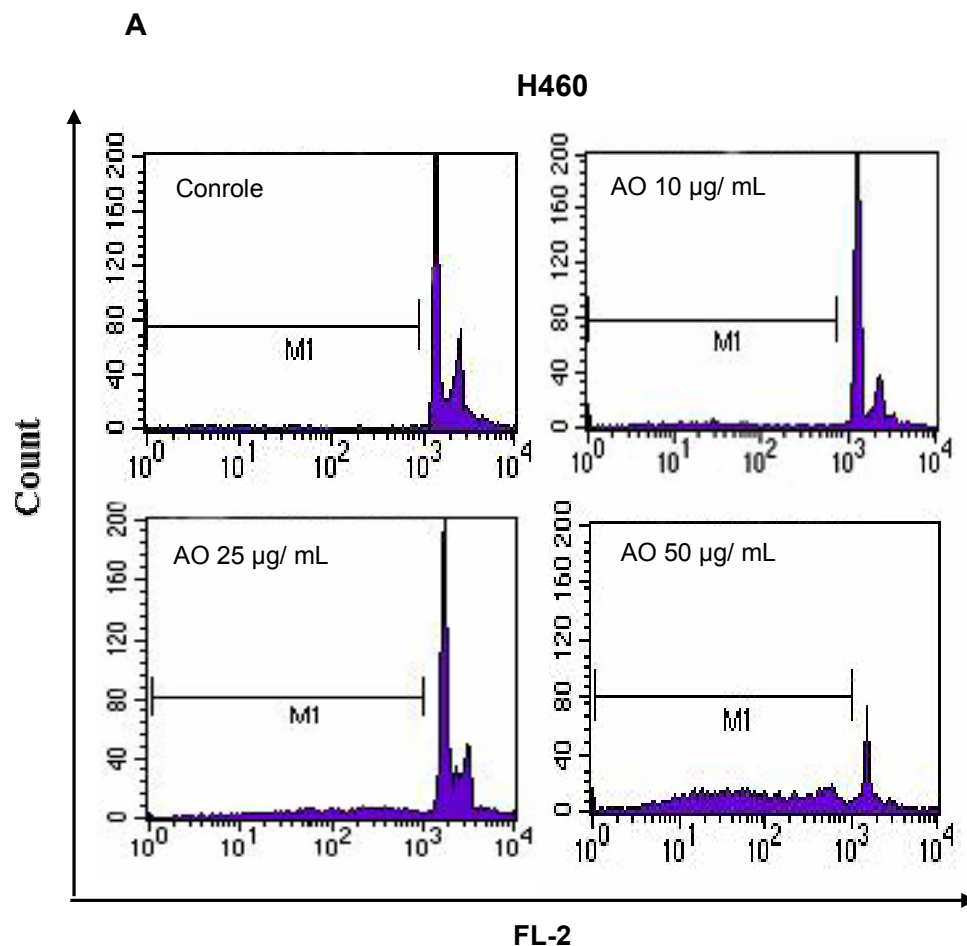
A percentagem de fragmentação variou de 7,5 % (AO10 µg/ mL) para 70 % (AO50 µg/ mL) na linhagem A549 (Figura 16), e de 7,5 % (AO 10µg/ mL) para 77 % (AO 50µg/ mL) na linhagem H460 (Figura 17).

Sabendo que as caspases são consideradas elementos chaves no processo apoptótico e que independente da via inicial ativada (via de receptores de membrana ou via mitocondrial) ambas as trajetórias convergem na ativação de caspases executoras, em particular caspase-3 e posterior desmantelamento celular (FUENTES-PRIOR & SALVESEN, 2005). De modo a confirmar se o mecanismo de morte induzido pelo AO era dependente da ativação de caspase-3, as células A549 e H460 foram incubadas com meio e diferentes concentrações de AO (10, 25 e 50 µg/ mL). A ativação de caspase-3 foi avaliada utilizando um kit comercial que contém em sua composição, moléculas conjugadas a fluoresceína (FITC), essas moléculas entram na célula e se ligam de forma irreversível a caspase-3 ativada e após lavagens a fluorescência dessa população foi medida por citometria de fluxo. Como mostrado na figura 18 foi possível observar a ativação de caspase-3 após o tratamento com concentrações crescentes de AO.



**Figura 16:** AO induz fragmentação celular na linhagem A549. As células foram tratadas com meio ou diferentes concentrações de AO (10, 25 ou 50 µg/mL) por 48h, após período de incubação as células foram ressuspensas em tampão hipotônico contendo triton-X e iodeto de propídeo e a fragmentação de DNA foi medida por citometria de fluxo. **(A)** Histograma representativo da média de três experimentos independentes; a população sub-G1 (população apoptótica) está demarcada em M1. **(B)** Quantificação da % de células fragmentadas. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com o controle e AO (10 e 25 µg/mL). Os resultados expressam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

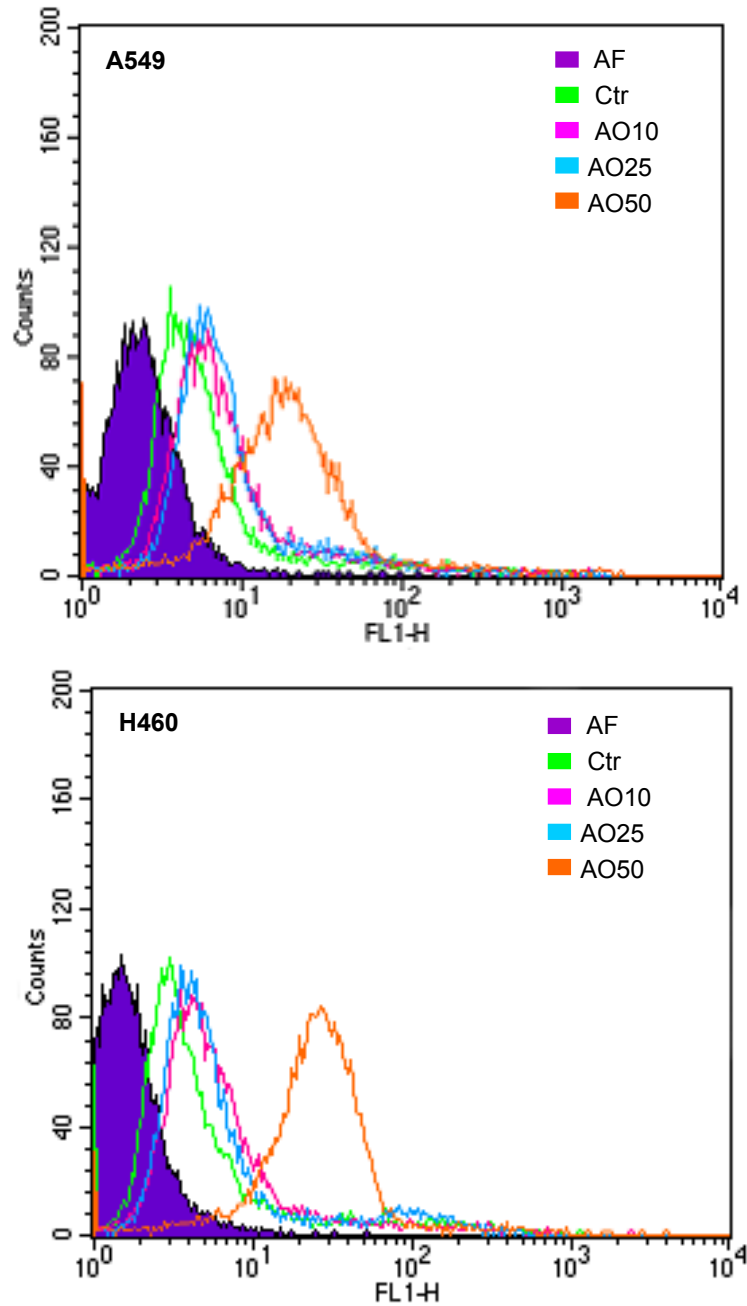




**Figura 17:** AO induz fragmentação celular na linhagem H460. As células foram tratadas com meio ou diferentes concentrações de AO (10, 25 ou 50 µg/mL) por 48h, após período de incubação as células foram ressuspensas em tampão hipotônico contendo triton-X e iodeto de propídeo e a fragmentação de DNA foi medida por citometria de fluxo. **(A)** Histograma representativo da média de três experimentos independentes; a população sub-G1 (população apoptótica) está demarcada em M1. **(B)** Quantificação da % de células fragmentadas. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com o controle e AO (10 e 25 µg/mL). Os resultados expressam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

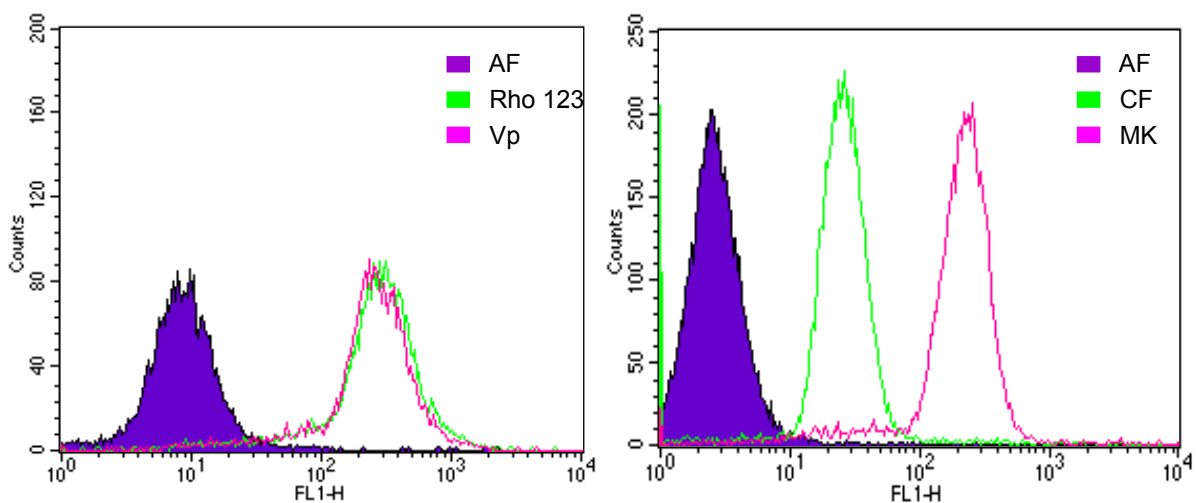
#### **4.2. Efeito do AO sobre as proteínas MDR**

Para investigar se a atividade anti-tumoral do AO poderia ser mediada por um efeito sobre as proteínas MDR (Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1). A presença e atividade dessas proteínas foi investigada nas linhagens em estudo (A549 e H460). Para isso, células foram incubadas com substratos para Pgp/ABCB1 (Rho123) ou MRP1/ABCC1 (5-CFDA) na presença ou ausência de inibidores dessas proteínas e a fluorescência intracelular, indicativa do acúmulo de substrato, foi medida. A ausência de alteração de fluorescência observada em células tratadas com verapamil, um inibidor de Pgp/ABCB1 (MICKLEY et al., 1989), sugere que as linhagens não apresentam Pgp/ABCB1 ativa. Por outro lado, o aumento de fluorescência do CF quando as células foram tratadas com MK571, um inibidor de MRP1/ABCC1 (GEKELER et al., 1995), mostra que elas expressam uma forte atividade MRP1/ABCC1 (Figura 19).

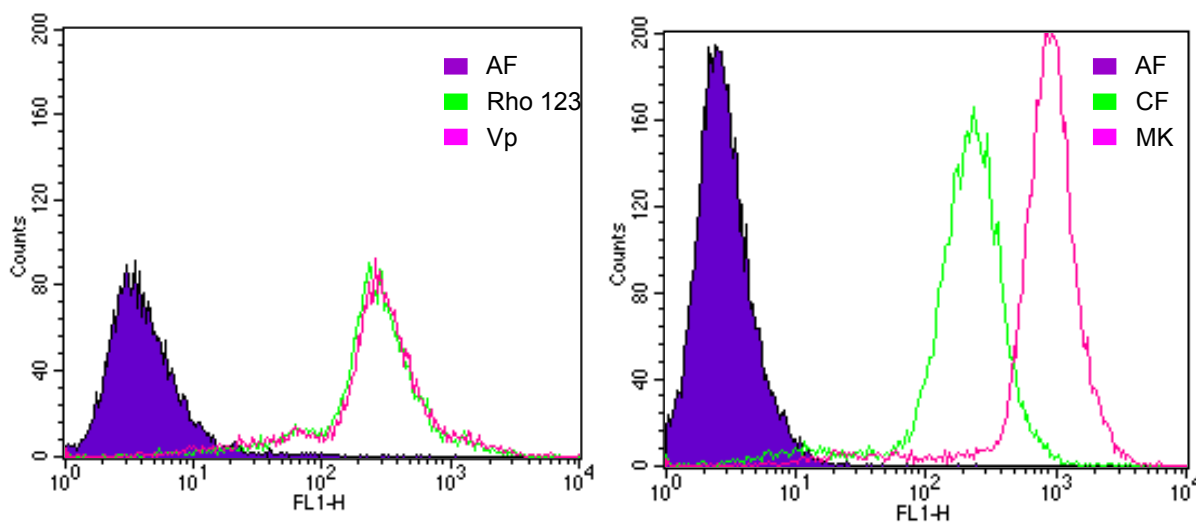


**Figura 18:** AO induz ativação de caspase-3 nas linhagens de NSCLC. Após 24 de plaqueamento, as células A549 e H460 foram tratadas com meio (controle) ou diferentes com concentrações de AO (10, 25 ou 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 48h. Após o tratamento as células foram incubadas com um reagente para detecção de caspase-3 ativada (CaspGlow, BioVision) e a percentagem de células positivas foi determinada por FACS. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata.

### A549



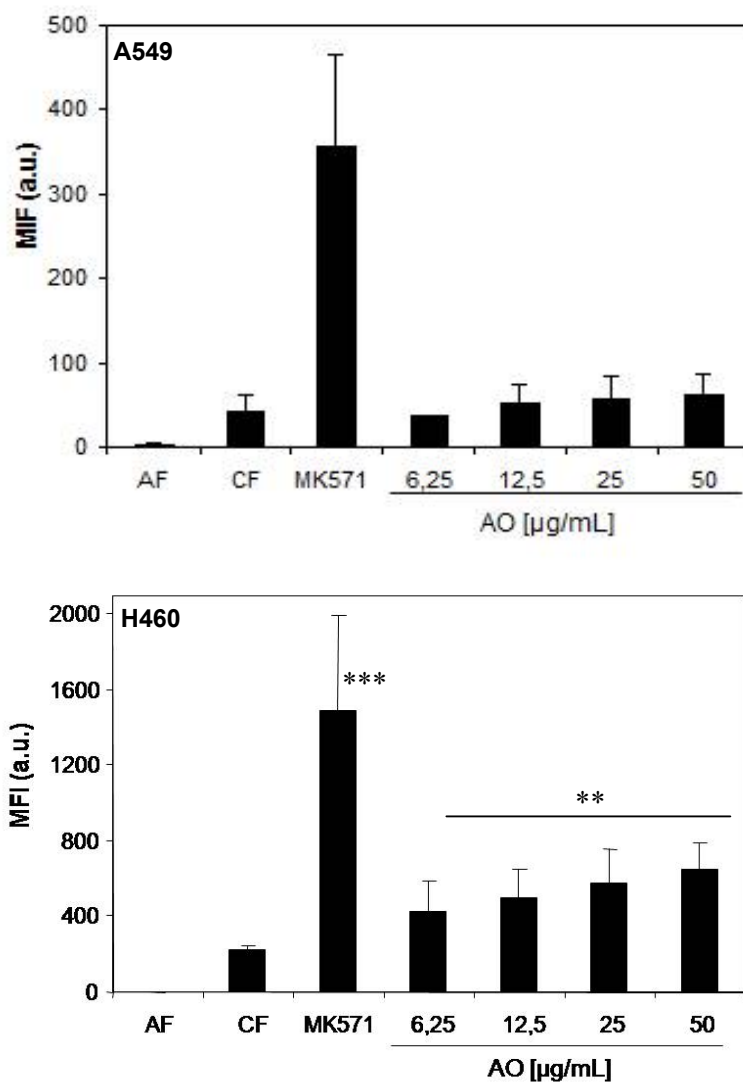
### H460



**Figura 19:** Efeito dos bloqueadores Verapamil (Vp) e MK571 (MK) sobre o carregamento de Rho123 e 5-CFDA. As células A549 e H460 foram incubadas por 30 minutos na presença de meio (Autofluorescência/AF) ou Rho 123 ou 5-CFDA, na presença ou ausência de inibidores específicos para Pgp/ABCB1, verapamil (VP) ou MRP1/ABCC1, MK571 (MK), respectivamente e a fluorescência intracelular foi medida por citometria de fluxo (FL-1). Histograma representativo de 3 experimentos independentes. CF (carboxifluoreceína).

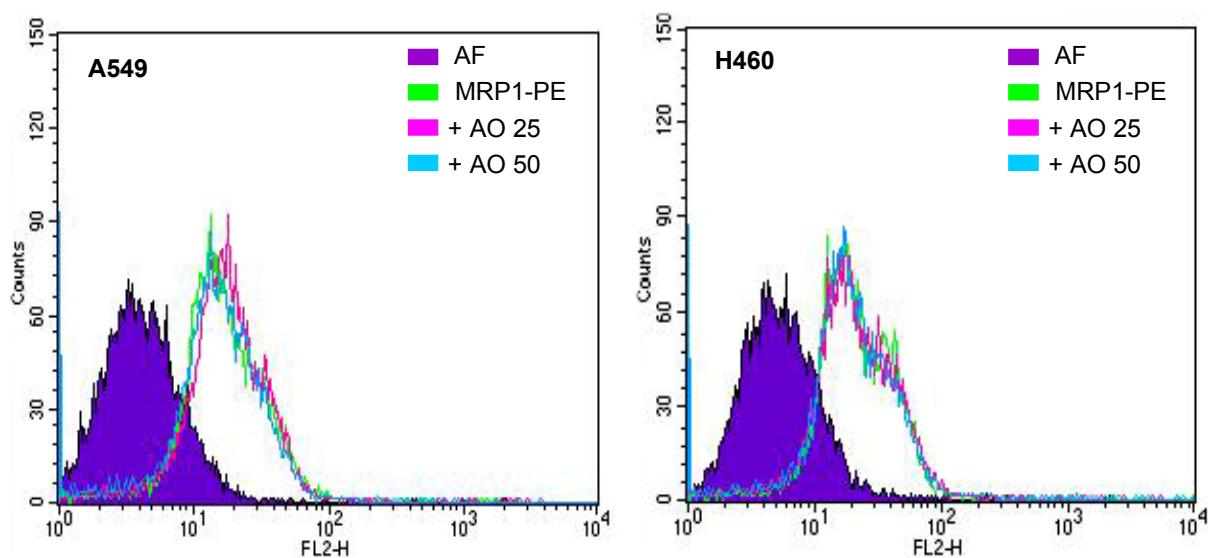
Visando investigar se a atividade anti-tumoral do AO era mediada por uma modulação da atividade da MRP, as células foram incubadas por 30 minutos com CFDA na presença de meio, de MK571 ou de diferentes concentrações de AO (6,25;

12..5; 25 or 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e a fluorescência da celular (acúmulo de CF) foi medida por FACS. Como mostrado na figura 20 o tratamento com AO não altera o acúmulo de CF pela A549. Porém, um aumento significativo do acúmulo de CF foi observado na H460 sugerindo que o AO modula a atividade dessa proteína.



**Figura 20:** Efeito do AO sobre a atividade da MRP1/ABCC1. As células foram incubadas por 30 minutos na presença de meio (AF) ou 5-CFDA, na presença do bloqueador MK571 ou diferentes concentrações de AO (6,25; 12,5; 25 ou 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e a fluorescência intracelular foi medida por citometria de fluxo (FL-1/ 10.000 eventos). \*\*  $p < 0,001$  \*\*\*,  $p < 0,001$  comparado com o controle (CF/ carboxifluoreceína). Os resultados expressam a média da intensidade de fluorescência (MIF)  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

Entretanto, como o tempo de tratamento utilizado nos experimentos de medida de atividade das bombas é muito curto, o efeito do AO também poderia ser devido a uma alteração do nível de expressão da MRP1/ABCC1. Para investigar essa hipótese, células tratadas com meio ou AO (25 e 50 µg/mL) por 24 horas foram incubadas com anticorpo monoclonal específico (anti-MRP1-PE, Santa Cruz Biot., USA) e a expressão de MRP1/ABCC1 foi medida por FACS. Como pode ser visto na figura 21 tratamento com o triterpeno não altera a expressão da MRP1/ABCC1.

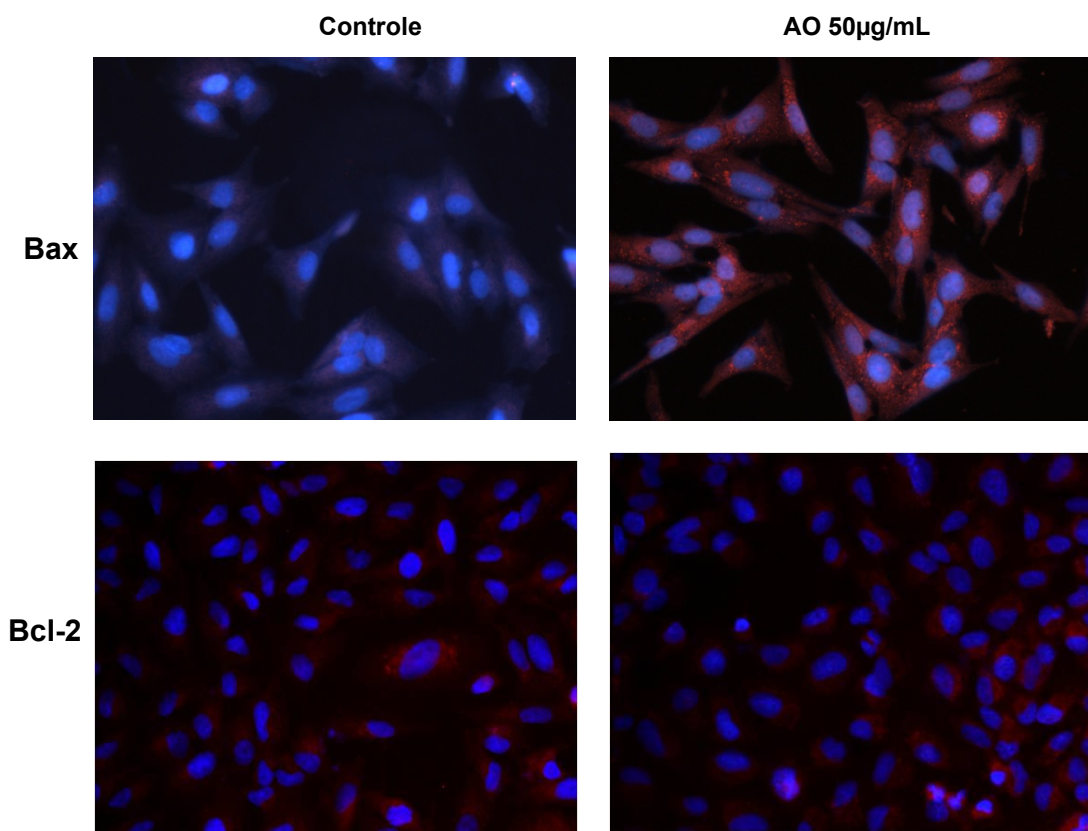


**Figura 21:** AO não altera a expressão de MRP1/ABCC1. As linhagens celulares (A549 ou H460) foram tratadas com meio ou AO (25 e 50 µg/mL). Após 24 h de incubação as células foram recolhidas, permeabilizadas e incubadas com anticorpo anti-MRP1-PE (1:200) por cerca de 30 minutos a 4 °C e a fluorescência média intracelular foi medida por citometria de fluxo (FL-2/ 20.000 eventos).

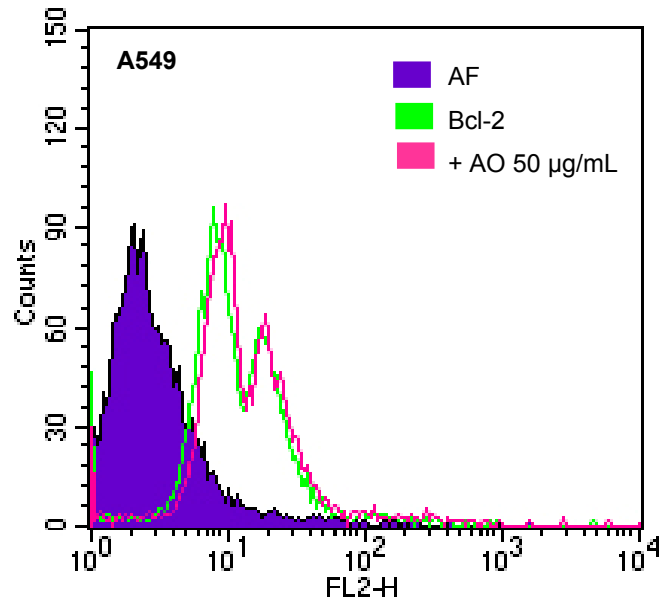
#### **4.3. AO interfere com a expressão de proteínas envolvidas na resistência a apoptose.**

Proteínas envolvidas na resistência a apoptose, como os membros anti-apoptóticos da famílias Bcl-2 e da família de inibidores de apoptose (IAPs) também estão presentes em linhagens de NSCLC. Uma vez que o AO é capaz de induzir apoptose em linhagens que expressam proteínas transportadoras (MDR) e que seu

efeito sobre a atividade dessas proteínas é muito pequeno, avaliou-se se ele poderia estar interferindo com fatores inibidores de apoptose como o Bcl-2 e a survivina. Como o balanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas da família Bcl-2, como o Bax e Bcl-2, é um fator relevante para determinar a sensibilidade da célula à apoptose, os níveis de expressão dessas proteínas foram avaliados. Células foram tratadas por 24h com meio e 50  $\mu\text{g/mL}$  de AO e a quantificação das proteínas foi feita por imunofluorescência. Embora o tratamento com AO não altere a expressão de Bcl-2 ele induziu um aumento nos níveis de Bax, deslocando o equilíbrio desses fatores para uma situação pro-apoptótica (Figura 22). A falta de efeito do AO sobre a expressão de Bcl-2 foi confirmada por citometria de fluxo (Figura 23).



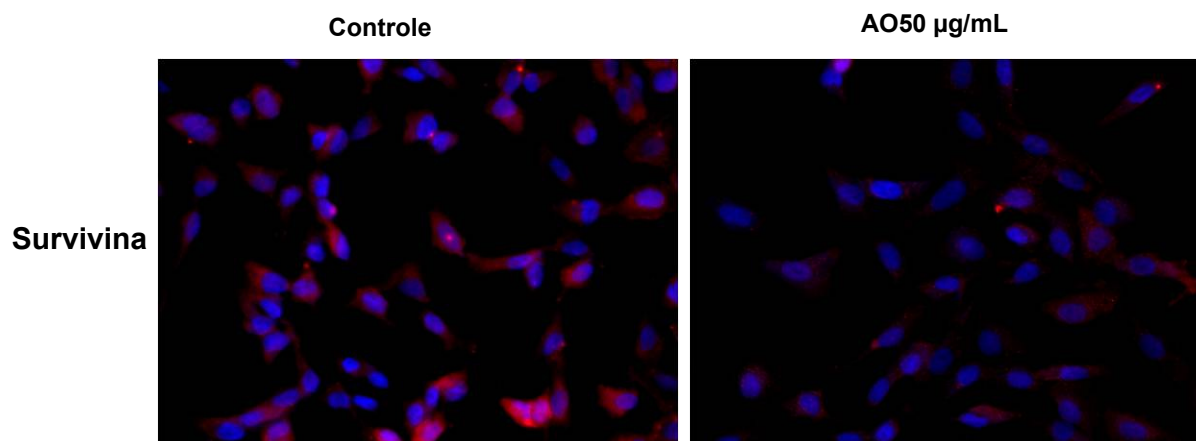
**Figura 22:** Imunofluorescência de células A549 tratadas com AO (200x). Células foram tratadas com meio (controle) ou AO50  $\mu\text{g/mL}$  por 24h, fixadas, marcadas com anticorpo primário específicos para Bax e Bcl-2, com o anticorpo secundário (conjugado a Cy3) e contracoradas com DAPI. A percentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI.



**Figura 23:** AO não altera os níveis de expressão de Bcl-2. A linhagem A549 foi tratada com meio (AF) ou AO50 µg/mL. Após 24h de incubação, as células foram recolhidas, permeabilizadas e incubadas com anticorpo anti-Bcl-2-PE (1:20) por cerca de 30 minutos a 4 °C e a fluorescência média intracelular foi medida por citometria de fluxo (FL-2/20.000 eventos).

Proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), como a survivina são conhecidas por bloquear a apoptose através da inibição de caspases e por antagonizar a apoptose mediada pela via mitocondrial. Como a survivina está expressa em altos níveis em NSCLC o efeito do AO sobre a expressão dessa proteína também foi avaliado em células tratadas com 50 µg/mL do triterpeno por 24h. Como pode ser visto na figura 24 o tratamento com AO causou um significativo declínio nos níveis de survivina, e desse modo, restabelecendo uma condição favorável à apoptose.



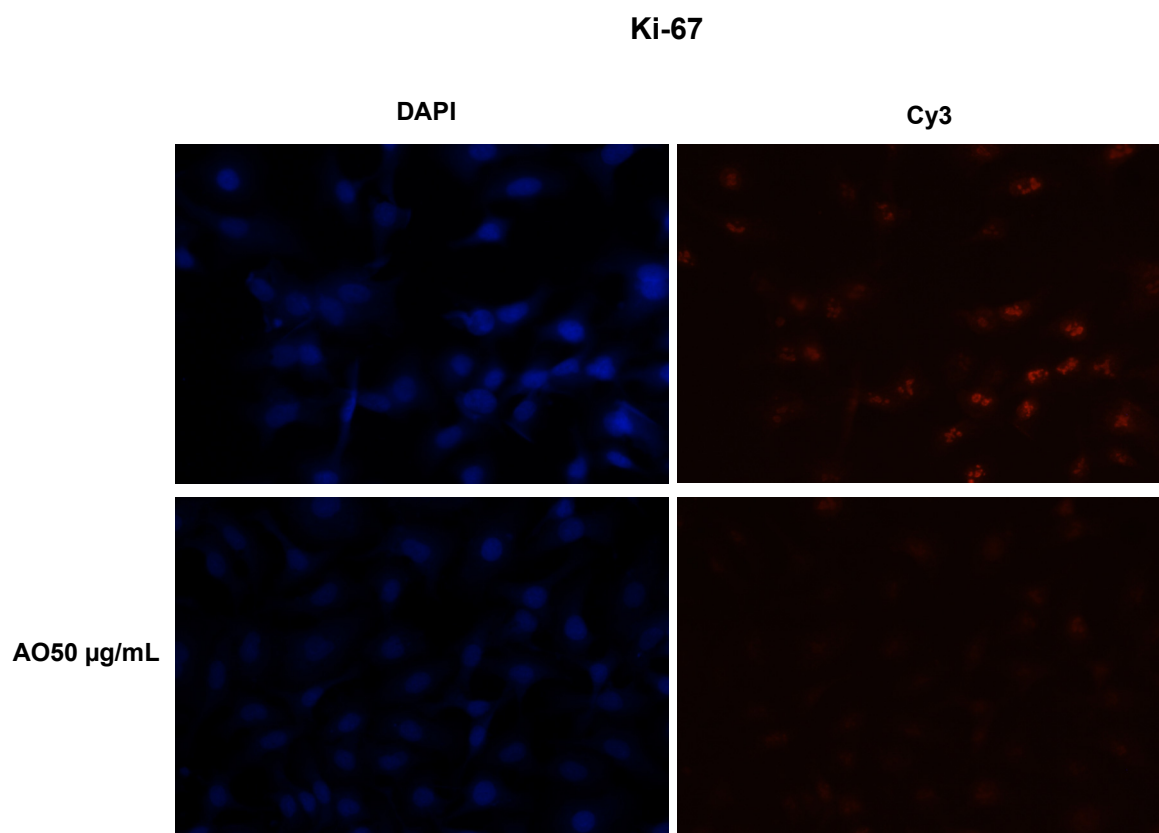


**Figura 24:** Imunofluorescência de células A549 tratadas com AO (200x). Células foram tratadas com meio (controle) ou AO50 µg/mL por 24h. Após a incubação as células foram fixadas, marcadas com anticorpo primário anti-survivina, com o anticorpo secundário (conjugado a Cy3) e contracoradas com DAPI. A porcentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI.

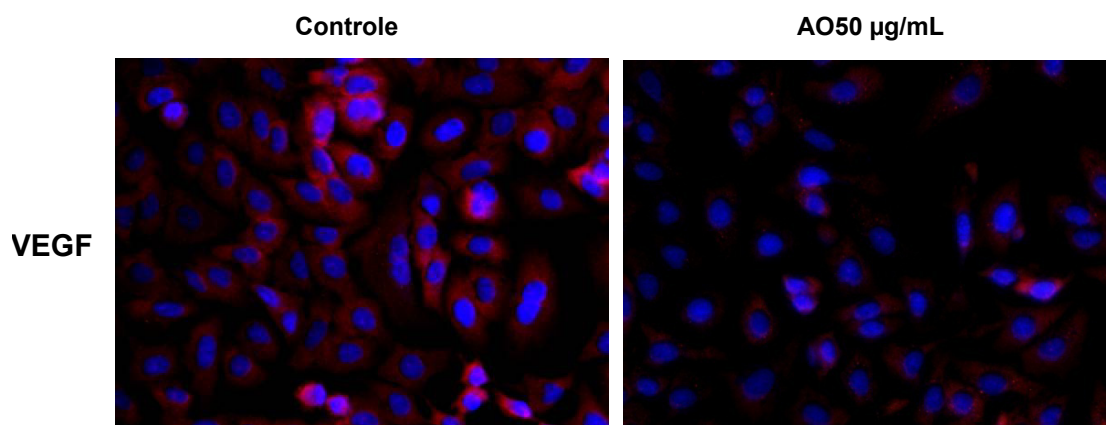
#### **4.4. AO interfere com a expressão de proteínas envolvidas na proliferação, angiogênese e metástase.**

A progressão do tumor e o desenvolvimento de metástases é um processo complexo que requer, entre outras coisas, a manutenção da proliferação celular, a aquisição de capacidade migratória e a invasão de novos sítios. Dentre os vários marcadores utilizados para acompanhar esses processos, Ki-67, uma proteína que está presente durante toda fase ativa do ciclo celular ( $G_1$ , S,  $G_2$  e mitose) e está ausente na fase  $G_0$  (SCHOLZEN & GERDES, 2000), tem sido usada como um indicador de proliferação celular. Outra proteína importante no processo metastático é a ADF/COFILINA, uma proteína que atua no remodelamento do citoesqueleto de actina (MACIVER & HUSSEY, 2002) e cuja atividade está implicada na malignidade e propriedades invasivas de células tumorais (WANG et al., 2006). Proteínas envolvidas com a formação de novos vasos (angiogênese) como o VEGF, também tem um papel relevante no desenvolvimento de metástase. Assim, o papel do AO na expressão de proteínas envolvidas na proliferação (Ki67), angiogênese (VEGF) e

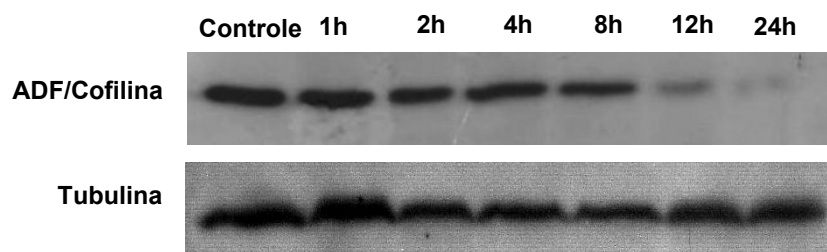
metástase (ADF/cofilina) foi avaliado por imunofluorescência e western blotting. Como pode ser visto nas figuras 25 e 26 o tratamento com 50 µg/ mL de AO por 24 h reduziu de maneira significativa os níveis de Ki-67 e VEGF. Resultados similares foram obtidos com a proteína ADF/cofilina; a figura 27 mostra que a redução dos níveis de cofilina iniciou a partir de 12h de tratamento com 50 µg/mL de AO e esta redução fica mais expressiva em 24h de tratamento. Esse conjunto de resultados sugere que o AO possa modular negativamente o desenvolvimento de metástases (Figura 28).



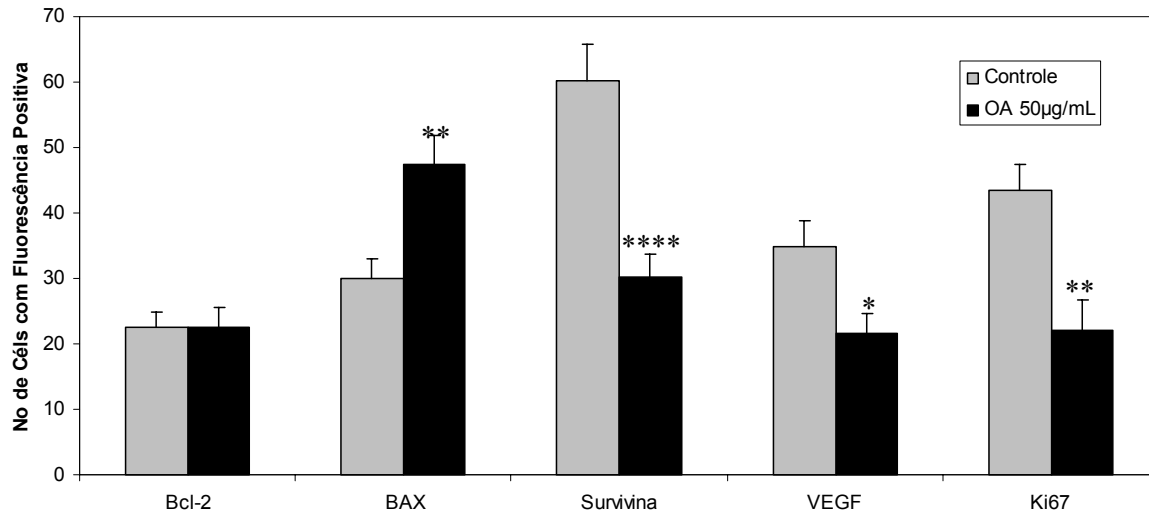
**Figura 25:** Imunofluorescência de células A549 tratadas com AO (200x). As células A549 foram tratadas com meio (controle) ou AO50 µg/mL por 24h. Após o período de incubação as células foram fixadas, marcadas com anticorpo primario anti- Ki-67, com o anticorpo secundário (conjugado a Cy3) e contracoloradas com DAPI. A percentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI.



**Figura 26:** Imunofluorescência de células A549 tratadas com AO (200x). Células foram tratadas com meio (controle) ou AO50 µg/mL por 24h, fixadas, marcadas com anticorpos para proteína VEGF e com o anticorpo secundário (conjugado a Cy3) e contracoradas com DAPI. A porcentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI.



**Figura 27:** Efeito de AO sobre a expressão da proteína ADF/cofilina. As células A549 foram tratadas com meio (controle) e AO50 µg/mL em diferentes tempos. As células foram lisadas, e o *pellet* utilizado para análise em western blotting.

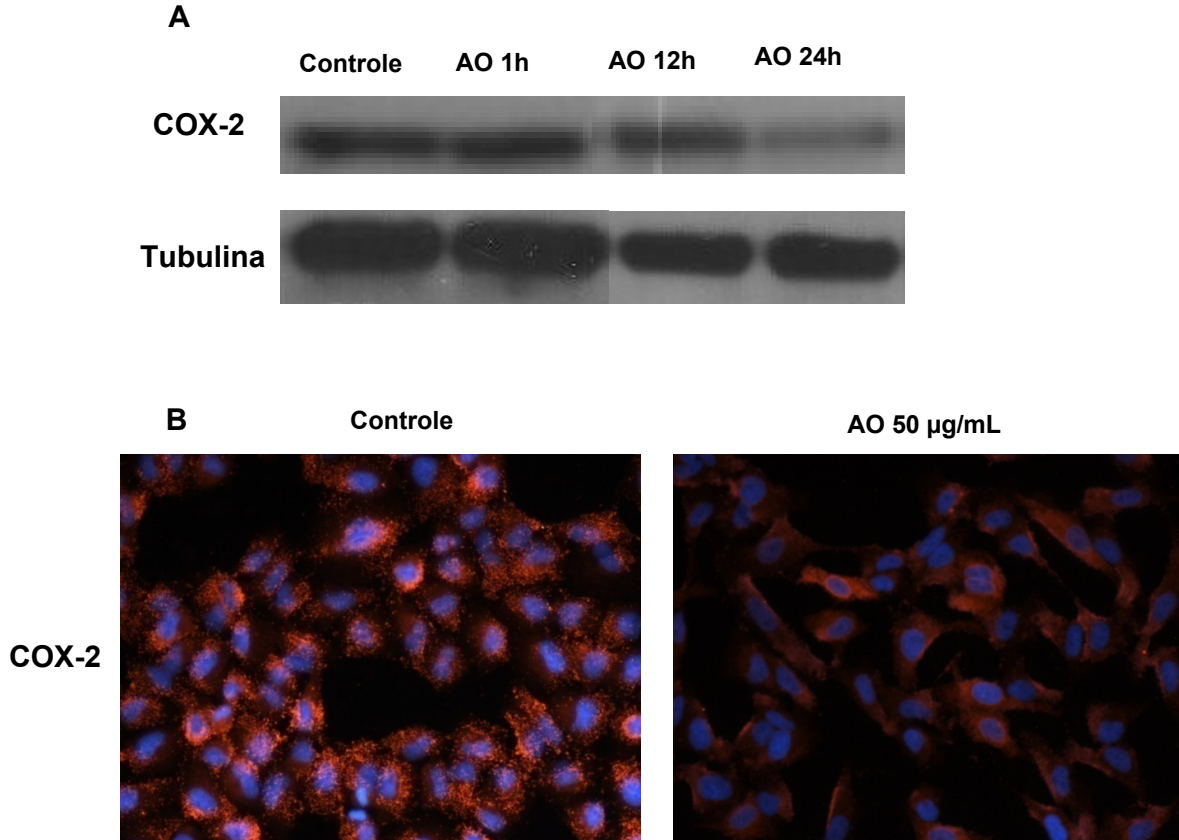


**Figura 28:** AO modula os níveis de expressão de proteínas envolvidas com a resistência tumoral. O gráfico representa a porcentagem de células positivamente marcadas. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o controle (Meio). A porcentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI.

#### 4.5. Efeito do AO sobre COX-2

Vários tipos de tumores mostram expressão constitutiva de COX-2 e tem sido proposto que essa enzima e seus metabólitos como a  $PGE_2$  contribuem para o aumento da resistência à quimioterapia e favorecem o desenvolvimento de metástases. E tem sido mostrado na literatura que a linhagem A549 apresenta altos níveis de COX-2 (KANG et al., 2005) e também já foi mostrado que COX-2 através de  $PGE_2$  contribui a para a expressão de diferentes proteínas importantes no processo de tumorigênese, essas proteínas incluem: Bcl-2 (SINGH et al., 2008; YU & JOVE, 2004), survivina (KRYSAN et al., 2004a; KRYSAN et al., 2004b), VEGF (NIU et al., 2002), bombas de efluxo (LIU et al., 2010; SOROKIN et al., 2004) e invasão (DOHADWALA et al., 2001). Além disso, este trabalho já mostrou que AO foi capaz de diminuir os níveis de expressão da maioria destas proteínas induzidas por COX-2 (Figura 28), então nós nos perguntamos se o AO seria capaz de modular os níveis de

COX-2 devido a sua propriedade anti-inflamatória, já que alguns inibidores de COX-2 são capazes de inibir estas mesmas proteínas (LIU et al., 2010; MAO et al., 2006; KANG et al., 2005; SOROKIN et al., 2004; FERRANDINA et al., 2003; LIU et al., 1998). Para isto células A549 foram plaqueadas, tratadas com meio ou AO por 24h, fixadas e incubadas com anticorpo específico para COX-2 e os níveis desta proteína foi avaliada por citometria de fluxo western blotting. Como mostrado na figura 29 (A e B) AO foi capaz de diminuir os níveis de expressão de COX-2 nas duas metodologias testadas e esse efeito fica evidente em 24h de tratamento.

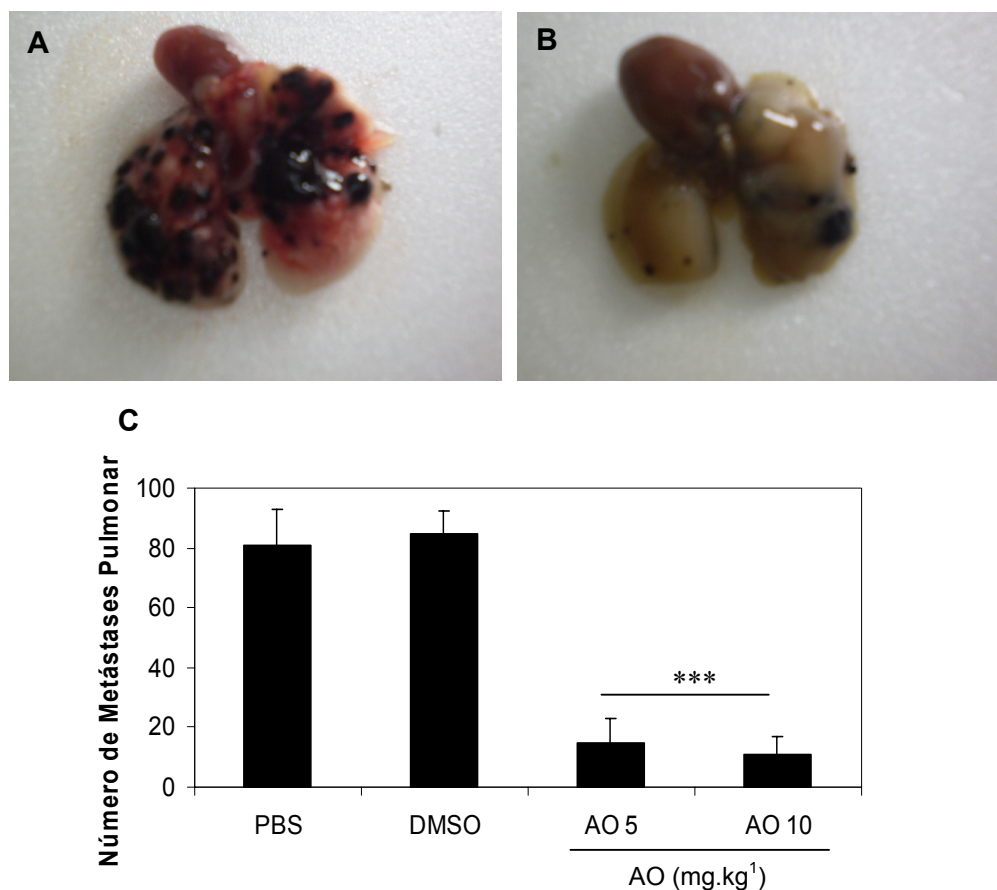


**Figura 29:** Efeito de AO na expressão da proteína COX-2. (A) Células A549 foram tratadas com meio (controle) ou AO50 µg/mL em diferentes tempos. As células foram lisadas e o *pellet* utilizado para análise em western blotting. (B) Imunofluorescência de células A549 tratadas com meio (controle) ou AO50 µg/mL por 24h. Após a incubação as células foram fixadas, marcadas com anticorpos anti-COX-2, com anticorpo secundário (conjugado a Cy3) e contracoloradas com DAPI. A percentagem de células positivas foi calculada sobre o total de células marcadas com DAPI.

#### 4.6. Efeito do AO sobre o Desenvolvimento de Metástases

Tendo em vista que o AO é capaz de matar tumores que expressam o fenótipo MDR e, a hipótese de que células MDR contribuem para o estabelecimento de metástases, a capacidade do AO em inibir esse processo foi avaliada. Para isso utilizou-se células do melanoma B16F10 que expressa MRP1 ativa (Anexo 1 e 2). Metástases pulmonares foram induzidas pela inoculação intra-venosa (i.v) de células do melanoma murino B16F10 em camundongos C57BL/6 (SAWADA et al., 2004).

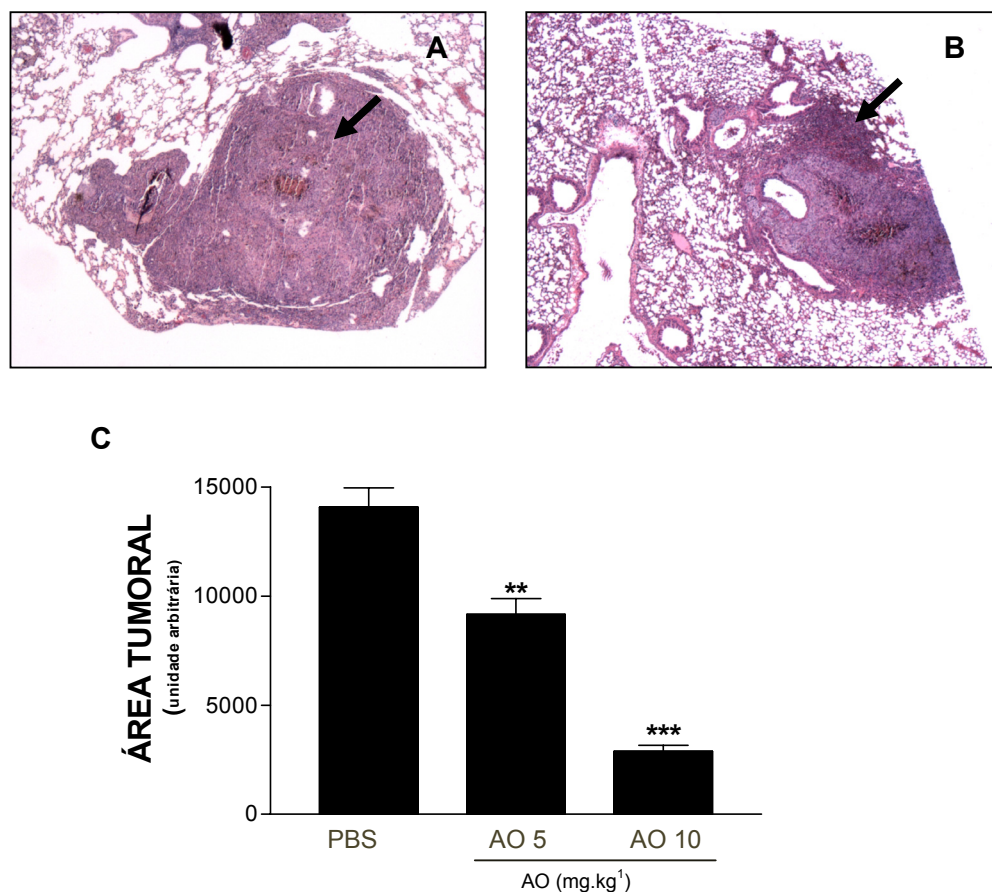
Grupos de animais (n= 5-7 animais) foram tratados por via nasal com PBS ou AO (5 ou 10 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) segundo o esquema já apresentado anteriormente (Figura 13). No 18º dia os animais foram eutanasiados e o número de metástases contado. Os resultados apresentados na figura 30 (A e B) mostram o numero de nódulos metastáticos em pulmões de camundongos tratados com PBS e AO 10 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> e a figura 30 (C) mostra que o tratamento com AO inibe significativamente o desenvolvimento destas metástases.



**Figura 30:** AO inibe o desenvolvimento de metástase. Grupo de camundongos (n= 5-7) injetados na veia da cauda (i.v.) com células do melanoma murino B16F10. Após três dias de inoculação, os animais foram tratados com salina (A) ou AO (5 mg Kg<sup>-1</sup> ou 10 mg Kg<sup>-1</sup> dia) (B) como descrito no material e métodos e, (C) número de metástases pulmonares foram contadas no 18º dia. \*\*\* p<0,001 comparado com PBS e DMSO. Os resultados expressam a média ± DP de 3 experimentos independentes.



Para obter mais dados sobre essa observação foi realizada uma análise histopatológica. Para isso, os pulmões retirados dos camundongos eutanasiados foram fixados em formol tamponado, emblocados em parafina e cortes de 4  $\mu\text{m}$  do material foram corados por H&E. O tamanho das metástases foi avaliado por histomorfometria como descrito em material e métodos. Os resultados obtidos na figuras 31 mostram que além de reduzir o número de metástases o AO também é capaz de reduzir a área tumoral.



**Figura 31:** Fotomicrografia do pulmão de camundongos C57BL/6 (20x). Camundongos C57BL/6 foram inoculados com  $10^6$  células do melanoma B16F10 e tratados com salina (A) ou AO ( $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  dia) (B) como descrito no esquema da figura 13. Os animais foram sacrificados, os pulmões retirados, fixados e parafinados. Foram realizados cortes de 4  $\mu\text{m}$  do tecido pulmonar e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE). As setas indicam a área tumoral. (C) Quantificação da área tumoral den animais tratados com PBS e AO (5 e  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  dia). \*\*  $p > 0,01$ , \*\*\*  $p > 0,001$  comparados com PBS.



## **5. DISCUSSÃO**

Câncer de pulmão é um dos principais responsáveis pelas mortes relacionadas a câncer. Segundo Jemal e colaboradores (2007), a nível global, essa neoplasia causa mais mortes que o câncer de próstata, colón e mama combinados. A sobrevida média em 5 anos é cerca de 16 % dos pacientes com câncer de pulmão e isso tem permanecido inalterado por mais de três décadas apesar do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e do desenvolvimento de terapias alvo-direcionadas (RECK E GATZEMEYER, 2008).

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é apontada como uma das principais causas da falha quimioterápica no câncer e do mau prognóstico de pacientes portadores desse tipo de doença (OZBEN, 2006). De fato, a observação de que cerca de 50 % de pacientes que respondem inicialmente ao tratamento apresentam reincidência e acabam morrendo da doença metastática tem sido atribuída ao desenvolvimento de MDR. A presença de resistência intrínseca ou adquirida a agentes quimioterápicos é considerado um dos maiores obstáculos para a eficiência do tratamento de pacientes NSCLC. A observação de que as células do epitélio pulmonar expressam proteínas MDR e que essa expressão aumenta com a tumorigênese (BEER et al., 1996; GIACCONE et al., 1996) poderia explicar alta resistência dos tumores de pulmão. Entretanto, esses tumores também apresentam defeitos nas vias de apoptose, o que contribui para sua resistência á quimioterapia. Essa pluralidade de mecanismos de resistência explica a falha dos tratamentos utilizados e sugere que um aumento de eficiência poderia ser obtido com compostos capazes de agir nos diferentes mecanismos que compõem o fenótipo MDR ou combinações de compostos ativos nessa diferentes vias.

Dados da literatura mostram que o AO possui atividade quimioprotetora e induz apoptose de linhagens de tumor de cólon (JANAKIRAN et al., 2008) e de leucemia (ZHANG et al. 2007; WANG et al., 2006). Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que o AO também é ativo contra uma linhagem leucêmica que superexpressa a proteína Pgp/ABCB1 (FERNANDES et al., 2003) e uma linhagem renal não-tumoral que expressa MRP1/ABCC1 (BRAGA et al., 2007). Os dados apresentados neste trabalho mostram que o AO é citotóxico para as duas linhagens de NSCLC que expressam de maneira constitutiva a proteína MRP1/ABCC1 (PESIC et al., 2008; TORKY et al., 2005). A morte induzida pelo AO é mediada por apoptose, como evidenciado por sua capacidade de induzir fragmentação de DNA e ativação de caspase-3 (Figura18).

A observação de que A549 e H460 não apresentam Pgp/ABCB1 ativa (Figura 21), mas mostram uma alta atividade de MRP1/ ABCC1 (Figura 19) sugere que o efeito do AO é independente da atividade e expressão dessa proteína. Entretanto, o efeito do triterpeno na atividade de MRP1 é aparentemente controverso, pois enquanto os resultados obtidos com a linhagem H460 sugerem um efeito modulatório mediado pelo AO (Figura 20), na linhagem A549 esse efeito não foi observado (Figura 20). A diferença entre esses resultados provavelmente se deve á expressão, pela linhagem A549, de outros membros da família ABCC (MRP-2, -3, -4, -5) (TORKY et al., 2005). De fato, dados da literatura descrevem que a MRP3/ ABCC3 presente na A549 tem atividade transportadora e está envolvida na resistência do câncer de pulmão (YOUNG et al., 2001; YOUNG et al., 1999). Um efeito modulatório do AO sobre a MRP1/ ABCC1 também foi observado numa linhagem não tumoral (BRAGA et al., 2007). Apesar deste trabalho levantar a hipótese de um possível efeito nefrotóxico do AO, resultados recentes da literatura (PATIL et al., 2009) mostram que

injeção de até 80 mg/Kg<sup>-1</sup> desse triterpeno não altera as enzimas marcadoras de danos hepáticos e renais e, mais ainda, ele protege contra a toxidez renal induzida por uma série de agentes químicos.

Trabalhos da literatura mostram que a proteína MRP1/ABCC1 é muito promíscua capaz de transportar vários substratos fisiológicos (leucotrieno, glutatona, glucoronídeo e outros) e não-fisiológicos, incluindo drogas anti-câncer (antraciclinas, alcalóides da vinca e etoposídeo) (BORST et al., 2002; SHARON, 2008). Tem sido proposto que essa característica, além de ser um significativo indicador da falha de resposta quimioterápica, contribui para a baixa sobrevida nos pacientes NSCLC (BERGER et al., 2005; OSHIKA et al., 1998; OTA et al., 1995). Nesse contexto, o fato de AO não ser um substrato para MRP1/ ABCC1 e de ser capaz de matar linhagens tumorais cuja resistência é mediada pela expressão dessa proteína é de grande interesse para seu possível uso no tratamento de tumores de pulmão que apresentam expressão intrínseca de MRP1/ A BCC1.

A capacidade do AO em matar tumores que expressam proteínas transportadoras (MDR) tem grande apelo para a clínica já que a expressão dessas proteínas tem sido correlacionada com a falha quimioterápica em vários tipos de câncer inclusive o de pulmão (DOUBRE et al., 2005; VAN DE DEEN et al., 2005). De fato, uma avaliação dos níveis de mRNA para MRP1/ ABCC1, BCRP/ABCG2 e LRP em 46 amostras de biópsia transbronquial de pacientes NSCLC no estágio IIIA N2 de pacientes tratados por dois ciclos de quimioterapia neoadjuvante baseado em cisplatina, mostrou que pacientes com baixa expressão de MRP1/ABCC1 ou LRP mostravam uma melhora significativa na resposta histopatológica e uma longa sobrevida livre de tumor comparado aos pacientes com alta expressão dessas proteínas (LI et al., 2009). Um outro trabalho realizado com 40 pacientes de SCLC,

nos quais a expressão das proteínas Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 e LRP foi avaliada em relação à resposta quimioterápica (cisplatina e etoposídeo), mostrou que a expressão de Pgp/ABCB1 e MRP1/ABCC1 era negativa para pacientes com boa resposta à quimioterapia e que a expressão de LRP não interferia no prognóstico (YEH et al., 2005). O fato do AO não alterar os níveis de expressão da proteína MRP1/ABCC1 (Figura 21), também é de interesse para a clínica, pois indica que o seu uso como co-adjuvante nas terapias anti-tumorais não resultará no desenvolvimento de uma resistência adicional. Contrário aos resultados obtidos neste trabalho, o tratamento com outros quimioterápicos capazes de induzir a morte de células de câncer de pulmão induz resistência adquirida (TRILLER et al., 2006; BERGER et al, 2005; SIDDIK et al., 2003) ou interferem na expressão da MRP1/ABCC1 (KANG et al., 2005).

Trabalhos na literatura têm apontado o envolvimento de alterações da expressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 com a resistência à quimioterapia no câncer de pulmão (TSE et al., 2008; RUDIN et al., 2004; MORRIS et al., 2002). Devido ao papel modulador das proteínas da família Bcl-2 da ativação da via intrínseca de apoptose, tem sido proposto que o balanço dos membros pró- e anti- apoptóticos desta família possa determinar o destino do processo apoptótico (BLAGOSKLOSNY et al., 2003; DEBATIN et al., 2002). Nossos resultados mostraram que o AO não interfere com os níveis de expressão de Bcl-2 (Figuras 22), mas induz aumento dos níveis da proteína pró-apoptótica, Bax (Figura 22), sugerindo que o efeito citotóxico do AO pode ser mediado pela modulação de proteínas envolvidas na via mitocondrial. Assim, enquanto homodímeros de Bax formam um canal que leva à permeabilização da membrana mitocondrial externa e à conseqüente liberação de citocromo c e outras moléculas pró-apoptóticas a

atividade anti-apoptótica da proteína Bcl-2 se deve á sua capacidade de formar heterodímeros com Bax ou competir com sítios que seriam ocupados por ele na membrana mitocondrial impedindo desse modo, sua atividade (CORY & ADAMS, 2002). Bcl-2 também parece inibir a trajetória apoptótica independente de Apaf-1/caspase-9 e que poderia depender da caspase-7 como uma caspase central efetora (MARSDEN, 2002). Alteração do balanço de proteínas pró- e anti apoptóticas da família Bcl-2 também foi observado por tratamento com pyrogallol em linhagens de câncer de pulmão (YANG et al., 2009) e por tratamento com beauverecin (BEA) na linhagem A549 (LIN et al., 2005). Hoje já se tem descrito muitos inibidores específicos para as proteínas anti-apoptóticas. O GX15-070, um inibidor que se liga a proteína Bcl-2 e interfere com a sua habilidade de se ligar a proteínas pró-apoptóticas, como por exemplo, Bax, induz apoptose dependente de caspase em células de câncer (LI et al., 2008). GX15-070 pode também levar a fosforilação da proteína pró-apoptótica Bim (BH3-only) e induzir a translocação de Bim para a mitocôndria. (LI et al., 2008). Porém o mesmo não foi visto com o inibidor ABT 737, que não apresenta efeito citotóxico para a linhagem A549, ele apenas aumenta a potencialidade de determinados quimioterápicos (ex: paclitaxel) (OLTERSDORF et al., 2005).

Outro importante mecanismo de resistência á quimioterapia é a inibição da apoptose mediada pela superexpressão de proteínas inibidoras de apoptose (família das IAPs), que agem principalmente por se ligar a caspases iniciadoras e efetoras bloqueando sua atividade (SCOTT et al., 2005; DEBATIN, 2004). Alteração de membros dessa família, como a survivina, já foi descrita em linhagens tumorais inclusive câncer de pulmão (KREPELLA et al., 2009; KIM et al., 2009; ROMAGNOLI et al., 2008; HOFMANN et al., 2002). Dependendo de sua localização citoplasmática

ou nuclear a survivina tem um papel na diferenciação celular ou na apoptose (ALTIERI, 2003; MITA et al., 2008; SRINIVASULA & ASHWELL, 2008). Na A549 que expressa altos níveis de survivina (TAMM et al., 1998), o tratamento com AO reduz a expressão dessa proteína sugerindo um efeito facilitador da indução de apoptose (Figura 24). Efeitos semelhantes foram obtidos por outros autores, que usando oligonucleotídeos anti-survivina, observaram sensibilização de A549 ao tratamento com etoposídeo (OLIE et al., 2000) e de H460 à radiação (LU et al., 2004). O efeito do AO sobre a survivina mostra que além de interferir nas vias de resistência mediada por alterações de proteínas da família Bcl-2 esse triterpeno também interfere com mecanismos mediados pela superexpressão de IAPs. De fato, que a utilização de determinadas drogas que inibem survivina são capazes de torna as células tumorais mais susceptível a apoptose (SRINIVASULA & ASHWELL, 2008; LU et al., 2004; HU et al., 2003 ; OLIE et al., 2000) .

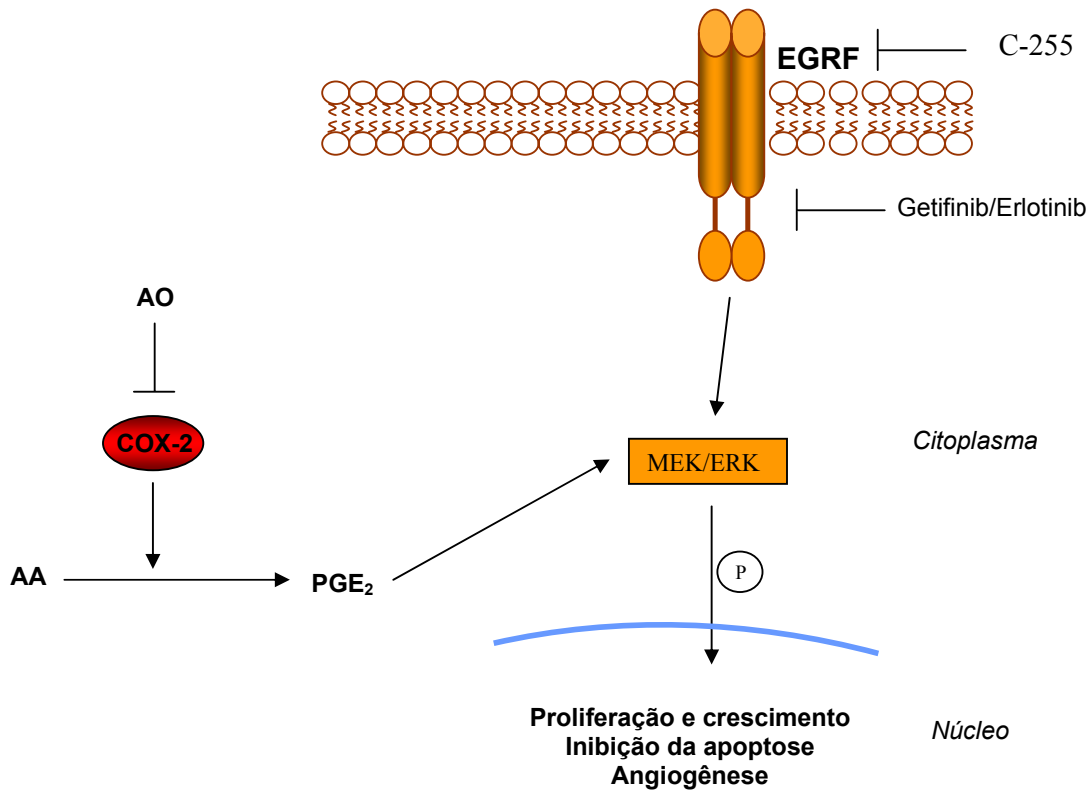
Uma das conseqüências da falha quimioterápica é a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases, um processo complexo que envolve várias etapas incluindo o rearranjo do citoesqueleto, aquisição de capacidade migratória e finalmente a formação de tumores secundários em locais distantes do sítio primário. Nosso trabalho investigou o efeito do AO sobre a expressão de ki-67 (Figura 25) uma proteína envolvida com a proliferação, descrito pela literatura como um fator desfavorável no prognóstico em NSCLC (MARTIN et al., 2004) e sobre ADF/cofilina (Figura 27), uma proteína chave na regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina e na migração de células *in vitro* e *in vivo* (SIDANI et al., 2007; WANG et al. 2006). Os dados obtidos neste trabalho mostraram que AO induz a diminuição dos níveis destas proteínas, sugerindo que ele também atue inibindo o desenvolvimento de metástases. Em concordância com os nossos resultados de Mao e colaboradores

(2006) mostrou que o uso de celecoxib é capaz de reduzir significativamente ki-67. Em adição foi demonstrado por Wang e colaboradores (2006) que modulação LIMK1 (LIM cinase 1), proteína envolvida em invasão, intravasão e metástase e por fazer parte da trajetória da cofilina, afeta proporcionalmente a atividade da ADF/cofilina. Foi também demonstrado que o AO é capaz de diminuir os níveis de VEGF (Figura 26), um importante fator angiogênico que estimula a proliferação e migração de células endoteliais e cuja alta expressão tem sido associada com mau prognóstico de pacientes com câncer de pulmão (SINGHAL et al., 2005). Inibidores de VEGF capazes de bloquear a ativação do receptor ou a cascata de sinalização intracelular (Bevacizumab, VEGF-trap, PTK787 e outros) têm sido usados sozinhos ou em combinação com outros quimioterápicos, para o tratamento de pacientes com NSCLC em estágio avançado. Entretanto, a pequena melhora observada nos pacientes é acompanhada de vários efeitos secundários tais como hipertensão, náusea e diarreia e no caso do bevacizumab, hemorragia e necrose (JOHNSON et al., 2004). Além disso, o benefício obtido com o uso desses compostos é transitório, sendo seguido de restauração no crescimento e progressão do tumor. Portanto o bloqueio do VEGF como terapia para o câncer ainda requer o desenvolvimento de agentes menos tóxicos e mais eficazes (CABEBE et al., 2007) como o AO.

Os resultados apresentados nesse trabalho também mostraram que tratamento com AO reduz a expressão de COX-2 (Figura 29), enzima expressa constitutivamente em altos níveis em diversos tipos de neoplasias inclusive o câncer de pulmão (KIRSCHENBAUM, et al., 2001; SHAMMA et al., 2000; HOSOMI et al., 2000; FUJITA et al., 1998). A proposição de que a COX-2 e seu metabólitos como a PGE2 atuam sobre o tumor, estimulando a produção de fatores anti-apoptóticos como survivina e Bcl-2 (SINGH et al., 2008; KRYSAN et al., 2004a; KRYSAN et al.,

2004b; KRYSAN et al. 2005) e de fatores angiogênicos e metastáticos (NIU et al., 2002; DOHADWALA et al., 2001; RATNASINGHE et al., 2001) evidenciam o papel central dessa enzima no desenvolvimento e expansão do tumor e servem de base para vários estudos objetivando o uso de anti-inflamatórios como co-adjuvante no tratamento do câncer (RASPELLINI & TADDEI, 2007). Portanto, é possível postular que o efeito inibitório do AO sobre as proteínas envolvidas com a resistência à quimioterapia, desenvolvimento do tumor e de metástase possa ser mediado pela modulação da COX-2 (Figura 32). De fato, alguns trabalhos têm mostrado que o uso de NSAIDs e coxibs reduzem os níveis de COX-2 e que, em alguns casos, essa inibição torna a célula tumoral mais susceptível a apoptose (KIM et al., 2009; CHEN et al., 2008; ALAM et al., 2007; KERN et al., 2002; FOSSLIN, 2000; PYO et al., 2001; LIU et al., 1998). Portanto, se a resistência no câncer de pulmão é mediada por vários mecanismos modulados pela COX-2 e o AO é capaz de interferir tanto na expressão da COX-2 como nas vias que ela modula, esse triterpeno parece ser uma boa alternativa para o tratamento de pacientes com NSCLC.





**Figura 32:** Mecanismo de ativação da trajetória de MAPK/ERK pela COX-2.

Dados obidos por Sawada e colaboradores (2004) mostraram que o ácido betulínico (AB), também um triterpeno pentacíclico, foi capaz de reduzir o número de metástases pulmonares induzidas por células do melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6; resultados similares foram obtidos com AO nas mesmas condições expermentais utilizada pelo AB, sendo que o AO foi mais eficiente que o AB na mesma concentração utilizada (10 mg/kg<sup>1</sup>). A atividade anti-metastática já havia sido investigada por contagem de nódulos metastáticos (SAWADA et al., 2004; KANG et al. 2000). Isso poque as células do melanoma B16F10 preferencialmente induzem metástase pulmonar (GUDE et al., 2001). Dados histopatológicos mostram que essa redução se deu tanto em nível de número de nódulos metastáticos quanto em nível de àrea tumoral (Figuras 30 e 31).

## **6. CONCLUSÕES**

Portanto, este trabalho corrobora com outros trabalhos da literatura que apresentam os triterpenos como uma classe de produtos naturais com excelente potencial antitumoral. Os resultados aqui apresentados mostraram que o AO inibiu a viabilidade celular e induziu fragmentação de DNA de forma dependente de caspase-3, nas duas linhagens de NSCLC, que expressam proteína MRP1/ABCC1 ativa e que este triterpeno não foi capaz de interferir com os níveis desta proteína. Foi mostrado também que o AO é capaz modular negativamente os níveis de diferentes proteínas envolvidas com a resistência do tumor (apoptose, proliferação, angiogênese e metástase) na linhagem A549. Além disso, foi visto também que o AO é capaz de interferir no desenvolvimento de metástase *in vivo*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABDEL-ZAHER, A.O.; MAHMOUD, M.; ABDEL-RAHMAN; HAFEZ, M.M.; OMRAN, F.M. Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. **Toxicology**, v. 234, p. 124–134, 2007

ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v.26, p.1324–37, 2007.

ALAN, .M.; WANG, J.H.; COFFEY, J.C.; QADRI, S.S.; O`DONNEL, A.; AHERNE, T.; REDMOND, H.P. Characterization of the Effect of Cyclooxygenase-2 Inhibition in the Regulation of Apoptosis in Human Small and Non-Small Cell Lung Cell Lines. **Annals of Surgical Oncology**, v.5, p. 241-247, 2007.

ALTIERI, D.C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. **Oncogene**, v. 22: p.8581-8589, 2003.

AMBUDKAR, S.V.; DEY, S.; HRYCYNA, C.A.; RAMACHANDRA, M.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M.M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 39, 361-398, 1999.

ANDREAS, G. Introduction to Apoptosis. **ApoReview**, p. 1-26, 2003.

ANDERSON, N.S.; TURNER, L.; LIVINGSTON, S.; CHEN, R.; NICOSIA, S.V.; KRUK, P.A. Bcl-2 expression is altered with ovarian tumor progression: an immunohistochemical evaluation. **J. Ovarian Res.**, v. 2, p.:16-27, 2009.

ARINAGA, M.; NOGUCHI, T.; TAKENO, S.; CHUJO, M.; MIURA, T. and UCHIDA Y. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer**; v.97, p.457-64, 2003.

ARAKI, J.; OKAMOTO, I.; SUTO, R.; ICHIKAWA, Y.; SASAKI, J-I. Efficacy of the tyrosine kinase inhibitor gefitinib in patient with metastatic small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v.48, p.141-144, 2005.

ASTUDILLO, L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUES, J.A. Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice. **J Pharm. Pharmacol.**, v.23, p.583-588, 2002.

BAIRD, R.D.; KAYE, S.B. Drug resistance reversal-are we getting closer ? **European J. of Cancer**, v.39, p.2450–2461, 2003.

BATES, S.E.; ROBEY, R.; MIYAKE, K.; RAO, K.; ROSS, D.D. AND LITMAN T. The role of half-transporters in multidrug resistance. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v.33, n.6, p.503-511, 2001.

BEER, T.W.; ROWLANDS, D.C.; CROKER, J. Detection of the multidrug resistance marker P-glycoprotein by immunohistochemistry in malignant lung tumours. **Thorax**, v. 51, p. 526-529, 1996.

BERGER, W.; SETINEK, U.; HOLLAUS, P.; ZIDEK, T.; STEINER., E.; ELBLING, L.; CANTONATI, H.; ATTEMS, J.; GSUR, A; MICKSCHE, M. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.131, n.6, p.355-63, 2005.

BLAGOSKLOSNNY, M.V. Targeting cancer cells by exploiting their resistance. **Drug Disc. Today**, v.8, p.1104-1108, 2003

BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D.R. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. **J Biol Chem**. v.18, n. 274(25), p. 17484-90, 1999.

BOSSY-WETZEL, E.B.; DONALD D.NEWMAYER, D.D.; GREEN, D.R. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane Depolarization. **The EMBO Journal**, v.17, n.1 p.37–49, 1998.

BRAGA, F.; AYRES-SARAIVA, D.; GATTASS, C.R. AND CAPELLA, M.A. Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. **Cancer Lett.**, v.248, p.147–152, 2007.

BORST, P.; ELFERINK, R. O. Mammalian ABC Transporters in Health and Disease. **Annu. Rev. Biochem.**, v.71, p.537-592, 2002.

BRAMBILIA, E.; TRAVIS, W.D.; COLBY, T.V.; CORRIN, B.; SHIMOSATO, Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. **Eur. Respir. J.**, v.18, p.1059-1068, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil**/ Instituto nacional do Cancer - Rio de Janeiro: INCA, p1-98, 2009.

BUDIARDJO, I.; OVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical Pathway of Caspase activation During Apoptosis. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.15, p.269-290, 1999.

BURLACU, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. **Cell. Mol. Med.**, v. 7, n. 3, p. 249-257, 2003.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural products-derived compounds 590 in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, 475–516, 2008.

CAI, J.; YANG, J.; JONES, D.P. Mitochondrial control of Apoptosis: the role of cytochrome c. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1366, p.139-149, 1998

CABEBE, E.; WAKELEE, H. Role of Anti-angiogenesis Agents in reating NSCLC: Focus on Bevacizumab and VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. **Curr. Treat. Options Oncol.**, v.8, p.15-27, 2007.

CASCONE, T.; GRIDELLI, C. AND CIARDIELLO, F. Combined targeted therapies in non-small cell lung cancer:a winner strategy? **Curr. Opin. Oncol.**, v.19, p.98–102, 2007.

CASCORBI, I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. **Pharmacol Ther.**, v.12, n.2, p.457-73, 2006.

CHANG, X.B. A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. **Cancer Metastasis Rev.**, 26(1), 15-37, 2007.

CHEN, Y-M. Clinical Application of Epidermal Growth factor Receptor-Tyrosine Kinase bitors against Non-Small Cell Lung Cancer. **J. Cancer Molecules**, v.1, n.2, p. 83-91, 2005.

CHIANG, L.C.; NG, LT.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; LIN, C.C. Immunomodulatory activies of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of plantago species. **Planta Med.**, v.69, n.7, p. 600-604, 2003.

CHOI, C-H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. **Cancer Cell International**, v. 5, p.30-43, 2005.

CIARDIELLO, F.; GIAMPAOLO, T. EGFR Antagonist in Cancer Treatment. **The New England J. Medic.**, v.358, p.1160-1173, 2008.

CITRI, A. AND YARDEN, Y. EGF-ERBB $\beta$  signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7:505-516, 2006

COLE, SP.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J.H.; MACKIE, J.E.; GRANT, C.E.; ALMQUIST, K.C.; STEWART, A.J.; KURZ, E.U.; DUNCAN, A.M.; DEELEY, R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**,v.258, n.5088, p.:1650-1654, 1992.

COLE, S.P.C. AND DEELEY, R.G. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1 TRENDS in Pharmacological. **Sciences**, v. 27, n. 8, p. 336-348, 2006.

CORY, S.; ADAMS. J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.9, p. 647-56, 2002.

CRAGG, G.M.; NEWMANN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol**, v.100, p.72-79, 2005.

D'AMATO TA, LANDRENEAU RJ, MCKENNA RJ, SANTOS RS, PARKER RJ. Prevalence of in vitro extreme chemotherapy resistance in resected nonsmall-cell lung cancer. **Ann. Thorac. Surg.**, v.81, p.440-446, 2006.

DAI, Y.; GRANT, S. Targeting Multiple Arms of the Apoptotic regulatory Machinery. **Cancer Res**. v.67, n.7, p. 2908-2911, 2007.

DANNENBERG, J.A.; LIPPMAN, S.M.; MANN, J.R.; SUMMARAMAIAH, K. AND DUBOIS, R.N. Cyclooxygenase -2 and epidermal growth factor receptor: Pharmacologic targets for chemoprevention. **J. Clin. Oncol.**, v.23, n.2, p. 254-266, 2005.

DEBATIN, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunol. Immunother.**, 53(3), 153-159, 2004.

DEBATIN, K.M.; PONCET, D.; KROEMER, G. Chemotherapy, targeting the mitochondrial cell death pathway. **Oncogene**, v.21, p. 8786-8803, 2002.

DOGNÉ, J-M.; SUPURAN,C.T.; PRATICO, D. Adverse Cardiovascular Effects of the Coxibs. **J. Med.Chem.**, v. 48, n.7, p. 2251-2257, 2005.

DOHADWALA, M.; LUO, J.; ZHU, L.; LIN,Y.; DOUGHERTY, G.J.; SHARMA, S.; HUANG, M.; LD, M.P.; BATRA, R.K.; DUBINETT, S.M. Non-small Cell Lung Cancer Cyclooxygenase-2-dependent Invasion Is Mediated by CD44. **J. Biological Chem.**, v. 276, n. 24, p. 20809-20812, 2001

DOHADWALA, M.; YANG, S-C.; LUO, J.; SHARMA, S.; BATRA, R.K.; HUANG, M.; LIN, Y.; GOODGLICK, L.; KRYSAN, K.; FISHBEIN, M.C.; HONG, L.; LAI, C.; CAMERON, R.B.; GEMMILL, R.M.; DRABKIN, H.A.; DUBINETT, S.M. Cyclooxygenase-2-Dependent Regulation of E-Cadherin: Prostaglandin E2 Induces Transcriptional Repressors ZEB1and Snail in Non-Small Cell Lung Cancer. **Cancer Res**, v.66, n. 10, 15-, 2006

DOHI, T.; BELTRANI, E.; WALL, N.R.; PLESCIA, J.; ALTIERI, D.C. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. **J. Clin. Invest.**, v.114, p. 1117-1127, 2004

DOLL, S.R. Smoking and lung cancer. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 162, p.4-6, 2000.

DOUBRE, H.; CÉSARI, D.; MAIROVITZ, A.; BÉNAC, C.; CHANTOT-BASTARAUD, S.; DAGNON, K.; ANTOINE, A.; DANIEL, C.; BERNAUDIN, J.F. AND FLEURY-FEITH, J. Multidrug resistance-associated protein (MRP1) is overexpressed in DNA aneuploid carcinomatous cells in non-small cell lung cancer (NSCLC) Int. **J. Cancer**, v.113, p.568-574, 2005.

DOYLE, L.A.; YANG, W.; ABRUZZO, L.V.; KROGMANN, T.; GAO, Y.; RISHI, A.K.; ROSS, D.D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proc Natl Acad. Sci.**, v.95, n.26, p.5665-5670, 1998.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, n.1, p. 33-42, 2000.

DUAN, H.; LUAN, J.; LIU , Q.; YAGASAKI, K.; ZHANG, G. Suppression of human lung cancer cell growth and migration by berbamine. **Cytotechnology**, 2009.

DVORAK, H.F. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J Clin. Oncol.**, v.20, p.4368-4380, 2002

EARNSHAW, W.C.; MARTINS, L.M.; KAUFMAN, S. Mammalian Caspase: structure, activation, substrates and function during apoptosis. **Ann. Rev. Biochemical**, v.68, p.383-424, 1999.

EL-RAYES, B.F.; LORUSSO, P.M. Targeting the epidermal growth factor receptor. **British Journal Cancer**, v. 91, n.3, p. 418-24, 2004.

ENGELMAN, J.A.; JÄNNE, P.A. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res.**, v.14, n.10, p.2895-2899, 2008.

FERNANDES, J.; CASTILHO, R.O.; COSTA, M.R.; SOUZA, K.W.; KAPLAN, M.A.C.; GATTASS, C.R. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letter**, v. 190, p.165-169, 2003

FERNANDES, J.; WEINLICH, R.; CASTILHO, R.O.; K.W.; KAPLAN, M.A.C.; AMARANTE-MENDES, G.P.; GATTASS, C.R. 2005. Pomolic acid triggers mitochondria- dependent apoptotic cell death in leukemia cell line. **Cancer Lett.** v. 219, p. 49–55, 2005.

FERENC, P.; SOLAR, P.; KLEBAN, J.; MIKES, J.; FEDOROCKO, P. Down-regulation of Bcl-2 an AKT induced by combination of photoactivated hypericin and genestein in human breast cancer cells. **J. Phot.**, v.98, p. 23-34, 2010.

FERRANDINA, G.; RANELLETTI, F.O.; LEGGE, F.; LAURIOLA, L.; SALUTARI, V.; GESSI, M.; TESTA, A.C.; WERNER, U.; NAVARRA, P.; TRINGALI, G.; BATTAGLIA, A.; SCAMBIA, G. Celecoxib Modulates the Expression of Cyclooxygenase-2, Ki67, Apoptosis-Related Marker, and Microvessel Density in Human Cervical Cancer: A Pilot Study. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p. 4324–4331, 2003.

FERREIRA, C.G.; EPPING, E. ; KRUYT, F.A.E. ; GIACCONE, G. Apoptosis: target of cancer therapy. **Clin. Cancer Res.**, v.8, p. 2024-2034, 2002



FUENTES-PRIOR, P.; SALVESEN, G. S. The protein structures that shape caspase activity, specificity activation and inhibition. **Biochem. J.**, v. 384, p. 201–232, 2004.

FESIK, S.W. Promoting Apoptosis as a Strategy for Cancer Drug Discovery. **Nature**, v.5, p.875-886, 2005.

FOSSLIEN, E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 30, n. 1, p. 3-21, 2000.

FOX, E. & BATES, S.E. Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. **Expert. Rev. Anticancer Ther.**, 7(4), 447-459, 2007.

FUJITA, T.; MATSUI, M.; TAKAKU, K.; UETAKE, H.; ICHIKAWA, W.; TAKETO, M.M.; SUGIHARA, K. Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas. **Cancer Res.**, 1998, 58, 4823.

FULDA, S.; DEBATIN, K.M. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. **Bioch. Biophys. Acta**, v.1705, p. 27– 41, 2004.

FULDA, S.; DEBATIN, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, 25: 4798–4811, 2006.

GETTINGER, S. Targeted therapy in advanced non-small-cell lung cancer. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v.29, n.3, p.291-301, 2008.

GEIGER, T.R.; PEEPER, D.S. Metastasis mechanisms. **Bioch. Biophys Acta**, v.1796, p. 293-308, 2009.

GEKELER V, ISE W, SANDERS KH, ULRICH WR, BECK J. The Leukotriene LTD(4) Receptor Antagonist MK571 Specifically Modulates MRP Associated Multidrug-Resistance. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 208, p. 345-352, 1995.

GIACCOME, G.; VAN ARK-OTTE, J.; RUBIO, G. J.; ET AL. MRP is frequently expressed in human lung-cancer cell lines, in non-small-cell lung cancer and in normal lungs. **Int. J. Cancer**, v.66, p.760-767, 1996.

GINER-LARZA, E.M.; MANEZ, S.; RECIO, M.C.; GINER, R.M.; PRIETO, J.M.; CERDA-NICOLAS, M.; RIOS, J.M. Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 428, p.137-143, 2001.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS,S.; ZHIVOTOVSKY, B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. **Bioch. BiophysActa**, v. 1757, p. 639–647, 2006.

GOLDMAN, L.; BENNET, J.C. **Tratado de Medicina Interna**. Editora Guanabara Koogan, 21<sup>a</sup> edição, Estado, Volume 1 p.498-514 , 2002.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO. T.; BATES. S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n.1, p. 48-58, 2002.

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, I. Biochemistry of Multidrug resistance Mediated by the multidrug transporter. **Ann. Rev. Bioch.**, v.62, p.385-427, 1993.

GUDE, R.P.; MENON, L.G.; RAO, S. G. Effect of Caffeine, a xanthine derivative, in the inhibition of experimental lung metastasis induced by B16F10 melanoma cells **J Exp Clin Cancer Res.**, v. 20, n. 2, p. 287-92, 2001

HAIMEUR, A.; CONSEIL, G.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. **Curr. Drug Metab.**, n.5, p: 21–53, 2004.

HARRIS, R.E. Cyclooxygenase-2 (Cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. **Inflammopharmacology**, v.17, p 55-67, 2009.

HARRIS, R.E.; BEEBE-DONK, J.; ALSHAFIE. Reduced Risk of Human Lung Cancer by Selective Cyclooxygenase 2 (COX-2) Blockade: Results of a Case Control Study. **Int. J. Biol. Sci.**, v.3, n.5, p. 328-334, 2007.

HENGARTNER, M.O. **The biochemistry of apoptosis**. Nature. v.407(6805), p. 770-6, 2000

HICHRI, F.; JANNET, H.B.; CHERIAA, J.; JEGHAM, S.; MIGHRI. Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds. **C.R Chimie**, v.6, p. 473-483, 2003.

HICKLIN, D.J.; ELLIS, L.M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. **J. Clin. Oncol.** v. 23, n. 5, 2005.

HIDA, T.; YATABE, Y.; ACHIWA, H.; MURAMATSU, H.; KOZAKI, K-I.; NAKAMURA, S.; OGAWA, M.; MITSUDOMI, T.; SUGIURA, T.; TAKAHASHI, T. Increased Expression of Cyclooxygenase 2 Occurs Frequently in Human Lung Cancers, Specifically in Adenocarcinomas **Cancer Research**, v.58, p.3761-3764, 1998.

HIRSCH, F.R.; VARELLA-GARCIA, M.; BUNN, P.A. Jr; DI MARIA, M.V.; VEVE, R.; BREMMES, R.M.; BARON, A.E.; ZENG, C.; FRANKLIN, W.A. Epidermal growth factor receptor in non-small lung cancer carcinomas. Correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. **J. Clin. Oncol.**, n.21, p.3798-3807, 2003.

HOSOMI, Y.; YOKOSE, T.; HIROSE, Y.; NAKAJIMA, R.; NAGAI, K.; NISHIWAKI, Y.; OCHIAI, A. Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesion of human adenocarcinoma of the lung cancer. **Lung Cancer**, v.30, n.2, p. 73-81, 2000.

HOFMANN, H-S.; SIMM, A.; HAMMER, A.; SILBER, R-E.; BARTLING. Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.128, p.554-560, 2002.

HSU, H. Y.; YANG, J. J.; LIN, C.C. Effect of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. **Cancer Lett.**, v.111, n.1, p.7-13, 1997.

HU, Y.P.; CHERTON-HORVAT, G.; DRAGOWSKA, V.; BAIRD, S.; KORNELUK, R.G.; DURKIN, J.P.; MAYER, L.D.; LACASSE, E.C. Antisense Oligonucleotides Targeting XIAP Induce Apoptosis and Enhance chemotherapeutic Activity against Human Lung Cancer Cells *in Vitro* and *in Vivo*. **Clin. Cancer Res.**, v.9, p. 2826-2836, 2003.

HUANG, M.; STOLINA, M.; SHARMA, S.; MAO, J.T.; ZHU, L.; MILLER, P.W.; WOLLMAN, H.; HERSCHMAN, H.; DUBINETT, S.M. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase -2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and

macrophages: up regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. **Cancer Res.**, v.58, p.362-366, 1998

HUBBARD, S.R. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v.71, p.343-358, 1999.

HSU, H.Y.; YANG, J.J. AND LIN, C.C. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. **Cancer Lett.**, v. 111, p. 713-710, 1997.

JANAKIRAM, N.B.; INDRANIE, C.; MALISETTY, S.V.; JAGAN, P.; STEELE, V.E.; RAO, C.V. Chemoprevention of Colon Carcinogenesis by Oleanolic Acid and Its Analog in Male F344 Rats and Modulation of COX-2 and Apoptosis in Human Colon HT-29 Cancer Cells. **Pharm. Res.**, v. 25, n. 9, p. 2151-2157, 2008.

IWASA, T.; OKAMOTO, I.; SUZUKI, M.; NAKAHARA, T.; YAMANAKA, K.; HATASHITA, E.; YAMADA, Y.; FUKUOKA, M.; ONO, K.; NAKAGAWA, K. RADIOSENSITIZING EFFECT of YM155, a Novel Small-Molecule Survivin Suppressant, in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. **Clin. Cancer Res.**, v.14, n.20, p. 6496-6504, 2008.

IZQUIERDO, M.A.; , SCHEFFER, G. L.; FLENS, M.J.; SHOEMAKER, R.H.; ROME, L.H.; SCHEPER, R.J. Relationship of LRP-human major vault protein *in vitro* and clinical resistance to anticancer drugs. **Cytotechnology**, v.19, n.3, p. 191-197, 1996.

JACKSON, D.M. & JOHNSON, B.E. Small-cell lung cancer. **Lancet**, v. 366, n. 9494, p.1385-1396, 2005.

JASSEM, J. The role of radiotherapy in lung cancer: Where is the evidence **Radiother. Oncol.**, v. 83, p. 203-213, 2007.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J; MICHAEL, J.T. Cancer Statistics, 2007. **CA Cancer J. Clin.**, v.57, p.43-66, 2007

JEMAL, A.; TIWARI, R. C.; MURRAY, T.; GHAFOR, A.; SAMUELS, A.; WARDS, E.; FEUER, E.J.; THUN, M.J. Cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.**, v. 54, p. 8-29, 2004.

JULIANO, R. L.; LING. V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 455, n. 1, p. 152-62, 1976.

KAPIL, A.; SHARMA, S. Effect of oleanolic acid complement in adjuvant- and carrageenan-induced inflammation in rats. **J. Pharmacol.**, v. 47, n. 7, p. 587-587, 1995.

KANG, H-K.; LEE, E.; PYO, H.; LIM, S-J. Cyclooxygenase-independent down-regulation of multidrug resistance-associated protein-1 expression by celecoxib in human lung cancer cells. **Mol Cancer Ther.**, v.4, n.9, p. 1358-1363, 2005.

KANG, I-C.; KIM, D-K; JANG, Y.; CHUNG, K-H. Suppressive Mechanism of Salmosin, a Novel Disintegrin in B16 Melanoma Cell mtastasis. **Bioch. Biophysical Res. Comm.**, v.275, p. 169–173, 2000.

KARAVASILIS, V.; MITA, A.; HUDES,G. Phase limonotherapy study ofYM155, a novel survivin suppressant, administered by 168-hour continuous infusion in previously treated hormone refractory prostate cancer (HRPC). **J Clin Oncol.**, v.25, p. 268S, 2007.

KARNA, P.; SHARP, S.M.; YATES, C.; PRAKASH, S.; ANEJA, R. EM011 activates a survivin-dependent apoptotic program in human non-small cell lung cancer cells. **Mol. Cancer**, v. 8, p.93-105, 2009.

KARST, A.M.; LI, G.BH3-only proteins in tumorigenesis and malignant melanoma. **Cell. Mol. Life Sci.** v.64, p.318 -330, 2007

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. **Exp. Cell Res.**, n. 256, p. 42-49, 2000.

KERBEL, R.S. Tumor angiogenesis. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, p. 2039–2049, 2008.

KHAJURIA, A., GUPTA, A., GARAI, S., WAKHLOO, B.P. Immunomodulatory effects of 636 two sapogenins 1 and 2 isolated from *Luffa cylindrica* in Balb/C mice. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, v.17, 1608–1612, 2007

KIM, B.M.; WON, J.; MAENG, K.A.; HAN, Y.S.; YUN, Y-S.; Hong, S.H. Nimesulide, a selective COX-2 inhibitor, acts synergistically with ionizing radiation against A549 human lung cancer cells through the activation of caspase-8 and caspase-3. **International J. Oncol.**, v.34, n. 5, p. 1467-1473, 2009

KIM, H-S; YOUM, H-R; LEE, J-S; MIN, K-W; CHUNG, J-H; PARK, C-S. Correlation between cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v.42, n. 2, p. 163-170, 2003.

KIRSCHENBAUM, A.; LIU, X.; YAO, S.; LEVINE, A.C. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. **Urology**, v.58, p.127, 2001

KHURI, F.R.; WU, H.; LEE, J.J.; BONNIE, L.K. Cyclooxygenase-2 Overexpression Is a Marker of Poor Prognosis in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.7, p. 861-867, 2001.

KREPELA, E.; DANKOVA, P.; MORAVCIKOVA, E.; KREPELOVA, A.; PROCHAZKA, J.; CERMAK, J.; SCHÜTZNER, J.; ZATLOUKAL, P.; BENKOVA, K. Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma. **Int. Journal of Oncol.**, v. 35, p.1449-1462, 2009.

KROEMER G, GALLUZZI L, BRENNER C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 99-163, 2007.

KRYSAN, K.; DALWADI, H.; SHARMA, S.; POLD, M.; DUBINETT, S. Cyclooxygenase 2-Dependent Expression of Survivin Is Critical for Apoptosis Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. **Cancer Res.**, v. 64, p. 6359–6362, 2004a.

KRYSAN, K.; MERCHANT, F.H.; ZHU, L.; DOHADWALA, M.; LUO, J.; LIN, J.; HEUZE-VOURC'H, N.; POLD, M.; SELIGSON, D.; CHIA, D.; GOODGLICK, L.; WANG, H.; STRIETER, R.; SHARMA, S; DUBINETT, S. COX-2-dependent stabilization of survivin in non-small cell lung cancer. **FASEB J**, v.18, p. 206-208, 2004b.

KRYSAN, K.; RECKAMP, K.L.; SHARMA, S.; DUBINETT. M. The Potential and Rationale for COX-2 Inhibitors in Lung Cancer. **Anti-Cancer Agents Medic. Chem.**, v.6, p. 209-220, 2006.

KRYSAN, K.; RECKAMP, K.L.; DALWADI, H.; SHARMA, S.; ROZENGURT, E.; DOHADWALA, M.; DUBINETT, M. Prostaglandin E2 Activates Mitogen-Activated Protein Kinase/Erk Pathway Signaling and Cell Proliferation in Non–Small Cell Lung Cancer Cells in an Epidermal Growth Factor Receptor–Independent Manner. **Cancer Res.**, v. 65, n.14, p. 6275-6281, 2005.

KUMAR, S.; VAUX, D. A Cinderella Caspase Takes Center Stage. **Science**, v.297, n.5585, p.1290–1291, 2002.

KUWANA, T.; NEWMAYER, D.D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. **Curr. Opin.Cell Biol.**, v.15, p. 691–699, 2003

LAGE, H. MDR1/P-glycoprotein (ABCB1) as target for RNA interference-mediated reversal of multidrug resistance. **Curr. Drug Targets**, v.7, p. 813-821, 2006.

LANDIS, S.H.; MMURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P.A. Cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.**, v.49, p.8-31, 1999.

LEE, E.; LIM, S-J. The Association of Increased Lung Resistance Protein Expression with Acquired Etoposide Resistance in Human H460 Lung Cancer Cell Lines. **Arch. Pharm. Res.**, v. 29, n. 11, p.1018-1023, 2006.

LEE, J.M.; YANAGAWA, J.; PEEBLES, K.; SHARMA, S.; MAOB, J.T.; AND DUBINETT, S.M. Inflammation in lung carcinogenesis: New targets for lung cancer chemoprevention and treatment. **Crit. Rev. Oncol/Hematol**, v. 66, p. 208–217, 2, 2008.

LEE, K-H. Current Developments in the Discovery and Design of New Drug Candidates from Plant Natural Product Leads. **Nat. Prod.**, v.67, p. 273-283, 2004.

LEE, S.M.; MIN B.S.; LEE, C.G.; KIM, K.S.; KHO, Y.H. Cytotoxic triterpenoids from fruits of *Zizyphus jujuba*. **Planta Med.**, v. 69, p.1051-1054, 2003.

LEE, Y-J.; KENG, P. STUDYNG THE EFFECT OF Actin Cytoskeletal Destabilisatin on Cell Cycle by Cofilin Overexpression. **Molecular Biotechnology**, v.31, p.1-9, 2005.

LEIST, M; JAATTELA, M. "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v.2, n. 8, p. 589-98, 2001.

LESLIE, E.M.; DEELEY, R.G. & COLE, S.P. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicol Appl. Pharmacol.**, .v.204, n.3, p. 216-237, 2005.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Biflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). **Drug. Metabolism Dispos.**, 31, p.11-15, 2003.

LI, J.; VIALLET, J.; HAURA, E.B. A small molecule pan-Bcl-2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.61, p.525-534, 2008.

LI, J.; LI, Z-N.; YU, L-C.; BAO, Q-L.; WU, J-R.; SHI, S-B.; LI, X-Q. Association of expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 with outcome of patients with locally advanced non-small cell lung cancer who received neoadjuvant chemotherapy. **Lung Cancer**, 2009.

LIN, H-I; LEEA, Y-J.; CHENA, B-F.; TSAIA, M-C.; LUA, J-L.; CHOUC, C-J; JOWA, G-M. Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. **Cancer Letters**, v.230, p. 248-259, 2005.

LICOVITCH, M.; LAVIE, Y. Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. **Drugs**, v.5, p. 349-355, 2002.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **J. Ethnopharmacology**, v.100; p.92-94, 2005

LIU, J.; WU, Q.; LU, Y.F. AND PI, J. New insights into generalized hepatoprotective effects of oleanolic acid: key roles of metallothionein and Nrf2 induction. **Biochem. Pharmacol.**, v.76, n.7, p. 922-928, 2008.

LIU, X-H.; YAO, S.; KIRSCHENBAUM, A.; LEVINE, A.C. NS398, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Induces Apoptosis and Down-Regulates bcl-2 Expression in LNCaP Cells. **Cancer Res.**, v. 58, p. 4245-4249, 1998  
LIU, Y-H.; DI, Y-M.; ZHOU, Z-W.; MO, S-L.; ZHOU, S-F. Multidrug resistance-associated proteins and implications in drug development. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v. 37, p. 115–120, 2010

LOO, G.V.; SAELENS, X.; GURP, M.V.; FARLANE, M.M.; MARTIN, S.J.; VANDENABEELE, P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. **Cell Death Differ.**, v. 9, p. 1031-1042, 2002.



LU,B.; MU, Y.; CAO, C.; ZENG, F.; SCHNEIDER, S.; TAN, J.; PRICE, J.; CHEN, J.; FREEMAN, M.; HALLAHAN, D.E. Survivin As a Therapeutic Target for Radiation Sensitization in Lung Cancer. **Cancer Res.**, v.4, p.2840–2845, 2004.

MACIVER, S.K.;HUSSEY, P.J. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. **Genome Biol.**, v.3, n.5, p.1-12, 2002.

MANO, Y.; KIKUCHI, Y.; YAMAMOTO, K.; KITA, T.; HIRATA, J.; TODE, T.; ISHII, K.; NAGATA, I. Bcl-2 as a Predictor of Chemosensitivity and Prognosis in Primary Epithelial Ovarian Cancer. **Eur. J. Cancer**, v.35, n.8, p.1214-1219, 1999.

MARTÍN, R.; CARVALHO, J.; IBEAS, E.; HERNÁNDEZ, M.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; NIETO, M. L. Acidic Triterpenes Compromise Growth and Survival of Astrocytoma Cell Lines by Regulating Reactive Oxygen Species Accumulation. **Cancer Res.**, v.67, n.8, p.3741–51, 2007.

MAO, J.T.; FISHBEIN, M.C.; ADAMS, B.; ROTH, M.D.; GOODGLICK, L.; HONG, L.; BURDICKE, M.; ROBERTM. STRIETER, R.; TASHKIN, D.P.; DUBINETT, S. Celecoxib Decreases Ki-67 Proliferative Index in Active Smokers. **Clin. Cancer Res.**, v.12, n.1, p.314-320, 2006.

MAO, J.T.; ROTH,M.D.; SERIO, K.J.; BARATELLI, F.; ZHU, L.; HOLMES, C.; STRIETER, R.M.; DUBINETT, S.M. Celecoxib Modulates the Capacity for Prostaglandin E2 and Interleukin-10 Production in Alveolar Macrophages from Active Smokers. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p. 5835-5841, 2003.

MAO, Q.; QIU, W.; WEIGL, K.E.; LANDER, P.A.; TABAS, L.B.; SHEPARD, R.L.; DANTZIG, A.H.; DEELEY, R.G.; COLE, S.P.C. GSH-dependent Photolabeling of Multidrug Resistance Protein MRP1 (ABCC1) by LY475776. **J. Biol. Chem.**, v.277, n. 32, p. 28690-28699, 2002.

MARSDEN, V.S.; O'CONNOR, L.; O'REILLY, L.A.; SILKE, J.; METCALF, D.; EKERT, P.G.; HUANG, D.C.S.; CECCONI, S.; KUIDA, K.; TOMASELLI,K.J.; ROYQ, S.; NICHOLSONQ,D.W.; VAUX, D.L.; BOUILLET, P.; ADAMS, J.M.; STRASSER, A. Apoptosis initiated by Bcl-2- regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. **Nature**, v. 419, p. 634-637, 2002.

MARTIN, B.; PAESMANS, M.; MASCAUX, C. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. **Br. J. Cancer**, v. 91:p. 2018-2025, 2004.

MICKLEY, L.A.; BATES, S.E.; RICHERT, N.D.; et al. Modulation of the expression of a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) by differentiating agents. **J. Biol. Chem.**, v.264, p.18031-18040, 1989.

MITA, A.C.; MITA, M.M.; NAWROCKI, S.T.; AND FRANCIS J. GILES. Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer therapeutics. **Clin. Cancer Res.** v.14, n.16, p. 5000-5005, 2008.

MORRIS, M.J.; TONG, W.P.; CORDON-CARDO, C; DROBNJAK, M.; KELLY, W.K.; SLOVIN, S.F.; TERRY, K.L.; SIEDLECKI, K.; SWANSON, P.; RAFI, M.; DIPAOLA, R.S.; ROSEN, N.; SCHER, H.I. Phase I Trial of BCL-2 Antisense Oligonucleotide (G3139) Administered by Continuous Intravenous Infusion in Patients with Advanced Cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, p.679-683, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, 65: 55-63, 1983.

MOYSICH, K.B.; MENEZES R.J.; SWEDE, S.R.H.; REID, M.E.; CUMMINGS, K.M.; FALKNER, K.L.; LOEWEN, G.M.; BEPLER, G. Regular aspirin use and lung risk. **BMC Cancer**, v.2, p. 1-7, 2002.

NACHMIAS, A.B.; ASHHAB, A. Y.; BEN-YEHUDA, A.D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. **Sem. Cancer Biol.**, v.14, p.231-243, 2003.

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **FASEB J.**, v. 13, p.9-22, 1999.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F. & RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, 139(2), 271-279, 1991.

NOBILI, S.; LANDINI, I.; GIGLIONI, B AND MINI, E. Pharmacological Strategies for Overcoming Multidrug Resistance. **Curr. Drug Targ.**, 7, 861-879 861, 2006.

NIU, G.; WRIGHT, K.L.; HUANG, M.; Constitutive Stat3 activity upregulates VEGF expression and tumor angiogenesis. **Oncogene**, v.21, p.2000-2008, 2002.

OKUDO, T., KOSHIMIZU, K., DAITO, H., KIN, B., NISHIMOTO, K.; YAMAZAKI, N. (1990) Health drinks containing ursolic acid and/or oleanolic acid. **Chem. Abstracts**, v.112, P54097m, 1990.

OLIE, R.A.; SIMOÕES-WUST, A.P.; BAUMANN, B.; LEECH, S.H.; FABBRO, D.; STAHEL, R.A.; ZANGEMEISTER-WITTKKE, U. A Novel Antisense Oligonucleotide Targeting Survivin Expression Induces Apoptosis and Sensitizes Lung Cancer Cells to Chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 60, p.2805–2809, 2000.

OLTERS DORF, T.; ELMORE, S.W.; SHOEMAKER, A.R.; ARMSTRONG, R.C.; AUGERI, D.J.; BELLI, B.A.; BRUNCKO, M.; DECKWERTH, T.L.; DINGES, J.; HAJDUCK, P.J.; JOSEPH, M.K.; et al., An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solids tumors. **Nature**, v.435, p. 677-681, 2005.

OLTVAI, Z.N.; MILLIMAN, C.L.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that acelerates programmed cell death. **Cell**, v.74, p.609-619, 1993.

OSVENÁ, Z.; KOZICS, K and SLAMENOVÁ, D. Protective effect of ursolic and oleanolic acid in leukemia cells. **Mutt. Res.**, v.600, n.1-2, p.131-137, 2006.

OSVENÁ, Z.; VACHALK, A.; HORVATHOVA, K. and TOTHO, D. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. **Neoplasma**, v. 51, n.5, p.456-458, 2004.

OSHIKA, Y.; NAKAMURA, M.; TOKUNAGA, T.; FUKUSHIMA, Y.; ABE, Y.; OZEKI, Y.; YAMAZAKI, H.; TAMAOKI, N.; AND UEYAMA, Y. Multidrug resistance-associated protein and mutant p53 protein expression in non-small cell lung cancer. **Mod. Pathol.**, v. 11, p. 1059-1063, 1998.

OTA, E.; ABE, Y.; OSHIKA, Y.; OZEKI, Y.; IWASAKI, M.; INOUE, H.; YAMAZAKI, H.; UEYAMA, Y.; TAKAGI, K.; OGATA, T.; ET AL. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in non-small-cell lung cancer. **Br. J. Cancer**, v.72, p.550- 554, 1995.

OZBEN, T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. **FEBS Letters**, 580, 2903–2909, 2006.

PAAVONEN, K.; PUOLAKKAINEN, P.; JUSSILA, L. Vascular endothelial growth factor receptor- 3 in lymphangiogenesis in wound healing. **Am. J Pathol.**, v. 156, p.1499-1504, 2000.

PANANI, A.D.; RUSSOS, C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. **Cancer Letters**, v. 239, p.1-9, 2006.

PATIL, C.R.; JADHAV, R.B.; SINGH, P.K.; MUNDADA, S.; PATIL, P.R. Protective Effect of Oleanolic Acid on Gentamicin Induced Nephrotoxicity in Rats. **Phytother. Res.**, v., p. 2009.

PEEBLES, K.A.; LEE, J.M.; MAO, J,T.; HAZRA, S.; RECKAMP, K.L.; KRYSAN, K.; DOHADWALA, M.; HEINRICH, E.L.; WALSER, T.C.; CUI, X.; BARATELLI, F.E.; GARON, E.; SHARMA, S.; DUBINETT, S. Inflammation and lung carcinogenesis: applying findings in prevention and treatment. **Expert. Rev. Anticancer Ther.**, v.7, n.10, p. 1405-1421, 2007.

PÉREZ-TOMÁS, R. Multidrug Resistance: Retrospect and Prospects in Anti-Cancer Drug Treatment. **Curr. Med. Chem.**, v.13, p.1859-1876, 2006.

PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I.S.; CHAGWEDERA, T.E.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; BEECHER, C.W.; FONG, H.H.; KINNGHOR, A.D.; BROWN, D.M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nature Med.**, v. 1, p.1046-1051, 1995.

POLGAR, O.; ROBEY, R.W.; SUSAN E BATES, S.E. ABCG2: structure, function and role in drug response. **Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.**, v.4, n.1, p.1-15, 2008.

PYO, H.; CHOY, H; AMORINO, G.P.; KIM,J-S.; CAO, Q.; HERCULES, S.K.; DUBOIS, R.N. A Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, NS-398, Enhances the Effect of Radiation *in vitro* and *in vivo* referentially on the Cells That Express Cyclooxygenase-2. **Clin. Cancer Res.**, v.7, p. 2998–3005, 2001

RABIK, C.A.; DOLAN, M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treatment Reviews**, v.33, p. 9-23, 2006.

RAO, C.V.; REDDY, B.S. NSAIDs and chemoprevention. **Curr. Cancer Drug Targets**, 4:29–42.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. **Phytomedicine**, v.10, n.6-7, p. 483-489, 2003.

RASPOLLINI, M.R.; AMUNNI, G.; VILLANUCCI, A.; BODDI, V.; TADDEI, G.L. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) and P-glycoprotein-170(MDR1) expression is associated with chemotherapy resistance and poor prognosis. Analysis in ovarian carcinoma patients with low and high survival. **Int. Gynecol. Cancer**, v.15, p.255-260, 2005.

RASPOLLINI, M.R.; TADDEI, G. L. Cyclooxygenase -2: A Novel Target in Human Solid Tumors. **Curr. Oncol. Reports**, v.9, p. 96-101, 2007.

RECK, M.; GETZEMEIER, U. Advanced non-small cell lung cancer therapy: historical and future perspectives. **Targ. Oncol.**, v.3, p. 135-147, 2008.

RIEDL, K.; KRYSAN, K.; POLD, M.; et al. Multifaceted roles of cyclooxygenase-2 in lung cancer. **Drug. Resist. Update**, v.7, n.3, p.169-184, 2004.

RINI, B.I.; ERIC J. Small Biology and Clinical Development of Vascular Endothelial Growth Factor–Targeted Therapy in Renal Cell Carcinoma. **J. Clin. Oncol.**, v.23, n.5, p.115-125, 2005.

ROCHA, G.G.; SIMÕES, M; LÚCIO, K.A.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M.A.C. A.; GATTASS, C.R. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioorg. Med. Chem.**, v.15, p.7355-7360, 2007.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Bases Patológica das Doenças**. Editora Elsevier, 7ª edição, Rio de Janeiro, p.747-812, 2005.

RODRIGUEZ, J.A.; AUSTUDILLO, L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rat. **Pharmacol. Res.**, v.48, n.3, p. 291-294, 2003.

ROSSI, A., MAIONE, P.; COLANTUONI, G.; GUERRIERO, C.; GRIDELLI, C. The role of new targeted therapies in small-cell lung cancer. **Critical Rev. Oncol/Hematol** v.51, p. 45–53, 2004.

ROSSI, A.O; MAIONE, P.; GRIDELLI, C. Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer. **Critical Rev. Oncol/Hematol**, v. 59, p. 139-149, 2006.

ROMAGNOLI, M.; SEVENO, C.; WUILLE`ME-TOUMI, S.; AMIOT, M.; BATAILLE, R.; MINVIELLE, S.; BARILLE`NION, S. The imbalance between Survivin and Bim mediates tumour growth and correlates with poor survival in patients with multiple myeloma. **British J. Hematol.**, v.145, p.180–189, 2009.

RUDIN, C.M.; KOSLOFF, M.; HOFFMAN,P.C.; EDELMAN, M.J.; KARNAUSKAS, R.; TOMEK, R.; SZETO, L.; VOKES, E.E. Phase I Study of G3139, a bcl-2 Antisense Ologonucleotide, Combined with carboplatin and Etoposide in patients with Smal-Cell Lung Lancer. **J. Clin. Oncol.**, v.22, n.8, p1110-1117, 2004.

RUMPOLD, H.; WOLF, A.M.; GRUENEWALD, K.; GASTL, G.; GUNSILIUS, E. & WOLF, D. RNAi-mediated knockdown of P-glycoprotein using a transposon-based vector system durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines. **Exp. Hematol.**, v.33, n.7, p.767-775, 2005.

RUSCH, V.; BASELGA, J.; CORDON-CARDO C, et al. Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary nonsmall cell lung cancers and adjacent benign lung. **Cancer Res.**, v. 53, supp.10, p. 2379–85, 1993.

SAWADA, N.; KATAOKA, K.; KONDO, K.; ARIMUCHI, H.; FUJINO, H.; TAKAHASHI, Y.; MIYOSHI, T.; KUWAHARA, T.; MONDEN, Y.; OHNISHI, Y.; Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. **Br. J. Cancer**, v.90, n.8, p.1672-1678, 2004.

SCHEPER, R.J.; BROXTERMAN, H.J.; SCHEFFER, G.L.; KAAIJK, P.; DALTON, W.S.; VAN HEIJNINGEN, T.H.; VAN KALKEN, C,K,; SLOVAK, M.L.; DE VRIES, E.G.; VAN DER VALK, P. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Cancer Res.**, v.53, n.7, p.1475-1479, 1993.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. **J. Cellular Physiol.**, v.182, p. 311-322, 2000.

SCOTT, F.L.; DENAUL, T. J. B.; RIEDL, S.J.; SHIN, H.; RENATUS, M.; SALVESEN, G.S. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. **EMBO J.**, v.24, p. 645-655, 2005.

SEQUIST, L.V. AND LYNCH, T.J. EGF tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: An evolving story. **Annu. Rev. Med.**, v .59, p.79–92, 2008.

SERRA, G.; LAMPIS, R.; POMPEI, R.; PINZA, M. Antiviral of new triterpenic derivatives. **Pharmacol.Res**, v. 29, n. 4, p. 359-366, 1994.

SHAMMA, A.; YAMAMOTO, H.; DOKI, Y.; OKAMI, J.; KONDO, M.; FUJIWARA, Y.; YANO, M.; INOUE, M.; MATSUURA, N.; SHIOZAKI, H.; MONDEN, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. **Clin. Cancer Res.**, v.6, p.1229-1238, 2000.

SHARMA, S.V.; BELL, D.W.; SETTLEMAN, J.; HABER, D.A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.7, p.169-, 2007

SHARPE, J.C.; ARNOULT, D.; YOULE, R.J. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. **Bioch. Biophys. Acta**. v. 1644, p.107– 113, 2004.

SHAROM, F.J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Farmacogenomics**, v. 9, n.1, p. 105-127, 2008.

SHENG, H.; SHAO, J.; WASHINGTON, M.K.; DUBOIS, R.N. Prostaglandin E2 Increases Growth and Motility of Colorectal Carcinoma Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n.21, p. 18075-18081, 2001

SIDANI, M.; WESSELS, D.; MOUNEIMNE, G.; GHOSH, M.; GOSWAMI, S.; SARMIENTO, C.; WANG, W.; KUHL, W.; EL-SIBAI, M.; BACKER, J.M.; EDDY, R.; SOLL, D.; CONDEELIS, J. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells **J. Cell Biol.** v. 179, n.4, p. 777–791, 2007.

SIDDIK, Z.H. Cisplatin: model of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p.72-65, 2003.

SINGHAL, S.; VACHANI, A.; ANTIN-OZERKIS, D.; KAISER, L.R.; ALBELDA, S.M. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: A review. **Clin. Cancer Res.**, v.11:3974-3986, 2005.

SIMON, G.R. AND WAGNER, H. Small cell Lung Cancer. **Chest.**, v.123, n.1, p. 259-271, 2003.

SINGH, B.; COOK, K.R.; B.S.; VINCENT, L. B.S., HALL, C.S.; BERRY, J.A.; B.S.; MULTANI, A.S.; LUCCI, A. Cyclooxygenase-2 Induces Genomic Instability, BCL2 Expression, Doxorubicin Resistance, and Altered Cancer-Initiating Cell Phenotype in MCF7 Breast Cancer Cells. **J. Surg. Res.**, v. 147, p. 240-246, 2008.

SINGH, G.B.; SINGH, S.; BANI, S.; GRUPTA, B.D.; BANERJEE, S.K. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. **J.Pharmacol.**, v.44, n.5, p. 456-458, 1992.

SMITH, C.J.; RERFETTI, T.A.; KING, J.A. et al. Perspective on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers. **Inhal. Toxicol.**, v.18, n.9, p. 667-677, 2006.

SOHN, K.H.; LEE, H.Y.; CHUNG, H.Y.; YOUNG, H.S.; YI, S.Y.; KIM, K.W. Anti-angiogenic activity of triterpene acids. **Cancer Lett.**, v.94, v.2, p.213-8, 1995.

SOROKIN, A. Cyclooxygenase-2: Potential Role in Regulation of Drug Efflux and Multidrug Resistance Phenotype. **Curr. Pharm. Desing.**, v.10, p. 647-657, 2004.

SRINIVASULA, S.M.; AHMAD, M.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; ALNEMRI, E.S. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. **Mol Cell.**, v. 1, n.7, p. 949-57, 1998.

SRINIVASULA, M.S.; ASHWELL, J.D. IAPs: What's in a Name? **Mol Cell.**, v.30, n.2, p.123-35. 2008.

STAVROVSKAYA, A.A. Cellular Mechanism of Multidrug Resistance of Tumor Cells. **Biochemistry**, v.65, n.1, p. 95-106, 2000.

STEWART DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. **Crit. Ver. Oncol. Hematol.**, v.63, p.12-31, 2007.

STRAWN LM, SHAWVER LK. Tyrosine kinases in disease: overview of kinase inhibitors as therapeutic agents and current drugs in clinical trials. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v.7, p. 553-573, 1998.

STUPP, R.; MONNERAT, C.; TURRISI III, A.T.; PERRY, M.C.; LEYVRAZ, S. Small cell lung cancer: state of the art and future perspective. **Lung Cancer**, v.45, p.105-117, 2004.



TAHIR, S. K.; YANG, X.; ANDERSON, M.G.; MORGAN-LAPPE, S.E.; SARTHY, A.V.; CHEN, J.; R WARNER, R.B.; NG, S-C.; FESIK, S.W.; ELMORE, S.W.; OSENBURG, S.H.; TSE, C. Influence of Bcl-2 Family Members on the Cellular Response of Small-Cell Lung Cancer Cell Lines to ABT-737. **Cancer Res.**, v.67, n.3, p.1176-1183, 2007.

TAMM, I.; WANG, Y.; SAUSVILLE, E.; SCUDIÈRE, D.A.; VIGNA, D.; OLTERS DORF, T.; REED, J.C. IAP-Family Protein Survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas (CD95), Bax, Caspases, and Anticancer Drugs. **Cancer Res.**, v. 58, p. 5315-5320, 1998.

TANG, X.H.; GAO, J.; FANG, F.; CHEN, J.; XU, L.Z.; ZHAO, X.N.; XU, Q. Hepatoprotection of oleanolic acid related to its inhibition on mitochondrial permeability transition. **Am. J Chim. Med.**, v.33, n. 4, p.627-637, 2005.

THATCHER, N. Integrating new targeted agents into the treatment of non-small-cell lung cancer. **Lung Cancer**, v.54, Supp.2, p. S25-S31 2006.

THIPATI, P.; HILDEMAN, D. **Apoptosis**, v.9, p.515-523, 2004.

THOMAS, H.; COLEY, H. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. **Cancer Control.**, v.10(2), p.159-165, 2003.

TORKY, A.R.W.; STEHFEST, E.; VIEHWEGER, K.; TAEGER, C. AND FOTH, H. Immuno-histochemical detection of MRPs in human lung cells in culture. **Toxicology**, 207: 437-450, 2005.

TRAVIS, W.D. Pathology in lung cancer. **Clin. Chest. Med.** , v.23, p. 65-81, 2002.

TRILLER, N.; KOROSEK, P.; KERN, I.; KOSNIK, M. AND DEBELJAK, A. Multidrug resistance in small cell lung cancer: Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naïve patients and in relapsed disease. **Lung Cancer**, 54: 235-240, 2006.

TSAI, S.J. ANDYIN, M.C. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. **J. Food Sci.**, v. 73, n.7, p. 174-178, 2008.

TSE, C.; SHOEMAKER, A.R.; ADICKES, J.; ANDERSON, M.G.; CHEN, J.; JIN, S.; JOHNSON, E.F.; MARSH, K.C.; MITTEN, M.J.; NIMMER, P.; ROBERTS, L.;

TAHIR, S.K.; XIAO, Y.; YANG, X.; ZHANG, H.; FESIK, S.; ROSENBERG, S.H.; ELMORE, S.W. ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. **Cancer Res.**, v.68, n.9, p. 3421-3428, 2008.

UEDA, K.; OKAMURA, N.; HIRAI, M.; TANIGAWARA, Y.; SAEKI, T.; KIOKA, N.; KOMANO, T. & HORI, R. Human p-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. **J Biol. Chem.**, 267(34), 24248-24252, 1992.

VAN DER DEEN, M.; VRIES, E.G.E. TIMENS, W.; SCHEPER, R.J.; TIMERBOSSCHA, H.; POSTMA, D.S. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. **Respiratory Res.**, v. 6, n.1 p.59-62, 2005.

VAN TROYS, M.; LYNN HUYCKA, M.; LEYMAN, S.; DHAESELAER, S.; VANDEKERKHOVEA, J.; AMPE, C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. **Eur. J.Cell Biol.**, v. 87, p. 649-667, 2008

VUCIC, D.; FAIRBROTHER, W. The Inhibitor of Apoptosis Proteins as Therapeutic Targets in Cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.13, n.20, p.5995-6000, 2007

WAJANT, H.; GERSPACH, J.; PFIZENMAIER, K. Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** v. 16, p. 55–76, 2005.

WANG, F.; HUA, H.; PEI, Y.; CHEN, D. AND JING, Y. Triterpenoids from the Resin of *Styrax tonkinensis* and Their Antiproliferative and Differentiation Effects in Human Leukemia HL-60 Cells. **J. Nat. Product**, v.69, p.807-810, 2006.

WANG, W.; MOUNEIMNE, C.; SIDANI, M.; WYCKOFF, J.; CHEN, I.; MAKRIS, A.; GOSWAMI, S.; BRESNICK, A.R.; CONDEELIS, J.S. The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. **The J. Cell Biol.**, v. 173, n. 3, p. 395-404, 2006

YANG, C-J.; WANG, C-S.; HUNG, J-Y.; HUANG, H-W.; CHIA, Y-C.; WANG, P-H.; WENG, C-F.; HUANG, M-S. Pyrogallol induces G2-M arrest in human lung cancer cells and inhibits tumor growth in an animal model. **Lung Cancer**, 2009

YEH, J.J.; HSU, N.Y.; HSU, W.H.; TSAI, C.H.; LIN, C. C.; LIANG, J. A. Comparison of Chemotherapy Response with P-Glycoprotein, Multidrug Resistance-Related Protein-1, and Lung Resistance-Related Protein Expression in Untreated Small Cell Lung Cancer. **Lung**, v.183, p.177–183, 2005

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer Metastasis Rev.**, v.28, p.15–33, 2009

YIP-SCHNEIDER, M.T.; BARNARD, D.S.; BILLINGS, S.D.; CHENG, L.; HEILMAN, D.K.; LIN, A.; MARSHALL, S.J.; CROWELL, P.L.; MARSHALL, M.S.; SWEENEY, C.J. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. **Carcinogenesis**, v.21, p. 139-146, 2000.

YOUNG, L.C.; CAMPLING, B.G.; COLE, S.P.C.; DEELEY, R.; GERLACH, H. Multidrug Resistance Proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in Lung Cancer: Correlation of Protein Levels with Drug Response and Messenger RNA Levels. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 1798–1804, 2001.

YOUNG, L.C.; CAMPLING, B.G.; VOSKOGLOU-NOMIKOS, T.; COLE, S.P.C.; DEELEY, R.G.; GERLACH, J.H. Expression of Multidrug Resistance Protein-related Genes in Lung Cancer: Correlation with Drug Response. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, P. 673-680, 1999.

YOSHIMATSU, K.; ALTORKI, N.K.; GOLIJANIN, D.; ZHANG, F.; JAKOBSSON, P.-J.; ANDREW J. DANNENBERG, A.J.; SUBBARAMAIAH, K. Inducible prostaglandin H Synthase Is Overexpressed in Non-Small Cell Lung Cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 2669–2674, 2001.

YU, H. And JOVE, R. The STATs of cancer: new molecular targets come of age. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p.97–105, 2004.

ZHANG, P.; LI, H.; CHEN, D.; NI, J.; Yuming KANG, Y. AND WANG, S. Oleanolic Acid Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells through Caspase Activation and Poly(ADP-ribose) Polymerase Cleavage. **Acta Biochim. Biophys.Sinica**, v.39, n.10, p. 803–809, 2007.

ZHU, Y.M.; AZAHRI, N.S.M.; YU, D.C.W.; PENELLA J WOLL, P.J. Effects of COX-2 inhibition on expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in lung cancer cells. **BMC Cancer**, v. 8, p.218-228, 2008.

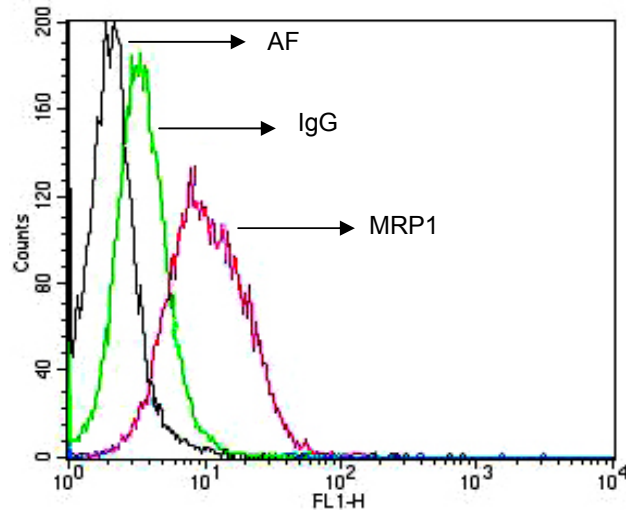
ZHU, Y.M.; SHEN, J-K.; WANG, H-K.; COSENTINO, L.M. synthesis and Anti-HIV Activity of oleanolic acid Derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, v.11, p. 3115-3118, 2001.

ZÖRNIG, M.; HUEBER. A.; BAUM, W.; EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochem. Biophys Acta (BBA)**, v.1551, p. F1-F37, 2001.

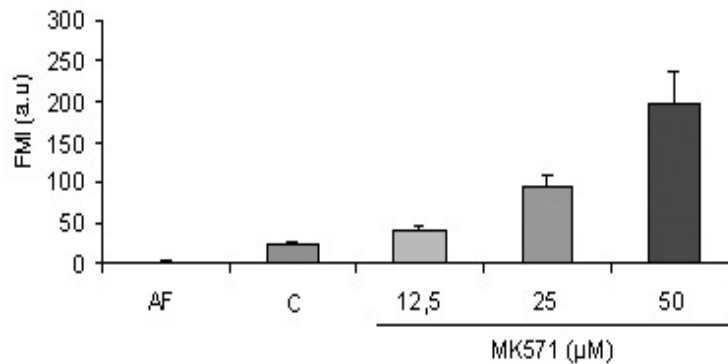
Sites:

World Health Organization, 2010: <http://www.who.int/cancer/en/>

## 8. ANEXOS



**Anexo 1:** Expressão de MRP1/ABCC1 na linhagem B16F10. As células foram plaqueadas ( $5 \times 10^4$  células /  $450 \mu\text{l}$ ) por 48h e incubadas na presença do anticorpo primário (anti-MRP1/ Alexis Biochem. US- diluição 1:20) seguido do anticorpo secundário IgG anti-rato conjugada a FITC, SIGMA - diluição 1:1000. A fluorescência intracelular média foi medida por citometria de fluxo (20.000 eventos; canal FL-1).



**Anexo 2:** Efeito do bloqueador MK71 sobre a atividade da MRP1/ABCC1. A linhagem celular B16F10 foi incubada por 30 minutos na presença meio (AF), 5-CFDA (C) e na presença de diferentes concentrações de MK571. A fluorescência média intracelular referente à quantidade CF (carboxifluoreceína) acumulada após o carregamento foi medida por citometria de fluxo (FL-1/20.000 eventos).

## Anexo 3

### **Oleanolic acid induced death of NSCLC cell lines expressing resistance proteins and inhibited development of metastasis *in vivo***

Kelly Araújo Lúcio<sup>1</sup>, Gleice da Graça Rocha<sup>1</sup>, Leonardo Campos Monção-Ribeiro<sup>2</sup>, Janaina Fernandes<sup>1</sup>, Christina Maeda Takiya<sup>2</sup> and Cerli Rocha Gattass<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho and

<sup>2</sup>Laboratório de Patologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, 21949-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Correspondence to:* Dr. Cerli Rocha Gattass, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Imunologia Celular, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco G, Cidade Universitária, CEP 21949-900, Rio de Janeiro, R.J, Brazil. Tel.: 55(21) 2562-6564 and Fax: 55 (21) 2280-8193 and E-mail: [cerli@chagas.biof.ufrj.br](mailto:cerli@chagas.biof.ufrj.br)

*Key words:* Lung cancer; NSCLC; Oleanolic acid; multidrug resistance; metastasis.

## **Abstract**

Chemotherapy is the main modality treatment for lung cancer, one of the most lethal types of cancer. However non-small cell lung cancer (NSCLC) is generally not chemosensitive. Impairing of the chemotherapeutic response in lung tumors has been related to multidrug resistance phenotype, which can be achieved by several intrinsic and acquired mechanisms. We investigated the anti-tumoral activity of oleanolic acid (OA) on A549 and H460, NSCLC cell lines that present intrinsic expression of MDR proteins and defects in the apoptotic pathway. We showed that these cell lines display high levels of MRP1/ABCC1 activity. The results presented in this paper demonstrated that OA decreased the viability and induced caspase-dependent apoptosis of A549 and H460 in a dose-dependent way, independently of the high MRP1/ACBC1 activity present in these cells. Treatment with OA also increased the expression of Bax, altering the balance Bcl-2/Bax and decreased the expression of survivin. Moreover, in addition to killing cells expressing MDR proteins, OA inhibited the expression of VEGF, an important growth factor for tumor angiogenesis, and the development of metastasis, considered a marker of tumor evolution and relapse. Together, these data suggest that OA may be a good candidate for the treatment of tumors with intrinsic expression of MDR mechanisms, such as lung tumors and that its inclusion in the NSCLC regimens may possibly help decreasing relapse and the development of metastasis.

## 1. Introduction

Lung cancer is the most frequent cause of cancer-related death worldwide <sup>1</sup>. Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents over 80% of all diagnosed lung cancers. Although the most effective treatment for NSCLC is surgical resection, the high mortality of this disease is attributable to difficulties in early detection. Most of the patients have at the time of diagnosis an unresectable advanced disease with lymph-node or visceral metastasis or both. Platinum-based chemotherapy, one of the main treatments used for NSCLC in the last decades, in addition to being very toxic only led to a modest improvement of overall survival <sup>2</sup>. Even after the development of drugs directed to targets important for tumor growth and development, such as epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial factor (VEGF) the overall survival rate of NSCLC remained low <sup>3</sup>. Moreover, the chemotherapeutic failure in lung cancer may contribute to the development of metastasis and the high morbidity of this type of cancer, indicating that more effective therapies are needed.

Multidrug resistance (MDR) plays a critical role in lung cancer chemotherapy failure. Although MDR could be mediated by several mechanisms, great attention has been dedicated to the overexpression of transporter proteins of the ABC family and to alterations of factors involved in the apoptotic process. Expression of MDR proteins is considered the main cause of patients relapse after treatment and a relationship between the expression of these proteins and poor outcome of NSCLC patients to chemotherapy has been described <sup>4,5</sup>. MDR proteins such as P-glycoprotein (or ABCB1) and the multidrug resistance associated protein 1 (MRP1 or ABCC1), work as cellular efflux pumps capable of efficiently removing significant amounts of a wide variety of drugs from the cell, decreasing their intracellular concentration and preventing cell death <sup>6</sup>. Several evidences indicated that alteration in the expression



of proteins involved in the control of the apoptotic pathways such as, members of the Bcl-2 and of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) families, are also important resistance factors in NSCLC <sup>7,8</sup>. The ability of members of the Bcl-2 family of proteins to modulate mitochondrial membrane permeability (MMP), an important pathway of apoptosis, is well known <sup>9</sup>. It has been proposed that a balance between their pro- (Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, etc.) and anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1, Mcl-1) members may decide the fate of the cell <sup>10</sup>. In addition, by inhibiting the activation of caspases, expression of IAPs such as survivin, also contributed to resistance to apoptosis and therefore, to chemotherapy failure <sup>11</sup>.

Another hallmark of malignant cancer cells is their ability to establish metastasis. Tumour progression towards metastasis is a multistage process in which malignant cells spread from the primary tumor to colonize distant organs <sup>12</sup>. As metastatic disease and not local tumor growth determines the mortality of patients, targeting tumor metastasis has the highest priority in cancer therapy. A substantial body of evidence has emerged, suggesting that the vascular endothelial growth factor (VEGF)-Flk-1/KDR system is the dominant signal transduction pathway in regulating tumor angiogenesis and metastasis <sup>13</sup>. However, as the main requirement for metastasis development is the presence of live tumor cells, mechanisms involved in drug resistance such as expression of MDR proteins and anti-apoptotic factors have been proposed as favorable conditions to metastasis development <sup>14, 15</sup>.

Many compounds of natural origin are capable of modulating drug resistance. Oleanolic acid (OA), a pentacyclic triterpenoid found in a variety of plant species widespread all over the world presents several biologic properties including anti-inflammatory <sup>16, 17</sup>, hepato- and nephrotoxicity protection <sup>18,19</sup>, recovery of the hematopoietic system after irradiation <sup>20</sup> and cytotoxicity against several cancer cell

lines<sup>21, 22, 23</sup>. In a previous study we showed that this triterpene is also effective to a multidrug resistant erythroleukemic cell overexpressing Pgp and its sensitive counterpart<sup>24</sup>. The present study was performed to examine the cytotoxic effects of AO on NSCLC cells (A549 and H460) that expressed MRP1<sup>25, 26</sup> and to investigate the effects of this triterpene on pathways involved in apoptosis resistance and development of metastasis. OA induced apoptosis of both cell lines.

Treatment with this triterpene slightly modulated MRP1 activity, decreased the expression of survivin and increased the expression of Bax without affecting Bcl-2. Moreover, OA also decreased the expression of VEGF and inhibited the development of melanoma-induced lung metastasis. Together these data suggest that OA may be good candidate for the treatment of tumors with intrinsic expression of resistance mechanisms such as lung tumors.

## **2. Material and Methods**

### *2.1 Cells and Culture Conditions*

The human lung cancer lines A549 and H460 and the murine melanoma line B16F10 were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco, NY, USA), 100 U penicillin and 100 µg/ml streptomycin in disposable plastic bottles at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every 3 days. Cells were sub-cultured using Trypsin-EDTA every 3-4 days.

### *2.2. Viability inhibition assay*

Oleanolic acid cytotoxicity was assessed by the MTT assay. Briefly, 180 µl of cell suspension (10<sup>4</sup> /cells per well) was distributed in 96-well plates and pre-incubated for 24 h at 37°C/5% CO<sub>2</sub> to allow stabilization of the culture. OA was dissolved in DMSO and diluted in medium for use. Cells were exposed to 20 µl of medium, different concentrations of OA (10, 25, 40 or 50µg/mL) or of DMSO (at the same concentration carried by the compounds, control). After 48 h incubation the culture was treated with 20 µl MTT (5 mg/ml) and kept for 4 h at 37°C before being centrifuged and the supernatant discarded. The formazan produced by reduction of MTT by viable cell was dissolved in DMSO and the optical density was measured in an ELISA reader (BenchMark, Bio-Rad, CA) at 570 nm (reference filter 630 nm). Results are expressed as mean ± SD of at least three different experiments performed in triplicate.

### *2.3. DNA fragmentation assay*

Apoptosis was assessed by cell cycle analysis using flow cytometry. After 24h resting, plated cells ( $2 \times 10^4$ /well) were treated with media or different concentrations of OA (10, 25, and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and incubated for another 48h. After this time, cells were harvested, resuspended in a hypotonic fluorescent solution (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  propidium iodide (PI) and 0.1% Triton X-100 in 0.1% Na Citrate buffer) for 1h, at 4°C in the dark and the DNA content was measured by flow cytometry (FL-2) (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA). Subdiploid populations were considered apoptotic. Data acquisition and analysis were controlled by Cellquest software version 3.1f. Results are presented as mean  $\pm$  SD percentage of subdiploid cells of at least three different experiments performed in triplicate.

### *2.4. Caspase activation assay*

Caspase-3 activation was assayed using a commercial kit, according to the instructions of the manufacturer (Biovision, Mountain View, CA). In brief, cells plated as described above were incubated for 48h with medium (control) or different concentrations of OA (10, 25 or 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) before being harvested, centrifuged, and suspended in caspase-3 assay solution. This solution contains a potent caspase inhibitor conjugated to FITC that is cell permeable, non-toxic and, irreversibly binds to activated caspase. After 1 h of incubation (37°C, 5% of  $\text{CO}_2$ ), cells were washed twice with washing buffer and the percentage of caspase-3 activated cells was analyzed by flow cytometry (FL-1). Results are presented as histograms representative of three different experiments.

### *2.5. Activity and expression of MDR proteins*

Rhodamine 123 (Rho123, SIGMA, USA) and 5-carboxyfluorescein diacetate (CFDA, CalBiochem, USA), a non-fluorescent molecule that is converted into the fluorescent carboxy-fluorescein (CF) by intracellular esterases, were used to measure the activity of Pgp/ABCB1 and MRP1/ABCC1, respectively<sup>27, 28</sup>. For each experiment, the cells ( $1 \times 10^5$ /well) were seeded in 24 well plates and pre-incubated for 24 h at 37°C/5% CO<sub>2</sub> to allow stabilization of the culture. Cells were incubated for 30 min with 400 nM Rho123 or 5 µM CFDA in the presence of medium, inhibitors of Pgp (25µM Verapamil) or MRP1 (50 µM MK-571) or the desired concentrations of OA. Then the cells were washed in PBS, harvested and kept on ice until flow cytometry analysis (FACSCalibur, Beckton-Dickinson cytometer). Results are presented as representative histograms or as mean ± SD of arbitrary units of mean fluorescence intensity (MIF).

Evaluation of MRP1 expression was performed by flow cytometry. Plated cells treated for 48 h with media or 50 µg/mL OA were harvested, permeabilized with FACS lysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and incubated with PE-labelled anti-MRP1 (QCRL-2, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) for 30 minutes at 4 °C. After two PBS washings cells were resuspended in FACS solution and the fluorescence evaluated. Results are presented as representative histograms.

### *2.6. Immunofluorescence assay of proteins and semi-quantitative analysis*

A459 cells ( $3 \times 10^4$ /well) were seeded on cover slips in 24 well plates, left rest for 24 h and then treated with medium or 50 µg/mL OA. After 24 h incubation cells were washed twice with phosphate saline buffer (PBS), pH 7.4, and fixed with a 4% buffered paraformaldehyde solution containing 4% sucrose for 40 minutes at 4°C.

After 3 washes in PBS, cover slips were incubated for 30 minutes in a 50mM NH<sub>4</sub>Cl solution, pH 8.0, washed again in PBS (3X) and unspecific binding of immunoglobulins with cells were blocked with a PBS solution containing 5% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100, 0.05% Tween 20, 0,01% gelatin, for 60 min, followed by inhibition of endogenous biotin using the biotin blocking kit (cat. number SP-2002 from Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), according to the manufacturer instructions. After this, cells were incubated with 5.0 µg/mL polyclonal rabbit anti-Ki67 antibody (Abcam, Cambridge, MA, USA), 1:50 dilution of a monoclonal mouse anti-Bcl-2 antibody (DAKO, Carpinteria, CA, USA), 2 µg/mL polyclonal rabbit anti-Bax antibody, mouse monoclonal anti-VEGF antibody, mouse monoclonal anti-MMP-2 antibody or goat polyclonal IgG against MMP-9 (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) all diluted in PBS containing 3% BSA, 0.05% Tween and maintained overnight in a humid chamber, at 4°C. Next, cells were washed in PBS containing 0.25% Tween 20 and incubated for 1 h with 10 µg/mL biotinylated anti-goat IgG, anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or 10 µg/mL anti-mouse IgG (Sigma, St. Louis, MO, USA). After this time, coverslips were washed (3 times) with PBS/ 0.25% Tween, and incubated for 1h, at room temperature, with 10 µg/mL streptavidin conjugated to Cy3 (Sigma), washed and stained with 0.5 µg/mL 4',6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI) (Santa Cruz) for 5 min. Following 2 more washes with PBS and in distilled water, cover slips were mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) and observed by epi-fluorescence microscopy (Eclipse E-800, Nikon, Japan).

The quantitative analysis was performed using an image analysis system (Image-Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA) composed of a digital camera (Evolution, Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA) coupled to a

fluorescence microscope. High quality images of cells were captured (2048 X 1536 pixels buffer), using the 40x objective lens. Results were expressed as the percent of reactive cells in a total of 100 cells  $\pm$  SD.

### *2.7. Development of lung metastasis induced by B16F10 melanoma cells*

On day 0, male C57BL/6 mice (10 to 12-week-old) were injected into the tail veins with B16F10 melanoma cells ( $1 \times 10^6$  cells/animal). Tumour-bearing mice were divided into groups of five and treated with 20  $\mu$ L of saline, OA ( $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) or OA ( $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ). The dose of triterpene for the treatment of mice was decided by referring to a previous report<sup>29</sup>. Body weights of mice were recorded every 4 days to determine whether the treatment influenced health status. The mice were killed by cervical dislocation under anaesthesia with CO<sub>2</sub> 18 days after inoculation of tumour cells. The lungs were removed, and two independent observers determined the numbers of lung metastatic nodules. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of the number of metastasis.

### *2.8. Statistical analysis*

Data are presented as average  $\pm$  SD. Student's t-test was performed using InStat software. Differences between groups were tested using SigmaStat 3.1 statistical software package (Jandel Corporation, San Raphael, CA, USA) using one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal–Wallis, followed by Tukey's test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. A549 and H460 cell lines express active MRP1 pump

The presence of different but significant levels of MDR transporter proteins in A549 and H460 has been reported <sup>25, 26</sup>. To investigate the presence of active pumps in these lines, cells were incubated with substrates for Pgp (Rho123) or MRP1 (CFDA) in the presence or absence inhibitors of these proteins and the intracellular fluorescence, representative of the substrate accumulation, was measured. The lack of alteration in fluorescence observed in the presence of verapamil, a specific Pgp inhibitor <sup>30</sup> and the high increase in fluorescence obtained when A549 and H460 were treated with MK571, a specific MRP1 inhibitor <sup>3</sup> indicated that these lines have very low or no Pgp activity but display a strong MRP1 activity (**Figure 1**).

#### 3.2. Oleanolic acid inhibited viability and induced caspase-dependent DNA fragmentation of NSCLC

To evaluate the cytotoxic effect of AO on A549 and H460, cells were treated with different concentrations of the triterpene and 48 h later viability was measured by MTT assay. Figure 2 showed that OA decreased the viability of the cell lines in a dose-dependent way. Microscopic observation suggested that this effect was due to apoptosis. To further explore this observation, treated cells were incubated with a hypotonic solution containing ethidium bromide and cell cycle analysis was performed by flow cytometry. Subdiploid populations were considered apoptotic. As can be seen in Figure 3 in both cell lines the percentage of DNA fragmented cells increased with OA concentration. The apoptotic nature of AO cytotoxicity was reinforced by data presented in Figure 4 were, using a commercial kit to detect



activated caspase-3 it was showed that treatment with the triterpene also induced caspase activity.

### *3.3 Effects of oleanolic acid on MDR activity and expression*

In order to evaluate if the cytotoxic effect of OA on A549 and H460 was mediated by modulation on the MDR pump, we analyzed its effect on MRP1 activity and expression. For this, cells were incubated for 30 min with CFDA in presence of different OA concentrations (6.25, 12.5, 25 or 50µg/mL) and the accumulation of CF (cell fluorescence) was measured. As shown in **Figure 5** treatment with OA did not alter the accumulation of CF by A549. However, a small but significant increase in fluorescence was observed in H460 suggesting that OA may be able to modulate MRP1 activity. Moreover, as an incubation time of 30 min, is too short to allow detection of alteration in protein expression, it was also possible that OA could be altering the expression of MRP1. This possibility was analyzed by FACS in A549 cells incubated with medium or OA for 48 hours and then treated with anti-MRP1-PE. As shown in **Figure 6**, no alteration of MRP1 expression was observed.

### *3.4. Oleanolic acid inhibits the expression of proteins involved in apoptosis resistance and induction of angiogenesis on A549 cell line.*

To investigate if the cytotoxic activity of OA could be due to modulation of pathways involved in apoptosis resistance, A549 cells were treated for 24h with 50ug/mL of this triterpene and flow cytometry and immunocytochemical techniques were used to analyze the expression of Bcl-2, Bax and survivin. Using the same antibody the amount of Bcl-2 was not modulated ( $p>0.05$ ) by treatment with AO as shown by FACS (**Figure 7**) or by immunocytochemistry (**Figure 8A and B**). On the other hand,

treatment with OA induced a significantly ( $p < 0.05$ ) increase in Bax and decrease in survivin protein expression (**Figures 8 C-F**). These results suggested that treatment with OA favors apoptosis and that this process may probably contribute to inhibition of metastasis development. To further explore this possibility, the effect of OA on the expression Ki-67<sup>32</sup> and VEGF<sup>13</sup>, proteins involved in cell proliferation and angiogenesis, were also evaluated by immunocytochemistry. Indeed, data presented in **figures 8 (G and H) and 9 (A-D)** showed that treatment with OA lead to a reduction of VEGF and KI-67 positive cell. Altogether (**Figure 10**), these data reinforces a possible inhibitory effect of OA on metastasis development.

### *3.5. Oleanolic acid inhibits the development of menalona-induced lung metastasis*

Considering the data presented above the effects of AO on the development of metastasis *in vivo* was investigated. For this, lung metastases were induced by i.v. inoculation of B16F10 melanoma cells as previously described<sup>29</sup>. Similar to A549 and H460, these cells also display an active MRP1 pump (results not shown). Three days after tumor inoculation groups of mice were treated intra-nasally for 2 weeks with 10 doses of PBS (control) or different concentrations of OA (5 or 10 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>). Mice were sacrificed at day 17 and the number of metastasis counted (**Figure 10 A**). Treatment with OA inhibited the development of metastases in about 97 % at the higher concentration ( $p < 0.05$ ) shown in **figure 10B**.

#### 4. Discussion

In the last 30 years, the overall survival of patients with NSCLC remained low despite the development of new platinum derived compounds and agents directed to tumor targets, used alone or in combination. The presence of intrinsic or acquired resistance to chemotherapeutic agents is a major obstacle to the effective treatment of NSCLC. Indeed, the observation that about 50% of the patients that initially respond to treatment die because of spread of tumor to distant organs has been attributed to the development of MDR. Data presented here demonstrated that, in addition to being active against NSCLC lines that expressed intrinsic MRP1/ABCC1 activity OA modulated factors involved in apoptosis resistance and inhibited the development of melanoma-induced lung metastasis.

The impairing of the chemotherapeutic response in NSCLC has been directly related to the multidrug resistance (MDR) phenotype which can be achieved by several intrinsic and acquired mechanisms. As multidrug resistance (MDR) proteins are found in normal lung epithelium, tumors derived from this tissue showed raised levels of these proteins innately or following chemotherapy or radiotherapy<sup>33, 34</sup> and are often insensitive to cytotoxic agents. Data presented in this paper demonstrated that OA is cytotoxic and induced apoptosis of two NSCLC cells that constitutively expressed MRP1<sup>25, 26</sup>. Oleanolic acid-mediated cell death is due to apoptosis, as evidenced by its capacity to induce fragmentation of DNA and activation of caspase 3 (**Figures 3 and 4**). Previous data from our group<sup>35</sup> indicated that OA may modulate MRP1/ABCC1 activity. However, while results obtained with H460 suggested a modulatory effect of OA on MRP1 no modulation was seen in A549 (**Figure 5**). This difference is probably due to the presence of other members of the ABCC1 family of

transporters in this cell line. In fact, A549 was shown to express MRP1-5<sup>25</sup> and the transport properties of MRP3 and its involvement in resistance of lung cancer have been proposed<sup>36</sup>. It is important to note that despite its slight modulatory effect on MRP1/ABCC1 activity, differently from other chemotherapeutic drugs<sup>37, 38</sup>, OA did not induce increase in the expression of MRP1 (**Figure 6**), indicating that its use will not result in development of additional resistance. In addition it is also known that MRP1, a very promiscuous ATP-dependent pump capable of transporting several physiological and non-physiological substrates including anticancer drugs<sup>6</sup>. Results showing that OA kill cells that display high MRP1/ABCC1 activity (**Figure 4**) suggested that this triterpene is not a substrate for by this protein. As recently theorized by our group, the capacity of OA to bypass MRP1 may be due to its physical-chemical properties, as compounds with low polar surface area such as OA are not transported by MRP1<sup>39</sup>.

Alterations of pathways leading to apoptosis, such as mechanisms that attenuate pro-apoptotic and/or amplify anti-apoptotic pathways are important factors in the development of chemotherapeutic resistance in tumors<sup>7, 40</sup>. Several studies showed that inhibition of proteins of the Bcl-2<sup>41, 42</sup> or IAPs families<sup>43, 44</sup> sensitizes cells to chemotherapy favoring apoptosis. In NSCLC, drug resistance has been associated with altered expression of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family<sup>45</sup> and of the IAPs<sup>11</sup>. Treatment with OA increased the expression of Bax without altering Bcl-2 (**Figures 7 and 8 A-D**), leading to a pro-apoptotic balance of these proteins in the cell. It also reduced the expression of survivin (**Figure 8 E and F**), a structurally unique member of the IAP family that plays a central role in cell division and acts as a suppressor of apoptosis. These data suggested that AO-induced apoptosis of

NSCLC may be due to a downmodulatory effect on the anti-apoptotic factors present in the cell.

Increasing evidence suggests that lung cancer use multiple and perhaps redundant pathways to maintain tumor survival and development. The results presented showed that the ability of AO to control tumor growth by is probably due to its capacity to interfere with different resistance pathways present in the cell. Thus, AO not only contributed to cell death by downmodulating anti-apoptotic factors but it inhibited tumor cell proliferation (Ki67) and metastatic factor (VEGF). As disseminated tumor cells have been found in a dormant state for a prolonged periods of time <sup>46</sup>, targeting these cells and preventing their outgrowth could be a promising approach to interfere with metastasis.

Metastasis, represents the biggest problem to cancer treatment. Most deaths from cancer are due to metastatic disease, and prevention of later arising metastasis has moved to the centre of clinical attention. Even though the molecular processes underlying metastasis, emerged as novel targets for therapeutic intervention as an end-stage malignant disease, metastatic relapse following systemic treatments is often associated with resistance that might be due to cell intrinsic mechanisms such as genetic alterations leading to expression of MDR proteins or anti-apoptotic factors <sup>20, 47</sup>. Treatment with AO no only bypasses these mechanisms but significantly reduced the development of pulmonary metastasis induced by inoculation of mice with B16F10, a cell lineage that presented high MRP1 activity (data not shown) and other resistance mechanisms <sup>48</sup>. Inhibition of metastasis development was also observed with betulinic acid, another triterpene <sup>29</sup>.

The mechanism by which OA interefered with different pathways to circumvent resistance in NSCLC is still under investigation. It has been proposed that the high

expression of COX-2 in lung tumors is involved in their resistance to apoptosis and development of metastasis <sup>11, 49</sup>. Data showing that OA have anti-inflammatory properties <sup>16, 17</sup> and inhibited COX-2 activity <sup>50</sup> suggested that its effect may be mediated through inhibition of COX-dependent pathways.

Advanced lung cancer is a multifactorial disease that demands treatments targeting multiple cellular pathways. Drug resistance is a severe limitation of chemotherapy of various malignancies. Thus the search for new drugs able to overcome resistance mechanisms and to prevent the development of metastasis favored by this resistance is of great interest for lung cancer therapy. The results presented in this paper showing that in addition to killing cells expressing different drug resistance mechanisms AO also inhibited the development of pulmonary metastasis in animal models indicated the potential of this compound as chemotherapeutic or as co-adjuvant for the treatment of resistant tumors such as lung tumors.

## 5. References

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E et al., Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2007; **57**: 43-66.
- 2 Gao G, Jiang J, Liang X et al. A meta-analysis of platinum plus gencitabine or vinorelbine in the treatment on advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 2009; **65**: 339-344.
- 3 Reck M & Gatzemeir U. Advanced non-small cell lung cancer therapy: historical and future perspectives. *Targ Oncol* 2008; **3**: 135-147.
- 4 Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T et al. Multidrug resistance-associated protein and mutant p53 protein expression in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol* 1998; **11**:1059-1063.
- 5 Li XQ, Li J, Shi SB, Chen P, Yu LC, Bao QL. Expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 as prognostic factors in non-small cell lung cancer patients receiving postoperative cisplatin-based chemotherapy. *Int J Biol Markers* 2009; **24**:230-7
- 6 Sharon FJ. ABC Multidrug transportes: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008; **9**: 106-127.
- 7 Haura EB, Cress WD, Chellappan S, Zheng Z, Bepler G. Antiapoptotic signaling pathways in non-small-cell lung cancer: biology and therapeutic strategies. *Cli. Lung Cancer* 2004; **6**: 113–122.
- 8 Krepella E, Dankova P, Moravcikova E et al. Increased expression of inhibitor of apoptosis protien survivin and XIAP in non-small cell lung carcinoma. *Int J Oncol* 2009; **35**:1449-1462.
- 9 Nguyen DM & Hussain M. The role of the mitochondria in mediating cytotoxicity of anti-cancer therapies. *J Bioenerg Biomembr* 2007; **39**: 13-21.

- 10 Cory S & Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:647-656.
11. Krysan K, Dalwadi H, Sharma S, Pöld M, and Steven Dubinett S. Cyclooxygenase 2-Dependent Expression of Survivin Is Critical for Apoptosis Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 2004; **64**: 6359–6362.
- 12 Geiger GR & Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1796**: 293–308
- 13 Folkman J: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; **29**: 15-18.
- 14 Berger W, Setinek U, Hollaus P et al. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; **131**: 355–363.
- 15 Cheng Y-J, Hang-Shiang Jiang H-S, Hsu S-L, Lin L-C, WuC-L, Ghanta VK, HsuehC-M. XIAP-mediated protection of H460 lung cancer cells against cisplatin. *Eur J Pharmacol* 2010; **627**: 75–84
- 16 Singh GB, Singh S, Bani S, Gupta BD, Banerjee SK. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 1992; **44**: 456-458.
- 17 Giner-Larza EM, Manez S, Recio MC, Giner RM, Prieto JM, Cerda-Nicolas M, Rios JL. Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from Pistacia, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *Eur J Pharmacol* 2001; **428**:137-43.
- 18 Abdel-Zaher AO, Abdel-Rahman MM, Hafez MM, Faten M. Omran FM. Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicol* 2007; **234**: 124–134



- 19 Patil CR, Jadhav RB, Singh PK, Mundada S, Patil PR. Protective effect of oleanolic acid on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Phytother Res* 2010; **24**: 154-159
- 20 Hsu,-H-Y; Yang,-J-J; Lin,-C-C. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett* 1997 ; **111**(1-2): 7-13
- 21 Kim Y K, Yoon S K and Ryu S Y. Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*. *Planta Med* 2000; **66**: 485-486.
- 22 Li J, Guo WJ, Yang QY. Effects of ursolic and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT 15. *World J Gastroenterol* 2002, **8**: 493-495.
- 23 Zhang P, Li H, Chen D, Ni J, Kang Y, and Wang S. Oleanolic Acid Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells through Caspase Activation and Poly(ADP-ribose) Polymerase Cleavage. *Acta Biochim Biophys Sin* 2007, **39**: 803–809.
- 24 Fernandes J, Castilho RO, da Costa MR, Wagner-Souza K, Coelho Kaplan MA, Gattass CR. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Lett* 2003; **190**: 165-169.
- 25 Torkey AR W, Stehfest E, Viehweger K, Taege C, Foth H. Immuno-histochemical detection of MRPs in human lung cells in culture. *Toxicology* 2005; **207**: 437–450.
- 26 Pešić M, Andjelković T, Banković J, Marković ID, Rakić L, Ruždijić S. Sulfinosine enhances doxorubicin efficacy through synergism and by reversing multidrug resistance in the human non-small cell lung carcinoma cell line (NCI-H460/R). *Invest New Drugs* Published online: 21 May 2008, Doi:10.1007/s10637-008-9140-5.

- 27 Neyfakh AA. Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exp Cell Res* 1988; **174**: 168-176.
- 28 Lauzepe B, Amiot L, Courtois A et al. Use of the anionic dye carboxy-2',7'-dichlorofluorescein for sensitive flow cytometric detection of multidrug resistance-associated protein activity. *Int J Oncol* 1999; **15**: 571-576.
- 29 Sawada N, Kataoka K, Kondo K et al. Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. *Br J Cancer* 2004; **90**: 1672 – 1678.
- 30 Mickley LA, Bates SE, Richert ND et al. Modulation of the expression of a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) by differentiating agents. *J Biol Chem* 1989; **264**: 18031-18040.
- 31 Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J. The Leukotriene LTD(4) Receptor Antagonist MK571 Specifically Modulates MRP Associated Multidrug-Resistance. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; **208**: 345-352.
- 32 Martin B, Paesmans M, Mascaux C, et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2004; **91**:2018-2025.
- 33 Giaccone G, van Ark-Otte J, Rubio GJ et al. MRP is frequently expressed in human lung-cancer cell lines, in non-small-cell lung cancer and in normal lungs. *Int J Cancer* 1996; **66**: 760-767.
- 34 Young LC, Campling BG, Voskoglou-Nomikos T, Cole SPC, Deeley RG, Gerlach JH. Expression of Multidrug Resistance Protein-related Genes in Lung Cancer: Correlation with Drug Response. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 673–680.
- 35 Braga F, Ayres-Saraiva D, Gattass CR, Capella MA. Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1

- (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. *Cancer Lett* 2007; **248**: 147–152.
- 36 Young LC, Campling BG, Cole SPC, Deeley RG and Gerlach JH. Multidrug Resistance Proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in Lung Cancer: Correlation of Protein Levels with Drug Response and Messenger RNA Levels<sup>1</sup>. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 1798–1804.
- 37 Pešić M, Marković ID, Jankovic D et al. Induced resistance in the human non small cell lung carcinoma (NCI-H460) cell line in vitro by anticancer drugs. *J Chemother.* 2006; **18**: 66-73.
- 38 d'Amato TA, Landreneau RJ, McKenna RJ, Santos RS, Parker RJ. Prevalence of in vitro extreme chemotherapy resistance in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2006; **81**: 440-446.
- 39 Fernandes J & Gattass CR. Topological Polar Surface Area Defines Substrate Transport by Multidrug Resistance Associated Protein 1 (MRP1/ABCC1). *J Med Chem* 2009; **52**: 1214-1218.
- 40 Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature* 2005; **5**:875-886.
- 41 Tse C, Shoemaker AR, Adickes J et al. ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008; **68**: 3421-3428.
- 42 Li J, Viallet J, Haura EB. A small molecule pan-Bcl2 family inhibitor, GX15-070 induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; **61**: 525-534.
- 43 Olie RA, Simões-Wurst AP, Baumann B, et al. A Novel Antisense Oligonucleotide Targeting Survivin Expression Induces Apoptosis and Sensitizes Lung Cancer Cells to Chemotherapy<sup>1</sup>. *Cancer Res*, 2000; **60**: 2805–2809.

- 44 Dean EJ, Ward T, Pinilla C et al. A small molecule inhibitor of XIAP induces apoptosis and synergises with vinorelbine and cisplatin in NSCLC. *Br J Cancer* 2010; **102**(1):97-103.
- 45 Ikuta K, Takemura K, Kihara M et al. Defects in apoptotic signal transduction in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2005; **13**:1229-1234.
- 46 Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998; **153**: 865–873.
- 47 Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC. IAP Regulation of Metastasis. *Cancer Cell* 2010; **17**: 53–64.
- 48 Jun H-S, Park T, Lee CK, Kang MK, Park MS, Kang H, Surh Y-J, Kim OH. Capsaicin induced apoptosis of B16-F10 melanoma cells through down-regulation of Bcl-2. *Food Chemical Toxicol* 2007; **45**: 708–715.
- 49 Dalwadi H, Krysan K, Heuze-Vourc'h N, Dohadwala M, Elashoff D, Sharma S, Cacalano N, Lichtenstein A, Steven Dubinett S. Cyclooxygenase-2-Dependent Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 by Interleukin-6 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 7674-7682.
- 50 Ringbom T, Segura L, Noreen Y, Perera P, Bohlin L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin Biosynthesis. *J Nat Prod* 1998; **61**:1212-1215.

## Figure Legends

**Figure 1.** Activity of Pgp/ABCB1 and MRP1/ABCC1 NSCLC cell lines. A549 (upper) or H460 (lower) cells were incubated for 30 minutes with 400 nM Rho 123 in the presence or absence of verapamil (50  $\mu$ M) or with 5  $\mu$ M CFDA in the presence or absence of MK-571 (50  $\mu$ M). After washing, cellular fluorescence was measured by flow cytometry. Histograms are representative of 3 independent experiments performed in duplicate.

**Figure 2.** OA decreases the cell viability of A549 and H460. A549 (upper) or H460 (lower) Cells ( $10^4$ /well) were incubated with different OA concentrations (10, 25, 40 or 50 $\mu$ g/mL) for 48 h. Cell viability was assessed by MTT and expressed percentage of cells treated with DMSO at the same concentration carried by the compounds. Results represent mean  $\pm$  SD of 4 experiments performed in triplicate.

**Figure 3.** OA induces DNA fragmentation of NSCLC cell lines. A549 (left) and H460 (right) cells were treated with medium (control) or different concentration of OA (10, 25 or 50 $\mu$ g/mL) for 48 h and DNA-fragmentation (sub-G1 peak of the cell cycle) was measured by flow cytometry. Upper panel: representative histogram, Lower panel: percentage of subdiploid cells. Results represent mean  $\pm$  S.D of 3 experiments performed in triplicate.

**Figure 4.** OA induces activation of caspase-3 on NSCLC. After 24h resting, A549 (upper) or H460 (lower) cells were treated medium (control) or different OA concentrations (10, 25 or 50 $\mu$ g/mL) for another 48 h and percentage of caspase-3

activated cells were determined by FACS. Histograms are representative of 2 independent experiments performed in duplicate.

**Figure 5.** Effect of OA on MRP1/ABCC1 activity is dose dependent. A549 (upper) or H460 (lower) cells were incubated for 30 minutes with 5  $\mu$ M CFDA in the presence or absence of MK-571 (50  $\mu$ M) or in the presence of different concentrations of OA (6.25, 12.5, 25 or 50 $\mu$ g/mL) and cellular fluorescence was measured by flow cytometry. Results as expressed as mean  $\pm$  S.D of the mean fluorescence intensity obtained in 3 different experiments performed in triplicate. \*The lower case letters indicates  $p < 0.001$  in relation to the positive control (MK571).

**Figure 6.** OA does not alter the expression of MRP1. A549 (upper) or H460 (lower) cells were treated with medium or 25 and 50 $\mu$ g/mL OA before being harvested permeabilized and incubated with PE-labelled anti-MRP1 for 30 minutes at 4 °C. After two PBS washings cells were resuspended in FACS solution and the fluorescence evaluated. Results are presented as histograms representative of three independent experiments.

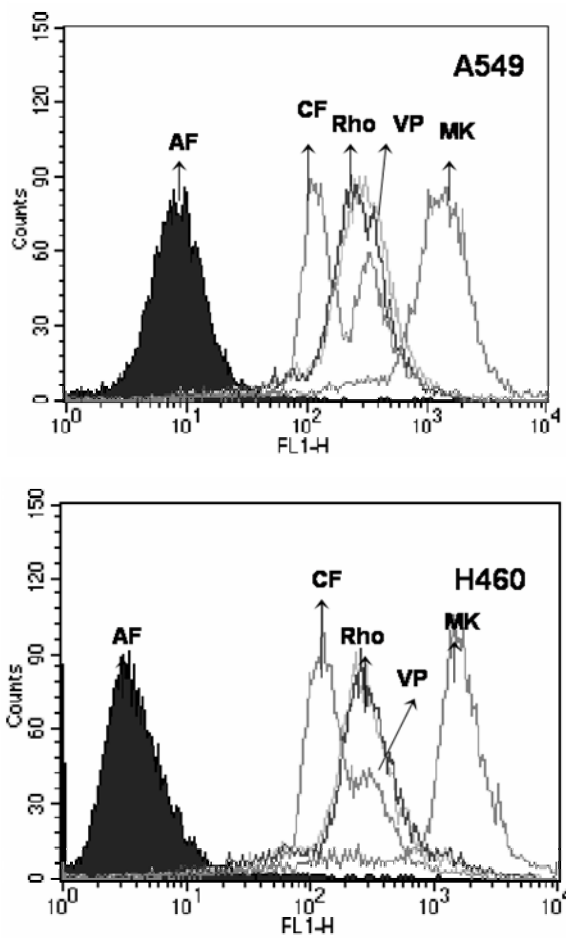
**Figure 7.** OA does not alter the expression of Bcl-2. A549 cells were treated with medium or 50 $\mu$ g/mL OA for 24 h before being harvested permeabilized and incubated with PE-labelled anti-Bcl-2 for 30 minutes at 4 °C. After two PBS washings cells were resuspended in FACS solution and the fluorescence evaluated. Results are presented as histograms representative of three independent experiments.

**Figure 8.** Immunofluorescence of A549 cells stained for Bcl2 (A-B), Bax (C-D), survivin (E-F) and VEGF (G-H). A549 were treated with medium (A,C,E,G) or with 50 µg/mL AO (B, D, F, H) for 48 hours before being fixed and stained with the antibodies as described in material and methods and revealed with biotinylated IgG followed by a streptavidin-Cy3. Representative immunofluorescence micrographs of one experiment performed in triplicate. Bar: 100 µm

**Figure 9.** Immunolocalization of Ki-67 protein. A. DAPI stained immunofluorescence of A549 cells. B. Same microscopical field stained for Ki-67 revealed with Cy3 fluorochrome. Positive nuclei demonstrated in red. C. DAPI stained A549 cells treated with AO. The same microscopical field showing a lesser amount of Cy3 reactive nuclei compared with DAPI stained cells. Bar: 100 µm

**Figure 10.** OA inhibits the development of lung metastasis. Groups of mice injected into the tail veins with B16F10 melanoma cells, were treated with saline, OA (5 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) or OA (10 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) as described in M&M (upper) and the number of lung metastasis was counted on day 18 (lower). Results are expressed as mean ± SD of the number of metastasis.

Figure 1:





**Figure 2**

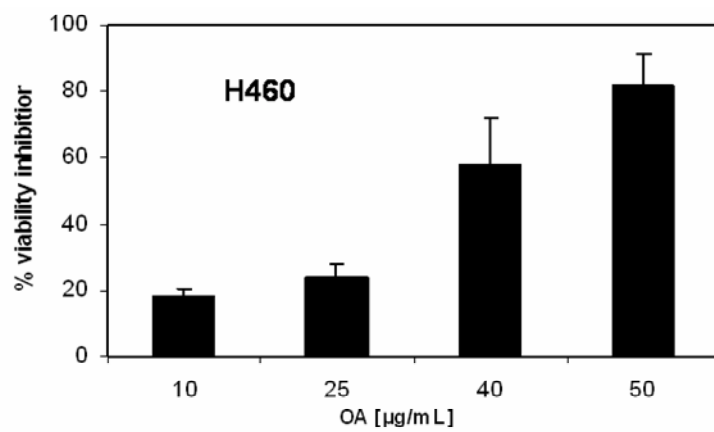
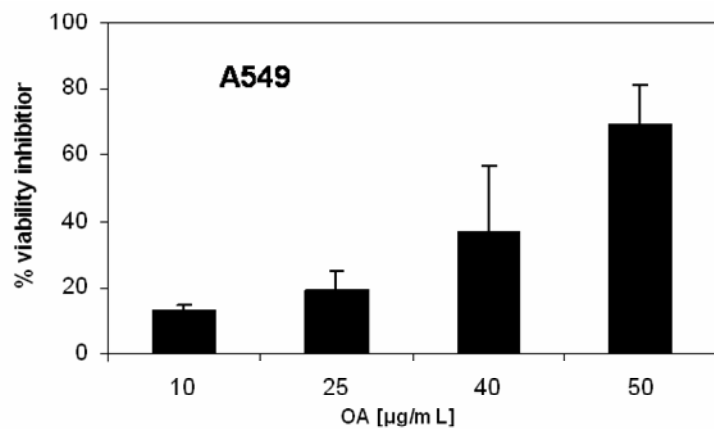


Figure 3

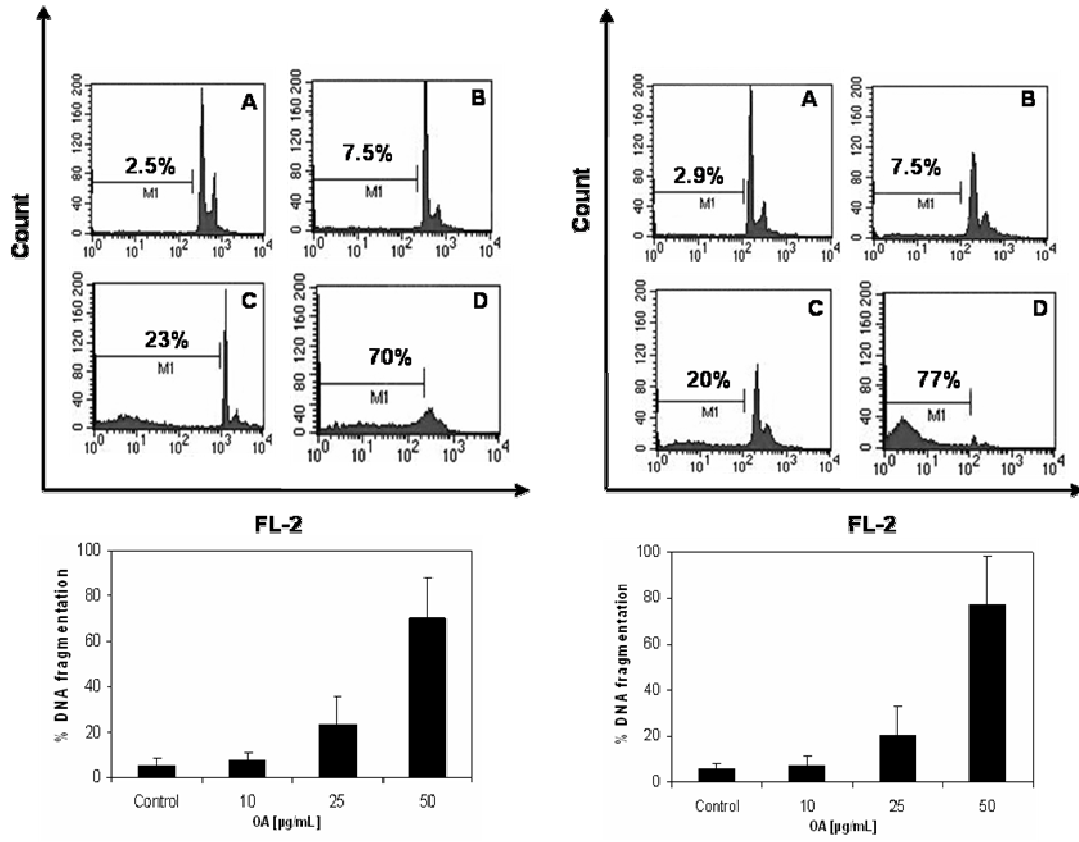


Figure 4

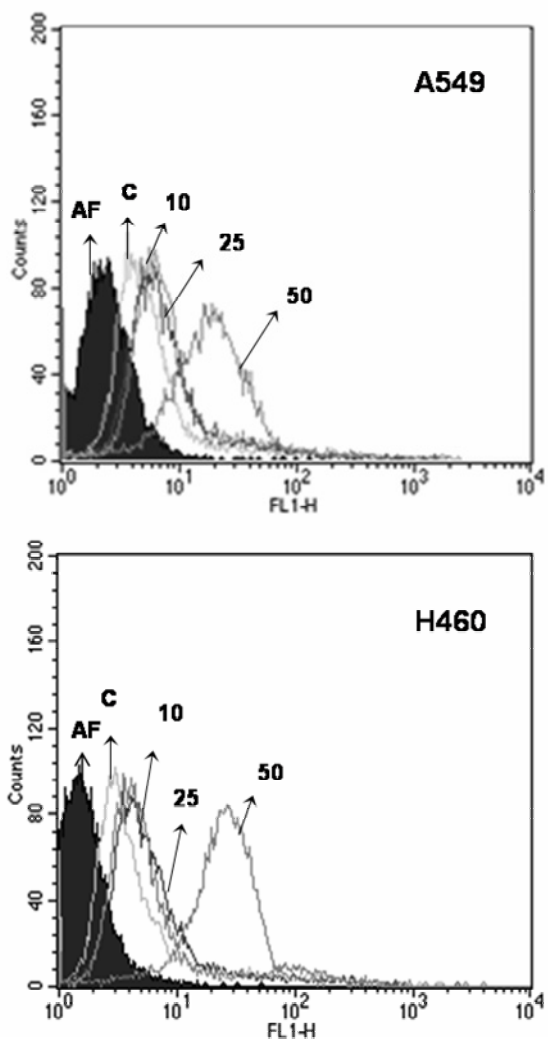


Figure 5

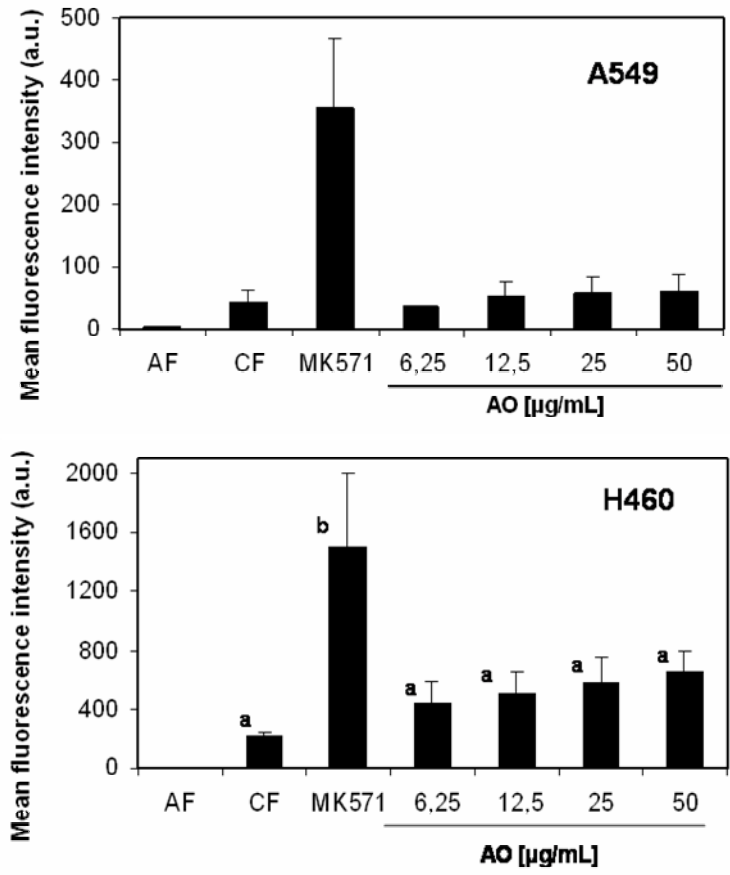


Figure 6

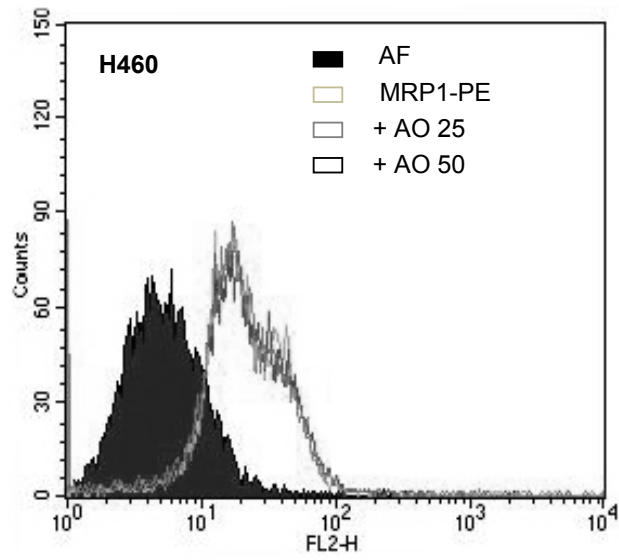
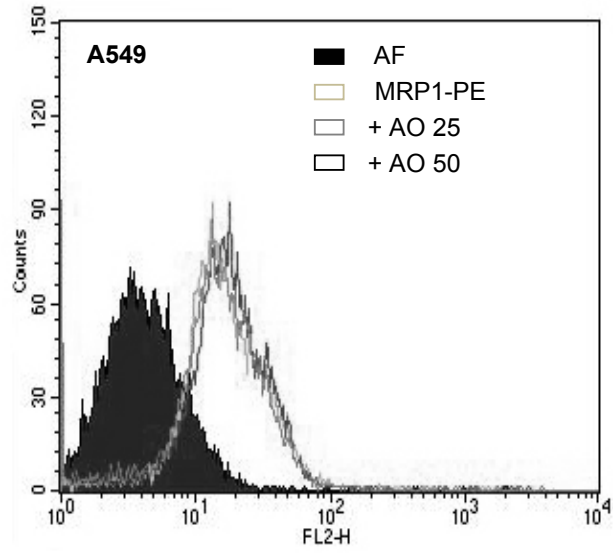


Figure 7

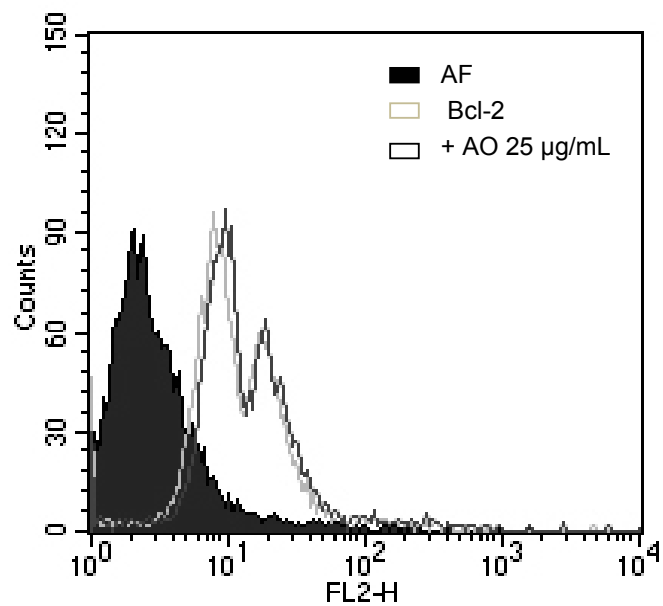


Figure 8

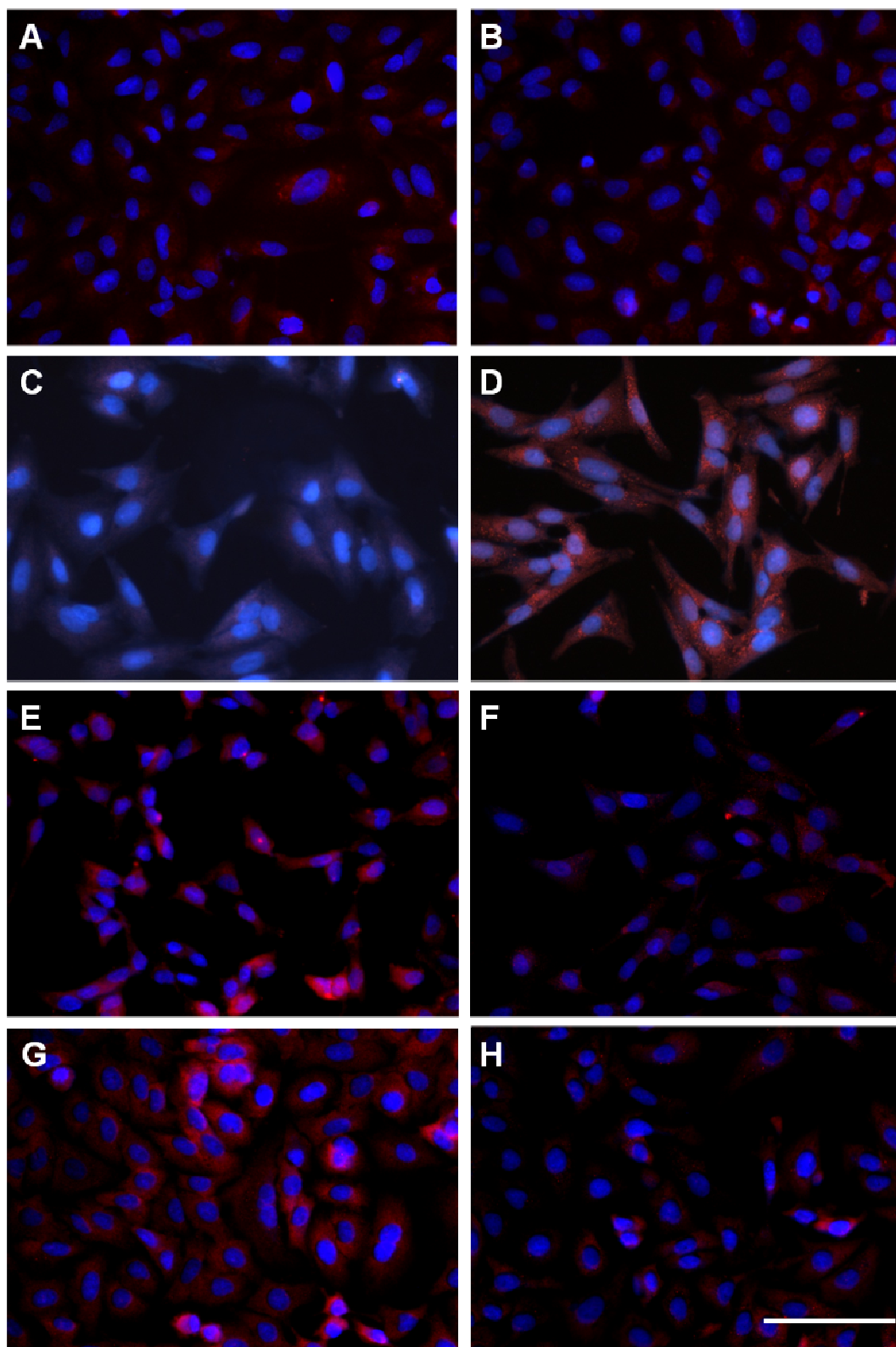


Figure 9

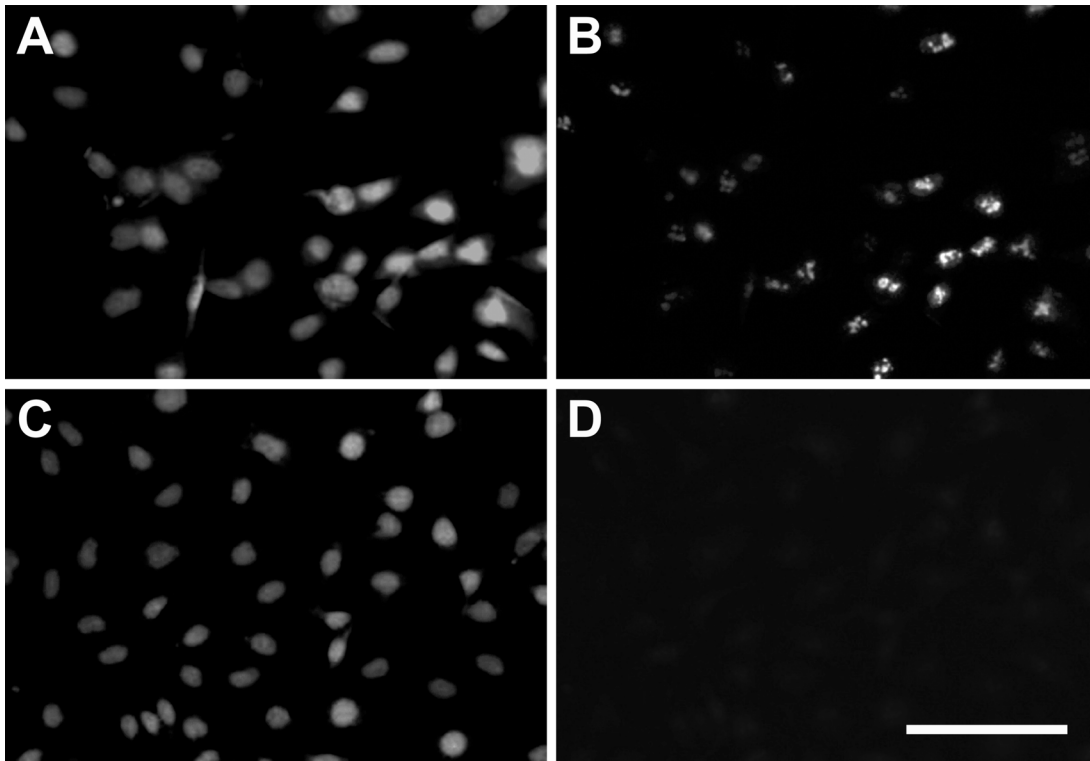
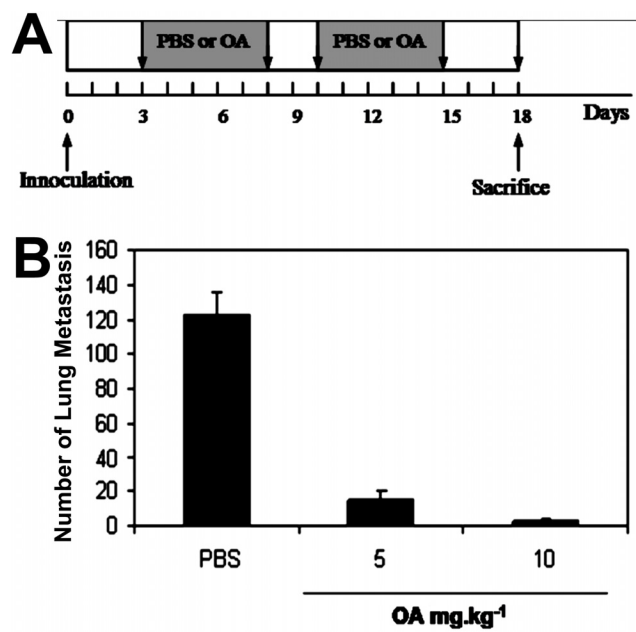




Figure 10



# 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](#)