

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Sarah Azoubel Lima**

**“Estudo do metabolismo de microRNAs na resistência de células  
leucêmicas”**

Este exemplar corresponde à redação  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
**SARAH AZOUBEL LIMA**  
e aprovada pela Comissão Julgadora

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Funcional e  
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

**Campinas, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L628e	<p>Lima, Sarah Azoubel, 1987- Estudo do metabolismo de microRNAs na resistência de células leucêmicas / Sarah Azoubel Lima. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Carmen Veríssima Ferreira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Leucemia. 2. Câncer. 3. MicroRNAs. 4. Imunidade celular. 5. Enzima Dicer. I. Ferreira, Carmen Veríssima, 1969-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Study of microRNA metabolism in leukemia cell resistance

**Palavras-chave em Inglês:**

Leukemia

Cancer

MicroRNAs

Resistance

Dicer enzyme

Cellular immunity

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Carmen Veríssima Ferreira [Orientador]

Claudio Chrysostomo Werneck

Wilson Araújo da Silva Junior

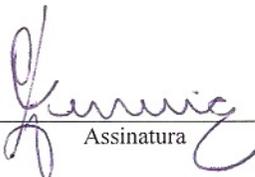
**Data da defesa:** 11-07-2011

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 11 de julho de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck



Assinatura

Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior



Assinatura

Profa. Dra. Cecília Alzira Ferreira de Pinto Maglio

Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Assinatura

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira por sempre acreditar em mim e me proporcionar tantas oportunidades para crescer como pessoa e cientista no decorrer do mestrado.

Aos meus pais Cláudia e Paulo pelo apoio e amor incondicional e também pelas conversas e correções. Ao meu irmão Tomás, que sempre está aberto a falar de qualquer coisa e que vive contribuindo para o meu conhecimento cultural e musical. Aos meus avós Lenise e David, por sempre estarem presentes e participarem ativamente do meu crescimento.

Às minhas amigas-irmãs Marianna, Rafaella e Raíssa. Tenho certeza que não há distância suficiente no mundo para nos separar.

Ao Paulo, por ser namorado, companheiro e me incentivar sempre a ser uma versão melhor de mim mesma.

Aos meus amigos do triathlon, em especial Laís e Felipe, pela diversão e convivência diária que tornou até o pior treino em uma experiência agradável.

À todos meus amigos da graduação, em especial Alexandre, Eduardo, Marcelo, Lari, Paulinha, Matheus, André, Edson, Clara e Isa, por serem uma turma inesquecível. Crescemos juntos e qualquer dificuldade que passei foi mais fácil devido à vocês.

Às minhas amigas Bruna, Lígia e Ana que me ensinaram que a amizade verdadeira continua forte independente dos períodos de afastamento.

Aos colegas do laboratório, que se tornaram também amigos. À Daisy e Mika, que tiveram contribuição ativa nesse trabalho. Ao Rodrigo, por todas as conversas e corridas. Cintia, Karin e Júlia, eu não poderia escolher uma melhor “nova geração” para o laboratório. À Paula, Antônio, Claudinha, Milena, William, Luciana, Ana Laura, Luísa e a todos os outros pela convivência.

À Cláudia e Denise, que facilitam muito nosso trabalho no laboratório e estão sempre prontas para ajudar ou tomar um café.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama por sempre me fazer sentir querida e me receber com um sorriso em seu laboratório. À Erika, Camila e Miriam, por toda a ajuda e pela convivência que fez todas as festinhas mais agradáveis.

À Ana Carolina Santos de Souza Galvão, que teve a paciência e orientação no laboratório transformada em amizade.

Ao Danilo, por se mostrar um amigo em todos os almoços e conversas na cantina do IB.

À minha primeira orientadora de iniciação científica Prof. Dra. Cecília Alzira Ferreira de Pinto Maglio, que me introduziu à pesquisa, me ensinou muito e me proporcionou um ótimo ano no IAC.

Ao Prof. Dr. Marcelo Lancellotti, que sempre abriu espaço em seu laboratório e deu sugestões pertinentes para o trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabio Papes, Katlin Massirer e Leonardo Teixeira, pela incrível boa vontade e por me ajudarem tanto antes de sequer me conhecerem.

À Dra. Jantine van Baal e ao Prof. Dr. John Yates, que contribuíram imensamente para esse trabalho. Agradeço pela confiança com que cederam lugar nos seus laboratórios, permitindo que eu me aventurasse pela Holanda e Estados Unidos. À Pauline, Guga, Roberta, Bispo, Sandra, Casimir, Ben, Jim e Jeff, pelo suporte e por fazerem dessas aventuras mais agradáveis.

Aos professores Wilson Araújo da Silva Junior, Claudio Werneck, Jorg Kobarg, Cecília A. F. de Pinto Maglio, Marcelo Lancellotti, Rodrigo Catharino e Luciana Holanda por aceitarem participar da minha banca de defesa e/ou exame de qualificação. Suas sugestões contribuíram (ou ainda irão contribuir) para a melhora dessa dissertação.

À Andreia e Marina pelo suporte nos assuntos relacionados à pós-graduação.

À Fapesp, CNPq e Unicamp, pelo financiamento e estrutura que tornaram possível esse projeto.

À todas as outras pessoas que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para minha formação.

## RESUMO

A resistência à quimioterápicos é um dos principais obstáculos para a terapia do câncer. Na leucemia mielóide crônica (CML) o tratamento é frequentemente ineficiente devido à aquisição de resistência aos quimioterápicos utilizados. Dessa forma, o estudo comparativo de linhagens celulares de CML resistentes e susceptíveis a drogas é de extrema importância para o entendimento dos mecanismos moleculares da resistência e para a evolução de novos protocolos terapêuticos. Um número cada vez maior de evidências indica que os microRNAs apresentam importante papel no processo de carcinogênese e na agressividade tumoral. Nesse trabalho o principal objetivo é melhor esclarecer o papel da maquinaria de processamento de microRNAs no fenótipo MDR (*multi-drug resistance*), utilizando principalmente as linhagens de CML K562 (susceptível) e Lucena (fenótipo MDR). Nossos resultados revelaram que as células Lucena apresentam altos níveis da endonuclease Dicer e que os microRNAs let-7a e miR-145 são intensamente regulados em relação à K562. Além disso, a linhagem Lucena se tornou mais sensível ao quimioterápico vincristina após o silenciamento de Dicer. Experimentos com outras linhagens celulares mostraram que a resistência frente à cisplatina e doxorrubicina possui correlação significativa com os níveis de Dicer. A identificação de ligantes dessa endonuclease nas linhagens de CML ressalta a possibilidade desta enzima estar cumprindo novos papéis no fenótipo MDR. Entre os ligantes exclusivos da linhagem resistente, estão proteínas envolvidas na promoção de defesa anti-oxidante, proliferação celular e metabolismo de lipídios e hormônios esteróides. De acordo, dados de proteoma das duas linhagens enfatizam a importância do metabolismo lipídico para aquisição da resistência, bem como de um intenso remodelamento do citoesqueleto. Nossos dados reforçam o caráter complexo e multifatorial da resistência à múltiplas drogas, contribuindo para o entendimento do ação de miRNAs e de Dicer nesse processo.

## ABSTRACT

Drug resistance is one of the main obstacles in cancer therapy. Frequently, the treatment of chronic myelogenous leukemia (CML) becomes inefficient due to the emergence of a resistant population of cancer cells. Therefore, comparative studies of resistant and non-resistant CML cell lines is extremely important to the understanding of molecular mechanisms involved in the acquisition of resistance and also to the evolution of new therapeutic protocols. A growing number of evidence supports an important role for microRNAs in carcinogenesis and tumoral aggressiveness. This study aims to better understand the role of microRNAs and their biosynthetic pathway in the phenotype of multi-drug resistance (MDR) of CML cells. To this purpose we worked with the leukemic cell lines K562 (non-resistant) and Lucena (MDR phenotype). The results obtained revealed that Lucena expresses high levels of Dicer endonuclease and intensely regulates microRNAs let-7a and miR-145 when compared to K562. Also, Dicer silencing in MDR cells enhanced sensitivity to the chemotherapeutic drug vincristine. Experiments with different cells lines showed that resistance to cisplatin and doxorubicin are correlated to Dicer expression levels. In CML cell lines, the identification of Dicer ligands points to the possibility of alternative roles for this endonuclease in the MDR phenotype. Among the newly found interactors in the resistant cell line are proteins involved in antioxidant defense, proliferation and metabolism of fatty acids and steroids. Accordingly, proteome data from K562 and Lucena cells emphasizes the importance of lipid metabolism and structural remodeling to the resistant phenotype. Overall, our data contributes to the understanding of the role played by microRNAs and Dicer in the complex and multifactorial MDR phenotype.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

17 $\beta$ -HSD	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12
ABC	ATP-binding cassette transporters
ABCG2	Transportador ABC placenta-específico 2
ACN	Acetonitrila
AGO	Argonauta
ARP2/3	Actin-related protein 2/3
CML	Leucemia mielóide crônica / Chronic Myeloid Leukemia
DCD	Dermicidin
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
dsRBDs	dsRNA-binding domains
DTT	Ditiotreitol
ER	Receptor de estrogênio
FC	Fold change
GCDH	Glutaryl-CoA dehydrogenase
GO	Gene ontology
HPLC	High-performance liquid chromatography
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LC	Cromatografia líquida
LC3	Microtubule-associated protein 1a light chain 3
LRP	Lung resistance-related protein
MAP1b	Microtubule-associated protein 1b
MDR	Resistência a múltiplas drogas / Multidrug resistance
MDR1	Glicoproteína-P / Multidrug resistance 1
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
MRP	Proteína MDR relacionada

MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
MTT	3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio
MudPIT	Multidimensional protein identification technology
ODPX	Pyruvate dehydrogenase protein X component
P1	60S acidic ribosomal protein
pI	Ponto isoelétrico
POFB1	Premature ovarian failure B1
pre-miRNA	microRNA precursor
pri-miRNA	microRNA primário
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNAi	Técnica de RNA de interferência
RNP	Ribonucleoproteína
RPOM	DNA-directed RNA polymerase
SCX	Strong cation exchange
SDS	Dodecil sulfato de sódio
shRNA	short hairpin RNA
SILAC	Stable isotope labeling with amino acids
SPF27	Pre-mRNA-splicing factor SPF27
STAR	Steroidogenic acute regulatory protein
TAP	Proteína transportadora de peptídeos antigênicos
TARBP2	TAR RNA binding protein
TFA	Ácido trifluoroacético

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1 Aspectos epidemiológicos do câncer	01
1.2 Leucemia mielóide crônica	02
1.3 Resistência à múltiplas drogas (MDR)	05
1.4 MicroRNAs	07
1.5 MicroRNAs e câncer	10
1.6 Células de CML humana (K562 e Lucena)	11
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1 Cultura de células	13
3.2 Transfecção	14
3.3 Extração de RNA	14
3.4 Síntese de cDNA	15
3.5 qRT-PCR	15
3.6 Ensaio de citotoxicidade	17
3.6.1 Avaliação de viabilidade celular através da redução do MTT	17
3.6.2 Exclusão por azul de tripan	18
3.7 Análises estatísticas	18
3.8 Western Blot	18
3.9 Imunoprecipitação	19
3.10 MudPIT	20
3.11 Proteoma SILAC	22
3.11.1 Cultivo de células em meio SILAC (cultura de células em aminoácidos de marcação isotópica)	24
3.11.2 Digestão de proteínas em gel	24
3.11.3 Análise por espectrometria de massas	26
3.11.4 Identificação de peptídeos utilizando MASCOT Search Engine	27
3.11.5 Análise dos dados de proteoma	27
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
4.1 Expressão das proteínas envolvidas na biogênese e função de miRNAs nas linhagens leucêmicas K562 e Lucena	28
4.2 Expressão de miRNAs nas linhagens leucêmicas K562 e Lucena	29
4.3 Determinação de possíveis alvos de let-7a e miR-145	34
4.4 Expressão de miRNAs e proteínas envolvidas em sua biogênese e função nas linhagens de câncer de cólon HCT8 e HCT8/DDP	36
4.5 Silenciamento de Dicer na linhagem Lucena	37

4.6 Triagem da expressão da Dicer e sensibilidade à quimioterápicos em diferentes linhagens celulares	39
4.6.1 Análise da expressão da Dicer	40
4.6.2 Correlação da resistência a quimioterápicos com a expressão de Dicer	43
4.6.3 Análise da expressão de MDR1	46
4.7 Análise dos ligantes de Dicer por MudPIT	48
4.7.1 Imunoprecipitação	50
4.7.2 Análise das interações de Dicer nas linhagens leucêmicas K562 e Lucena	51
4.8 Análise do proteoma	58
4.8.1 Metabolismo de lipídios está aumentado em células resistentes (Lucena)	59
4.8.2 Remodelamento do citoesqueleto nas células resistentes	61
4.8.3 Processos biológicos enriquecidos e depletados nas células Lucena	64
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>
<b>7 ANEXOS</b>	<b>78</b>
7.1 Colaboração com a Dra. Jantine van Baal na Utrecht University - Holanda	78
7.2 Colaboração com o Prof. Dr. John Yates no The Scripps Research Institute - EUA	78
7.3 Apresentação de resumo e pôster na Reunião Anual da SBBQ - 2010	79
7.4 Artigos publicados	80

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos epidemiológicos do câncer

De acordo com o relatório *World Cancer Report 2008* publicado pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. A Organização Mundial da Saúde (<http://www.who.int/cancer/en/>), estima que 12 milhões de pessoas em todo o mundo são diagnosticadas com algum tipo de câncer a cada ano, sendo que 7,6 milhões vão a óbito. O contínuo crescimento populacional, bem como o aumento da perspectiva de vida, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA - <http://www.inca.gov.br>), para os anos de 2010 e 2011 serão registrados 489.270 novos casos de câncer por ano. Dentre esses novos casos (excluindo-se o câncer de pele do tipo não melanoma) os cânceres de próstata e de pulmão serão os mais incidentes no sexo masculino, e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino.

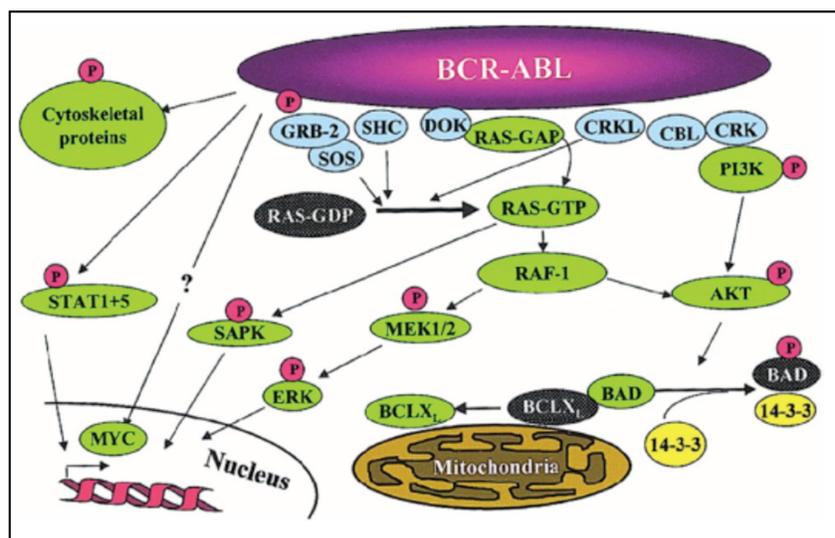
O número de casos de leucemias no Brasil tem se mantido constante. Nos anos de 2008/2009 foram registrados 9.540 novos casos de leucemia, dos quais 5.220 afetaram indivíduos do sexo masculino e 4.320 do sexo feminino. Nesse período foram constatados 5.721 óbitos. As estimativas para 2010 e 2011 apontam um aumento no número de casos de leucemias, sendo esperado um total de aproximadamente 9.580 novos casos, sendo que 5.240 afetarão homens e 4.340 mulheres. Tomando-se como base as estimativas do INCA,

as leucemias contribuirão com significativa parcela de novos casos de câncer no Brasil, atingindo principalmente as populações dos maiores centros urbanos. Reconhecidamente estes centros são detentores de precários sistemas de saúde e recursos econômicos insuficientes para o adequado atendimento do grande número de usuários. Desta maneira, terapias mais eficientes no tratamento da leucemia reduziriam não somente o número de óbitos, mas também o tempo e recursos gastos durante o tratamento dos pacientes. Os tratamentos químico e radioterápicos são bastante custosos para o sistema público de saúde devido ao relativo alto custo dos fármacos e equipamentos utilizados e, também, da mão-de-obra especializada necessária ao acompanhamento do paciente durante os períodos de internação. Uma terapia mais efetiva que proporcione melhor prognóstico para os pacientes e menores gastos para o Estado será de grande interesse e vantagem para o Brasil.

## **1.2 Leucemia Mielóide Crônica**

A leucemia mielóide crônica (CML) é uma doença mieloproliferativa resultante da expansão clonal de uma célula-tronco hematopoiética multipotente transformada. A CML é um dos primeiros exemplos de alteração cromossomal adquirida ligada a um tumor maligno humano. Esta alteração é decorrente da translocação balanceada entre os cromossomos 9 e 22 gerando um gene de fusão BCR-ABL. A proteína derivada desta fusão é uma tirosina quinase citoplasmática constitutivamente ativa que modula positivamente muitas vias de sinalização que levam ao crescimento celular e à inibição da apoptose (Figura 1). Seu papel promotor da leucemogênese é devido à ampla especificidade desta quinase. A BCR-ABL

atua em proteínas do citoesqueleto (favorecendo o remodelamento da estrutura celular e do tráfego de vesículas) em fatores de transcrição que inibem a diferenciação das células leucêmicas (STAT1 e cMyc) e em proteínas das vias Ras e PI3K, principais vias associadas à proliferação e sobrevivência celular. A ativação da via PI3K favorece a ação de proteínas anti-apoptóticas e modula negativamente proteínas pró-apoptóticas (Druker, 2008).



**Figura 1** - Vias de sinalização afetadas pela expressão da BCR-ABL (Druker, 2008). BCR-ABL ativa constitutivamente um amplo espectro de vias de transdução de sinal envolvidas na remodelação do citoesqueleto, diferenciação e proliferação celular, promovendo a sobrevivência das células leucêmicas.

A CML representa um excelente modelo para o estudo de novos mecanismos de tumorigênese já que o marcador e principal responsável pela doença, o cromossomo Philadelphia, está presente em >95% dos pacientes (Sawyers, 1998; Verfaillie, 1998; Li *et al.*, 1999; Deininger *et al.*, 2000; Quackenbush *et al.*, 2000). Assim, a caracterização molecular detalhada das células de CML e, conseqüente, a identificação de mediadores que são

essenciais para a manutenção deste fenótipo será válida para a grande maioria dos acometidos.

Atualmente, o imatinib (inibidor de proteínas tirosinas quinases) é o fármaco de escolha para o tratamento da CML, sendo um dos primeiros produtos obtidos a partir de desenvolvimento racional de drogas (Joske, 2008). Inicialmente acreditava-se que a ação antileucêmica do mesmo era devida à inibição exclusiva da proteína BCR-ABL, mas atualmente sabe-se que o mesmo pode inibir um amplo espectro de quinases (Diamond e Melo, 2011).

Apesar da aparente eficiência terapêutica do imatinib, frequentemente pacientes se tornam intolerantes ao tratamento ou adquirem resistência à droga. A aquisição da resistência das células leucêmicas se deve basicamente a mutações no gene que codifica a BCR-ABL, ocorrendo alterações no sítio de ligação da quinase ao imatinib (Griswold *et al.*, 2006). O fenômeno de resistência levou ao desenvolvimento de inibidores de segunda geração, dentre os quais dasatinib e nilotinib são os mais estudados. Dasatinib é 325 vezes mais potente que o imatinib em inibir a proteína quinase BCR-ABL, principalmente por se ligar à quinase tanto na conformação ativa quanto na inativa. Além da BCR-ABL, o Dasatinib também inibe outras quinases tais como cKit, PDGFR e Src (Warmuth *et al.*, 2003; Talpaz *et al.*, 2006). Nilotinib é 20-50 vezes mais potente que o imatinib. No entanto, esse não age sobre a Src, diminuindo os efeitos colaterais do medicamento (Kantarjian *et al.*, 2006). Apesar da potência de inibição destes dois fármacos de segunda geração, já existem relatos na literatura (Soverini *et al.*, 2007; Mahon *et al.*, 2008) sobre a aquisição de resistência aos mesmos. Portanto, inibidores de outras quinases têm sido desenvolvidos

como, por exemplo, o MK-0457. Esse age sobre a aurora quinase, afetando a formação do fuso mitótico e induzindo apoptose (Giles *et al.*, 2007).

### **1.3 Resistência a múltiplas drogas (MDR)**

O processo de resistência de células tumorais é um mecanismo multifatorial, cujos mecanismos moleculares ainda são poucos conhecidos. A resistência a quimioterápicos é um dos principais obstáculos no tratamento de pacientes com câncer, especialmente nos casos de neoplasias hematológicas, nas quais o tratamento cirúrgico é pouco viável. Nessas situações a quimioterapia ainda é a principal opção terapêutica. Por esta razão, a elucidação dos mecanismos que conferem resistência a fármacos e o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para o câncer têm sido as principais metas dos pesquisadores da área (O'Connor, 2007; Lee, 2010). A resistência pode se manifestar logo nos estágios iniciais de tratamento ou ser induzida durante a quimioterapia, sendo selecionadas células resistentes aos medicamentos. Assim, observa-se que as alterações genéticas que levam à resistência podem surgir como eventos espontâneos ou serem adquiridas como consequência do tratamento (Kappelmayer *et al.*, 2004; Nobili *et al.*, 2006).

O fenótipo MDR (multidrug resistance) tem sido associado a uma série de distúrbios celulares incluindo alterações no ciclo celular, aumento na eficiência de reparo do DNA, redução de apoptose e/ou autofagia, alteração no metabolismo de xenobióticos e aumento do tráfego de vesículas intracelulares (Kondo *et al.*, 2005; Szakács *et al.*, 2006). Dentre os possíveis processos de aquisição de resistência identificados, o mais frequente

envolve o aumento do efluxo de drogas citotóxicas. Isso ocorre através de um sistema dependente de energia, mediado por membros da família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporters*). Primeiramente descritos na década de 70, vários membros da família de transportadores ABC têm mostrado ser potentes indutores de MDR, destacando-se o papel da glicoproteína-P (também conhecida como MDR1), proteínas MDR relacionadas (MRPs) e proteína transportadora de peptídeos antigênicos (TAP) (Hirose *et al.*, 2003; Kruh e Belinsky, 2003; Al-Shawi e Omote, 2005; Ozben, 2006; Szakács *et al.*, 2006). O aumento na expressão de MDR1 é fator suficiente para a aquisição do fenótipo MDR. De fato, células com alta expressão de MDR1 são capazes de expulsar uma grande variedade de drogas estruturalmente diversas, impedindo que níveis intracelulares tóxicos sejam alcançados (Rumjanek *et al.*, 2001).

Adicionalmente às bombas de efluxo, as células tumorais apresentam inúmeros outros importantes mecanismos voltados para a modulação da resposta ao quimioterápico. O transportador ABCG2, também conhecido como transportador ABC placenta-específico 2, foi primeiramente isolado em células de tumores de mama, mostrando ser potente inibidor do acúmulo intracelular de drogas mesmo na ausência de MDR1 ou MRP1. De forma similar, a proteína de resistência presente no câncer de pulmão (*lung resistance-related protein* ou LRP) também é capaz de induzir resistência na ausência de MDR1. É interessante ressaltar que tanto ABCG2 quanto LRP têm sido detectadas em células leucêmicas, sendo consideradas importantes fatores de resistência no tratamento da leucemia mielóide aguda (van den Heuvel-Eibrink *et al.*, 2002; Kappelmayer *et al.*, 2004).

## 1.4 MicroRNAs

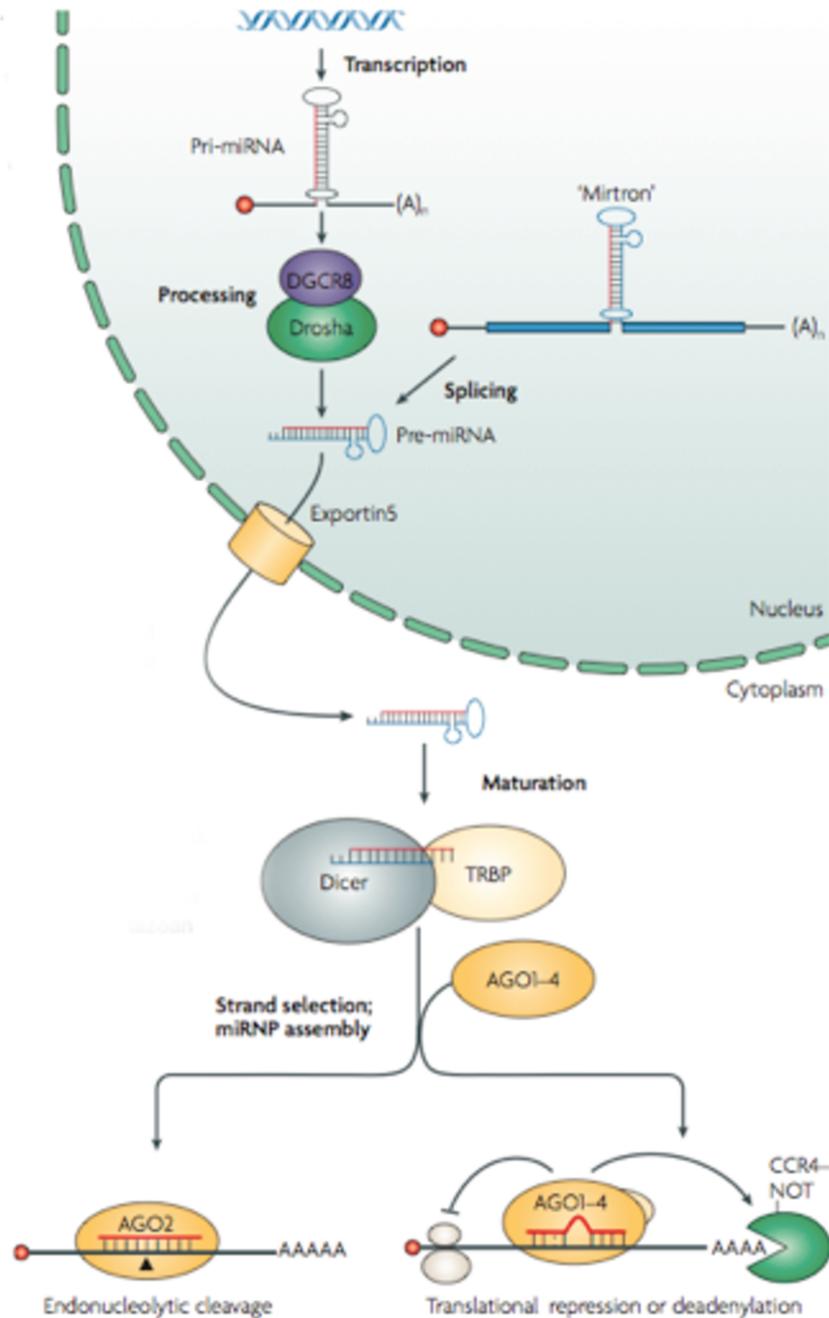
Os microRNAs (miRNAs) constituem uma abundante classe de pequenos RNAs endógenos, contendo de 21 a 23 nucleotídeos, que têm importante papel na regulação gênica. Esses pequenos RNAs reguladores controlam a expressão gênica no estágio pós-transcricional, atuando na inibição da tradução ou desestabilização de mRNAs no citoplasma (Bartel, 2004).

Em mamíferos, o processo de biogênese de miRNAs se inicia a partir de moléculas precursoras, os pri-miRNAs (microRNAs primários). Esses são transcritos a partir de genes codificantes para miRNAs independentes ou são gerados de íntrons contidos em genes que codificam para proteínas (Figura 2). Os pri-miRNAs sofrem dobramentos, assumindo estruturas contendo grampos e porções de pareamento imperfeito. Um único pri-miRNA frequentemente contém seqüências pertencentes a vários miRNAs diferentes que serão separadas após seu processamento. O pri-miRNA é processado em duas etapas catalisadas pelas endonucleases Drosha e Dicer. Essas duas enzimas são parte de complexos envolvendo proteínas que contém domínios de ligação a RNA de fita dupla (*dsRNA-binding domains*) chamados dsRBDs. Drosha forma um complexo com a proteína DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*), transformando os pri-miRNAs em grampos de cerca de 70 nucleotídeos chamados pre-miRNAs. Alguns íntrons removidos por splicing correspondem diretamente aos pre-miRNAs (mirtrons), não havendo a necessidade do processamento pelo complexo Drosha-DGCR8. Os pre-miRNAs (microRNAs precursores) são então transportados para o citoplasma através da exportina5 onde são clivados pela

Dicer, que forma um complexo com a proteína TARBP2 (*TAR RNA binding protein*). A clivagem gera pequenos RNAs dupla fita com cerca de 20 bp. Na maioria dos casos uma das fitas se torna o miRNA maduro enquanto a outra é degradada (Filipowicz *et al.*, 2008).

Após o processamento, os miRNAs são adicionados a complexos de ribonucleoproteínas (RNPs) ou complexos de silenciamento induzidos por RNA (RISCs) formando miRNPs ou miRISCs. Os principais componentes dos miRNPs são proteínas da família das argonautas (AGO). Em mamíferos, quatro argonautas (AGO1 a AGO4) estão envolvidas no processo de regulação por miRNAs e apenas AGO2 age também no mecanismo de interferência por RNA (RNAi). AGO2, também conhecida como Slicer, tem função de endonuclease, atuando através da clivagem do mRNA alvo (Liu *et al.*, 2004). Já as outras argonautas atuam por deadenilação da cauda poli-A ou inibição da tradução dos mRNAs alvos (Filipowicz *et al.*, 2008).

Os miRNAs reconhecem seus mRNAs alvos por pareamento de bases. Em mamíferos, esse pareamento é quase sempre imperfeito, ou seja, nem todas as bases do miRNA têm complementaridade com as bases do mRNA alvo. Contudo, esse pareamento imperfeito segue uma série de regras determinadas por dados experimentais e de bioinformática, sendo que o principal requerimento é o pareamento contínuo dos nucleotídeos 2 a 8 do miRNA com o alvo (Bartel, 2009). Com poucas exceções, os sítios de ligação de miRNAs contido nos mRNAs estão localizados na porção 3'UTR e estão presentes em múltiplas cópias, o que é necessário para a inibição eficiente da tradução (Filipowicz *et al.*, 2008).



**Figura 2** - Mecanismos de biogênese e funcionamento de microRNAs (Filipowicz et al., 2008). Os miRNAs são processados a partir de moléculas precursoras que podem conter seqüências para vários miRNAs diferentes. A clivagem dos precursores se dá por complexos contendo as endoribonucleases Drosha e Dicer. Os miRNAs maduros interagem com ribonucleoproteínas (RNPs) argonautas (AGO) para atuarem na regulação pós-transcricional de seus mRNAs alvos.

## 1.5 MicroRNAs e Câncer

No decorrer da evolução, as células desenvolveram complexos mecanismos e sistemas de regulação para garantir que a divisão, diferenciação e morte ocorram de forma coordenada e correta. Tendo em vista que a maior parte dos processos celulares é executada por proteínas, a modulação da transcrição gênica irá definir e direcionar todos os processos celulares. Dessa forma, alterações nesses genes ou em seus processos regulatórios podem ocasionar a proliferação e sobrevivência descontrolada das células, dando origem ao câncer (Esquela-Kerscher e Slack, 2006). Recentemente, um número crescente de evidências têm apontado que a alteração na regulação de miRNAs pode promover ou suprimir fenótipos cancerosos. Assim, os miRNAs começam também a assumir papel de oncogenes ou supressores de tumor (Si *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009), papéis antes exclusivos de genes que codificam para proteínas. Mesmo quando os miRNAs não são responsáveis por promoverem o câncer, as extensas alterações nos processos de regulação das células tumorais fazem com que essas tenham perfis de expressão de miRNA distintos das células normais e de outras linhagens tumorais (Lu *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006; Gaur *et al.*, 2007).

A regulação exercida pelos miRNAs também influencia a resistência de células cancerosas a quimioterápicos. Em trabalho recente, Zhu e colaboradores identificaram que os miRNAs miR-27a e miR-451 são mais expressos em linhagens resistentes de câncer de ovário e cérvix. Os mesmos acarretam a ativação da expressão de MDR1 (Zhu *et al.*, 2008), o principal fator no fenótipo de resistência a múltiplas drogas (Nobili *et al.*, 2006). Já a

supressão dos miR-15b e miR-16 é responsável por promover resistência em células de câncer gástrico através do aumento dos níveis de BCL2, um fator antiapoptótico (Xia *et al.*, 2008).

### **1.6 Células de CML humana (K562 e Lucena)**

A K562 é uma linhagem celular eritroblástica de leucemia mielóide crônica humana. A linhagem foi estabelecida por Lozzio e Lozzio a partir de células coletadas de paciente do sexo feminino com CML em crise blástica terminal. Esta linhagem tem como marcador molecular específico o cromossomo Filadélfia (Lozzio e Lozzio, 1975).

A linhagem celular Lucena foi desenvolvida a partir de células K562 através de seleção pela resistência ao quimioterápico vincristina. A seleção garantiu também resistência à outros fármacos, sendo que Lucena caracteriza-se pelo fenótipo MDR, possuindo alta expressão de MDR1. A linhagem também mostra resistência a ação de radiação ultravioleta-A e peróxido de hidrogênio (Rumjanek *et al.*, 2001).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho é melhor esclarecer o papel da endonuclease Dicer e do metabolismo de miRNAs na aquisição do fenótipo de resistência à múltiplas drogas em células de leucemia mielóide crônica. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram formulados:

- Avaliação da expressão de componentes da maquinaria de processamento de miRNAs nas linhagens de CML K562 (susceptível) e Lucena (resistente à múltiplas drogas);
- Identificação de miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens K562 e Lucena;
- Investigar a influência de Dicer sobre a aquisição do fenótipo MDR;
- Verificar se os fenômenos observados em CML se estendem à outros modelos celulares;
- Inferir possíveis mecanismos que relacionem o metabolismo de miRNAs e/ou a enzima Dicer à resistência da linhagem de CML Lucena.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura de Células

As células foram cultivadas em atmosfera umidificada, com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Os meios de cultura (RPMI e DMEM) foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina). As linhagens utilizadas estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Listagem e descrição das linhagens celulares utilizadas.

<b>CÉLULAS</b>	<b>TIPO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>MEIO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
3T3	NORMAL	<i>M. musculus</i>	DMEM	fibroblasto
COS7	NORMAL	<i>C. aethiops</i>	DMEM	fibroblasto renal
VERO	NORMAL	<i>C. aethiops</i>	DMEM	epitelial renal
K562	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	leucemia mielóide crônica
LUCENA	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	leucemia mielóide crônica/MDR
3LL	CÂNCER	<i>M. musculus</i>	RPMI	carcinoma pulmonar
PANC-1	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	DMEM	câncer pâncreas
MCF7	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	câncer mama
MCF7 ADR	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	câncer mama/MDR
SKMEL2	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	melanoma
SKMEL28	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	melanoma
B16	CÂNCER	<i>M. musculus</i>	DMEM	melanoma
HT-29	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	câncer de cólon
786	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	câncer renal
DU-145	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	câncer de próstata
PC3	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	câncer de próstata
CACO-2	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	DMEM	adenocarcinoma colorretal
KB372	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	câncer de boca
A549	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	carcinoma pulmonar
HS-5	NORMAL	<i>H. sapiens</i>	RPMI	estroma medular fibroblástico
Namalwa	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	linfoma de burkitt
RENCA	CÂNCER	<i>M. musculus</i>	RPMI	adenocarcinoma renal
HaCaT	NORMAL	<i>H. sapiens</i>	DMEM	queratinócito
HCT8	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	câncer de cólon
HCT8/DDP	CÂNCER	<i>H. sapiens</i>	RPMI	câncer de cólon/resistente

As linhagens K562 e Lucena foram gentilmente cedidas pela Profa. Vivian M. Rumjanek (Universidade Federal do Rio de Janeiro). As linhagens 786, SKMEL-2 e SKMEL-28 foram doadas pelo Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA/Unicamp). As células HaCat e Panc-1 foram concedidas pela Dra. Liudmila Kodach (Amsterdam University). As demais linhagens utilizadas neste trabalho foram adquiridas da ATCC.

### **3.2 Transfecção**

A transfecção da linhagem Lucena com o siRNA para Dicer foi efetuada em um nucleoporador Amaxa (Lonza), de acordo com as instruções do fabricante. As células também foram transfectadas com um plasmídeo codificando GFP (controle de transfecção) e siRNA nonsense (controle negativo do silenciamento). A sequência do siRNA tendo como alvo Dicer foi UGCUUGAAGCAGCUCUGGA, o mesmo foi sintetizado pela Dharmacon (*Thermo Scientific*) com dTdT *overhangs*. O siRNA controle foi adquirido da Qiagen.

### **3.3 Extração de RNA**

Para a extração de RNA, as células foram coletadas, centrifugadas, lavadas com PBS e novamente centrifugadas. O pellet foi ressuscitado e homogeneizado em 1mL de Trizol Reagent (Invitrogen) e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. 200µL de clorofórmio foram adicionados, agitando vigorosamente o tubo por 15 segundos. Seguiu-se uma centrifugação a 12000g por 15min a 4°C. A fase superior aquosa, que contém o RNA,

foi transferida para um novo tubo. A fim de precipitar o RNA, adicionou-se 500 $\mu$ L de isopropanol. A amostra foi mantida a temperatura ambiente por 10min e então centrifugada a 12000g por 10min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o pellet lavado com etanol 75% em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Após uma centrifugação a 7500g por 5min a 4°C o etanol foi retirado e o tubo foi colocado, aberto, por 5min na bancada para evaporação do remanescente. Em seguida o RNA foi redissolvido em H<sub>2</sub>O DEPC e armazenado a -80°C.

### **3.4 Síntese de cDNA**

A transcrição reversa dos RNAs foi realizada com o kit SuperScript First Strand Supermix (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados *random hexamer* primers para a síntese de cDNA total. Para a síntese de cDNA dos miRNAs foi utilizado o TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), e primers específicos para cada miRNA (TaqMan microRNA assays, Applied Biosystems).

### **3.5 qRT-PCR**

As reações de qRT-PCR foram montadas com o Maxima Sybr Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas) em placas de 96 poços. As reações foram incubadas no StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) a 95°C por 10min seguidos por 40

ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C. Os primers utilizados estão detalhados na Tabela 2. A quantificação de microRNAs foi feita através de TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems) que além do par de primers específicos para transcrição reversa e amplificação, contém uma sonda fluorescente, que contribui para sua precisão. Essas últimas foram também montadas em placas de 96 poços utilizando o TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems) e incubadas a 95°C por 10min seguidos por 40 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C. Os dados de expressão dos mRNAs foram normalizados pelo valor da expressão de GAPDH, já para os microRNAs, o pequeno RNA U6 foi utilizado como controle endógeno. Os valores de fold change e desvio padrão foram determinados através do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001). Os miRNAs avaliados foram: miR-214, miR-215, miR-203, miR-205, miR-143, let-7a, miR-145, miR-192, miR-194, miR-451, miR-15b, miR-16, miR-21 e miR-27a.

**Tabela 2** - Sequências dos primers utilizados para a detecção por qRT-PCR utilizando Sybr Green.

Gene	Sense Primer	Antisense Primer
Dicer	5'-GTACGACTACCACAAGTACTTC-3'	5'-ATAGTACACCTGCCAGACTGT-3'
Drosha	5'-GTGCTGTCCATGCACCAGATT-3'	5'-TGCATAACTCAACTGTGCAGG-3'
Ago1	5' GCACTGCCCATTTGGCAACGAA 3'	5' CATTGCGCCAGCTCACAATGGCT 3'
Ago2	5' CGCGTCCGAAGGCTGCTCTA 3'	5' TGGCTGTGCCTTGTAACGCT 3'
Ago3	5' GGAATTAGACAAGCCAATCAGCA 3'	5' AGGGTGGTCATATCCTTCTGGA 3'
Ago4	5' CTAACAGACTCCCAGCGTGTCA 3'	5' GACTGGCTGGCCGTCTAGTCA 3'
MDR1	5' GGCTCCGATACATGGTTTTCC 3'	5' CCAGTGGTGTGTTTTAGGGTCATC 3'
GAPDH	5' ATGCCATCACTGCCACCCAG 3'	5' CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT 3'

### **3.6 Ensaios de Citotoxicidade**

#### **3.6.1 Avaliação de viabilidade celular através da redução do MTT**

Nesse ensaio, a viabilidade celular é avaliada através da medida da capacidade das células de reduzir o MTT (3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio) a formazan. O formazan é um pigmento insolúvel que é extraído das células e quantificado espectrofotometricamente em  $\lambda=570$  nm. A redução do MTT é catalisada principalmente pelas desidrogenases mitocondriais e também do citoplasma. Portanto, a alteração da função mitocondrial poderá ser detectada através da variação da capacidade de redução do MTT. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24h. O meio foi substituído por diferentes concentrações dos quimioterápicos (vincristina, doxorrubicina, cisplatina e 5-fluoracil) diluídos em meio suplementado. Após 48h de incubação, o meio de tratamento foi removido e foi adicionado meio sem soro contendo o corante MTT (0,5 mg/mL). Após incubação por 2h a 37°C, o meio foi substituído por 100  $\mu$ L de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada poço foi lida no leitor de placas (ELx 800 BIO-TEK) em  $\lambda = 570$  nm. Os valores foram expressos em porcentagem de redução de MTT em relação ao controle, no qual as células não foram expostas aos quimioterápicos.

### **3.6.2 Exclusão por Azul de Tripan**

Nesse ensaio utiliza-se o azul de tripan, que é um corante incapaz de penetrar na membrana celular. Portanto todas as células coradas com o mesmo são consideradas inviáveis pois perderam a integridade de membrana (**Tennant, 1964**).

Foi adicionada uma solução 0,4% de azul de tripan diluído em PBS ao volume de células a ser contado em proporção 1:1. Em seguida 10 $\mu$ L das células gentilmente homogeneizadas com o corante foram aplicados em um hemocítmetro para a contagem do número de células viáveis, excluindo-se as células coradas da contagem.

### **3.7 Análises estatísticas**

A diferença estatística entre grupos foi verificada através de teste t não pareado. Os testes de correlação foram realizados através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. O software GraphPad Prism foi utilizado para tais análises. O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05.

### **3.8 Western Blot**

As células foram coletadas, lavadas com PBS e centrifugadas por 5 min a 14000 rpm. O pellet foi coletado e ressuspenso em tampão de lise 50 mM Tris -HCl [pH 7,4], 1% Tween 20, 0,25% deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM O-

Vanadato, 1 mM NaF, e inibidores de proteases (1 µg/mL de aprotinina, 10 µg/mL de leupeptina e 1 mM 4-(cloridrato de fluoreto aminoetil benzosulfonila)) por 2h em gelo. Os extratos proteicos foram centrifugados e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry. Aos extratos foi adicionado tampão de amostra (2X dodecil sulfato de sódio (SDS), 100 mM Tris-HCl [pH 6,8], 200 mM de ditioneitol (DTT), 4% SDS, 0,1% azul de bromofenol e 20% de glicerol) na proporção 1:1. Os extratos celulares foram resolvidos por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) e transferidos para membranas de PVDF. As membranas foram então bloqueadas em 2,5% de leite desnatado em tampão salino Tris (TBS)-Tween 20 (0,05%) (TBST) e incubados *overnight* a 4°C com anticorpos primários diluído em 1:1000. Após lavagem em TBST, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:5000) por uma hora, sendo então lavadas em TBS. A detecção das bandas foi realizada através de quimioluminescência, expondo as membranas à filmes de raio-X.

### 3.9 Imunoprecipitação

As células foram incubadas com tampão de lise (20 mM HEPES, pH 7.7; 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1% Nonidet-P40, 20 mM p-nitrofenilfosfato, 1mM O-vanadato, 1 mM PMSF, 1mM DTT, 10 µg/mL aprotinina e 10 µg/mL de leupeptina) em gelo por 2 horas. Após centrifugação, o lisado celular foi incubado *overnight* com anticorpo específico para Dicer (anticorpo de camundongo monoclonal Abcam) acoplado à *beads* de A-sepharose a 4°C por 2 horas. As *beads* são então lavadas 3 vezes com tampão de lise e duas

vezes com PBS. Os complexos proteicos ligados foram eluídos (tampão 8 M uréia, 50 mM HEPES) e precipitados com acetona. Uma fração da eluição foi então avaliada por SDS-PAGE.

### 3.10 MudPIT

No experimento de MudPIT (multidimensional protein identification technology), a amostra (complexo de proteínas derivado da imunoprecipitação) foi reduzida, alquilada e tripsinizada, resultando numa mistura complexa de peptídios.

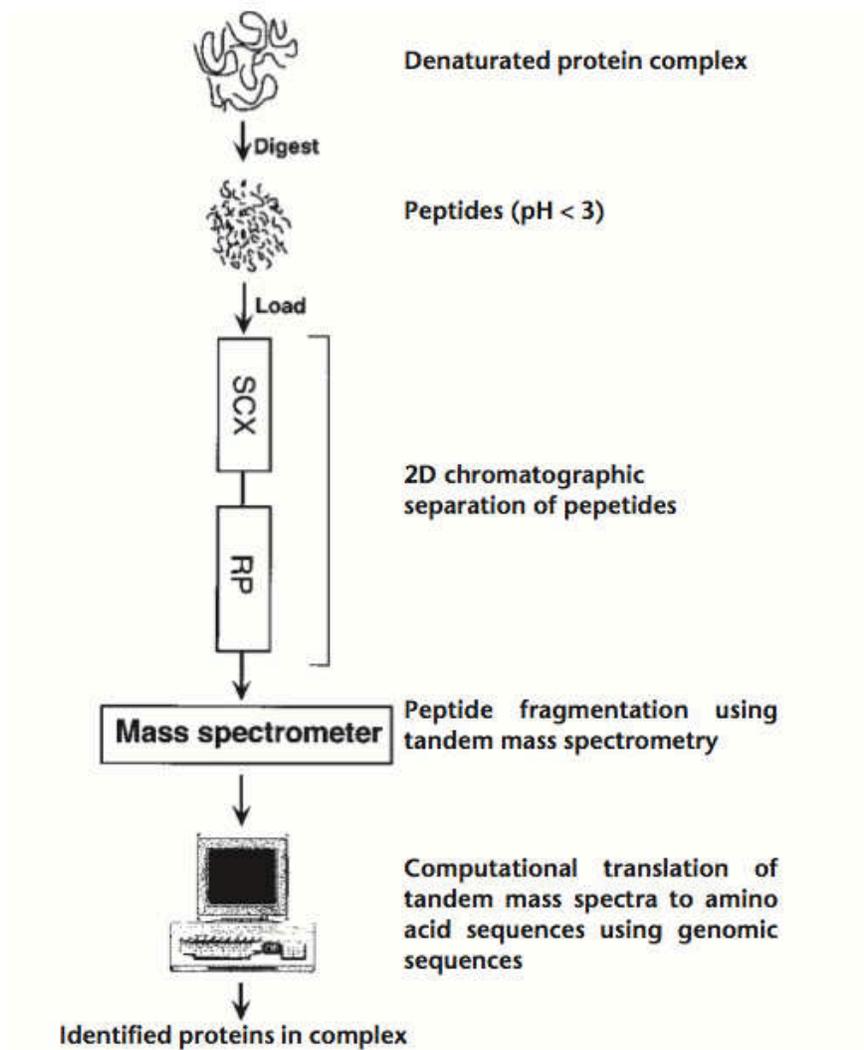
A amostra digerida foi aplicada a uma coluna microcapilar de sílica, contendo aproximadamente 5cm de resina C<sub>18</sub> seguida de 3cm de resina SCX (*strong cation exchange*) e mais 12cm de C<sub>18</sub>, que foi acoplada à uma plataforma adjacente ao espectrômetro de massas. A coluna foi ligada a uma bomba de HPLC (*high-performance liquid chromatography*) que provê tampões diferentes através de um conector T, o que permite que o fluxo do HPLC seja dividido e que fosse mantida uma taxa de 100-300nL/min. Um gerador de voltagem também é diretamente ligado à coluna, ionizando os peptídios à medida que esses foram sendo eluídos.

Uma separação típica utiliza 3 tampões: A (5% acetonitrila (ACN), 0,1% ácido fórmico), B (80% ACN, 0,1% ácido fórmico) e C (acetato de amônio 500mM, 5% ACN, 0,1% ácido fórmico). A coluna microcapilar é primeiramente lavada com o tampão A, sendo em seguida aplicado um seguimento pequeno de tampão C. Esse ciclo é repetido com um aumento na concentração de tampão C a cada etapa. Cada lavagem com tampão C serve

para deslocar uma parte dos peptídeos da resina SCX para a porção de resina hidrofóbica de C<sub>18</sub>. Os peptídeos deslocados foram então separados na resina de C<sub>18</sub> através de um gradiente de fase reversa.

Utilizando essas etapas de separação em ciclos, o controle da concentração do tampão C faz com que peptídeos de ponto isoelétrico similar (pI) sejam sequencialmente deslocados da resina SCX para a resina de C<sub>18</sub>, onde eles foram então separados por tamanho. O processo se realizou em 8 ciclos.

Uma vez que os peptídeos separados foram eluídos da coluna microcapilar, os mesmos sofrem ionização, entrando no espectrômetro de massas, onde foram isolados com base na relação massa/carga ( $m/z$ ). A aquisição dos dados foi realizada no espectrômetro Thermo Scientific LTQ-ETD (*electron transfer dissociation*) usando o software Xcalibur 2.0. Foi então gerado um espectro de massas em tandem, que foi comparado contra um banco de dados de proteínas utilizando o algoritmo ProLucid. Isso permitiu que a sequência do peptídeo fosse definida, bem como sua proteína de origem. Esse algoritmo compara os fragmentos de íons dos peptídeos analisados com a predição de fragmentos derivada de peptídeos de mesmo tamanho no banco de dados, avaliando matematicamente a relevância das comparações (Delahunty e Yates, 2007).



**Figura 3** - Análise de complexos proteicos por MudPIT (Link *et al.*, 1999).

### 3.11 Proteoma SILAC

A técnica SILAC (*stable isotope labeling with amino acids*) foi descrita na literatura em 2002, já existindo na época várias outras maneiras para a análise quantitativa de proteomas (Ong *et al.*, 2002). Um experimento de SILAC em cultura de células é um

método simples e eficiente para avaliar diferenças na expressão de proteínas entre populações de células através de espectrometria de massas. A técnica conta com a incorporação das formas “leve” (ou normal) e “pesada” de um certo aminoácido em proteínas sintetizadas pelas células. No caso, a forma “pesada” consiste em um aminoácido contendo um núcleo isotópico substituído (por exemplo:  $^2\text{H}$  ao invés de  $\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ao invés de  $^{12}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$  no lugar de  $^{14}\text{N}$ ). A incorporação de um aminoácido “pesado” em um peptídeo leva a um aumento conhecido de massa em relação à o peptídeo que contém a versão normal do aminoácido (Mann, 2006).

Num experimento, duas populações de célula são cultivadas em meios de cultura idênticos exceto pelo fato de que um contém a versão “leve” e o outro a versão “pesada” de um aminoácido (por exemplo: lisina  $^{12}\text{C}$  e lisina  $^{13}\text{C}$ , respectivamente). Quando o aminoácido marcado é fornecido no meio no lugar do aminoácido natural, ele é incorporado em todas as novas proteínas sintetizadas. Depois de aproximadamente 5 divisões celulares, todos os aminoácidos naturais são sido substituídos pelo seus isótopos marcados e é efetuada uma análise de eficiência de incorporação. Como não há diferença química significativa entre os dois, as células se comportam exatamente como a população controle, cultivada na presença do aminoácido normal. Para a análise da expressão de proteínas, os lisados das duas populações de células são misturados e o *pool* de proteínas presentes é avaliado por espectrometria e massas. Cada peptídeo encontrado aparece com um par no espectro de massas: o de massa inferior pertencendo à população cultivada com o aminoácido “leve” e o de massa superior à população cultivada com o isótopo “pesado”. Se o par de peptídeos possui uma razão 1/1, pode-se deduzir que não há diferença entre a

expressão das duas populações. Já um pico de intensidade maior do peptídeo “pesado” indica que esse está mais abundante nessa população. A razão das intensidades dos picos encontradas pelo espectômetro de massas corresponde diretamente à razão de expressão do peptídeo entre as duas populações (Mann, 2006).

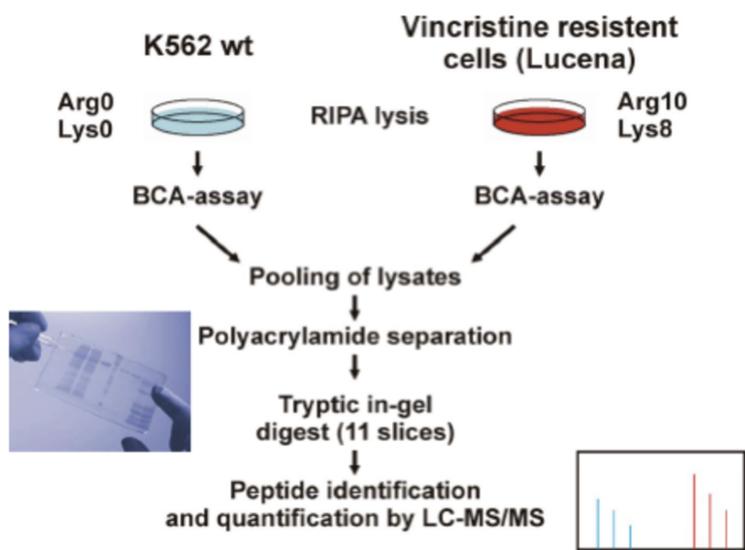
### **3.11.1 Cultivo das células em meio SILAC (cultura de células em aminoácidos com marcação isotópica).**

As células foram cultivadas por 7 dias (4 repiques) em meio contendo arginina e lisina normais e os mesmos aminoácidos marcados isotopicamente: L-arginine (Arg0) and L-lisina (Lys0) (Sigma) ou L-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]arginina (Arg10) and L-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]lisina (Lys8) (Eurisotop). Em seguida, as células foram lisadas por 20 minutos com tampão gelado: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0.1%, EDTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 0.1 µg/ml, NaF 10 mM. Os lisados foram clarificados por centrifugação (16.500 x g) por 15 minutos. A quantidade de proteína foi quantificada pelo método BCA (Pierce). Em seguida os lisados foram misturados na proporção 1:1.

### **3.11.2 Digestão de proteínas em gel**

A mistura das proteínas dos lisados (300 µg) foi separada por SDS-PAGE em géis NuPAGE Novex Bis-Tris (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. O gel foi

corado com Coomassie blue (Colloidal Blue Staining kit - Invitrogen). Em seguida o gel foi cortado em 11 pedaços, e utilizados para digestão em gel como descrito por (Shevchenko *et al.*, 1996). As tiras de gel foram cortadas novamente em cubos e lavados com bicarbonato de amônio 50 mM em etanol 50% até que os mesmos fossem completamente descorados. Os cubos de gel foram desidratados com etanol e reidratados com bicarbonato de amônio 50 mM e DTT 10 mM. As proteínas foram reduzidas por 1h a 65°C. Os grupos tióis livres foram alquilados pela adição de iodoacetamida 55 mM em tampão bicarbonato de amônio 50 mM por 1h a 25 °C, no escuro. Os pedaços do gel foram lavados 2 vezes com bicarbonato de amônio 50 mM e etanol, desidratados com etanol 100% e secos a vácuo. Cada fração do gel foi reidratada com tampão bicarbonato de amônio 50 mM contendo 0,4 µg de tripsina e as amostras incubadas *overnight* a 37 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e os peptídeos residuais extraídos do gel por dupla incubação com acetonitrila (ACN) 30% em ácido trifluoroacético (TFA) 3% e dupla incubação com ACN 100%. Todas as frações foram combinadas e a ACN evaporada. Subseqüentemente as amostras foram desalinizadas em colunas de fase reversa C<sub>18</sub> STAGE Tip (Rappsilber *et al.*, 2003) e os peptídeos eluídos analisados por espectrometria de massas (MS).



**Figura 4** – Esquema de preparação de amostra para identificação e quantificação de peptídeos por cromatografia líquida (LC) e espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS).

### 3.11.3 Análise por espectrometria de massas

Os peptídeos foram separados por cromatografia líquida de fase reversa e identificados por espectrometria de massas *em tandem* (MS/MS) em um nano-eletrospray (Agilent 1100 nanoflow system - Agilent Technologies). As amostras foram injetadas em coluna de fase reversa de 15 cm acoplada a coluna capilar de sílica (diâmetro interno 75  $\mu\text{m}$ , empacotada com 3- $\mu\text{m}$  ReproSil-Pur C<sub>18</sub>-AQ - Dr. Maisch GmbH). O capilar de cromatografia líquida foi conectado ao espectrômetro massas LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) equipado com fonte de íon nanoeletrospray (Proxeon Biosystems). Os peptídeos foram eluídos com gradiente de ACN de 5 a 40% em ácido acético 0,5%. A aquisição dos dados foi realizada no LTQ-Orbitrap usando Xcalibur 2.0 software (Schroeder *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2005).

### 3.11.4 Identificação de peptídeos utilizando MASCOT Search Engine

Os dados do MS foram processados usando os softwares Raw2msm (Olsen et al., 2005) e MASCOT search engine (Version 2.1.0, Matrix Science). Todos os espectros com repetições foram pesquisados no banco de dados de proteínas [International Protein Index (Decoy IPI Version 3.18)] contendo ambas as seqüências *forward* e *reversed*. Além disto, contaminantes como queratina humana e tripsina de porco foram incluídas neste banco de dados. A média da exatidão das massas e o desvio padrão foram 0,80/1,15 ppm para todos os peptídeos medidos com o LTQ-Orbitrap.

### 3.11.5 Análise dos dados de proteoma

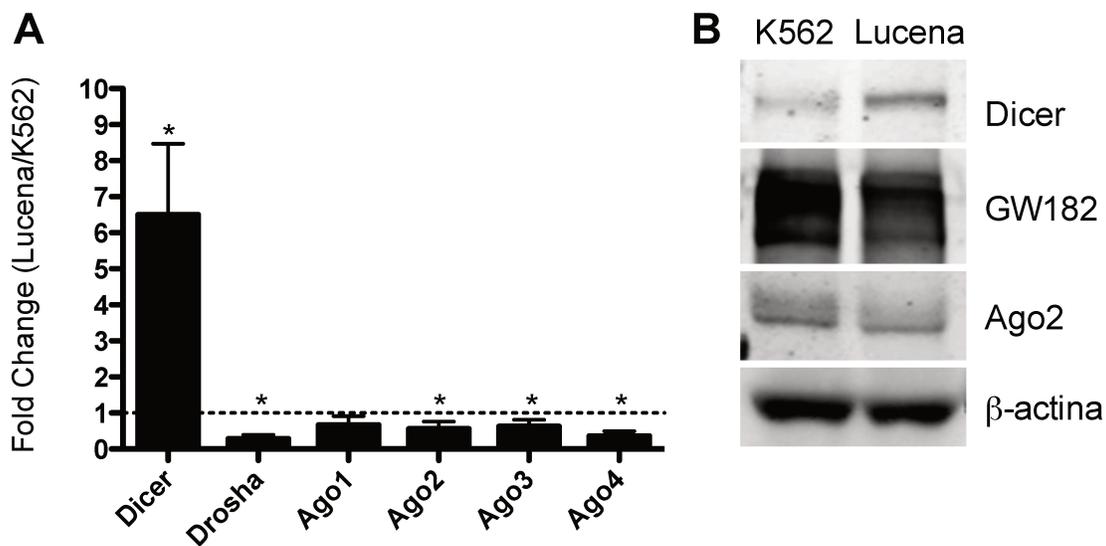
Essa técnica permite a quantificação relativa de proteínas entre as duas linhagens celulares. Foram consideradas proteínas superexpressas as que possuíam um *fold change* maior ou igual a 2 e reprimidas as proteínas que apresentaram *fold change* menor ou igual a 0,5. As proteínas diferencialmente expressas foram analisadas com ajuda do software livre Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003). Foram efetuadas análises de *Gene Ontology* (GO) utilizando a ferramenta online GOrilla (Eden *et al.*, 2009).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Expressão das proteínas envolvidas na biogênese e função de miRNAs nas linhagens leucêmicas K562 e Lucena

Com o intuito de verificar a expressão das proteínas que participam do metabolismo de miRNAs nas linhagens de leucemia mielóide crônica K562 (*wild-type*) e Lucena (resistente à múltiplas drogas), foram realizados qRT-PCRs para Dicer e para outros componentes importantes dessa via: Drosha e Argonautas 1-4. Como observado na Figura 5A, a linhagem Lucena possui cerca de 6 vezes mais mRNA codificante para Dicer em relação à K562. De forma interessante, as outras proteínas envolvidas no processamento e função de miRNAs se encontraram ligeiramente reprimidas, com exceção de AGO1.

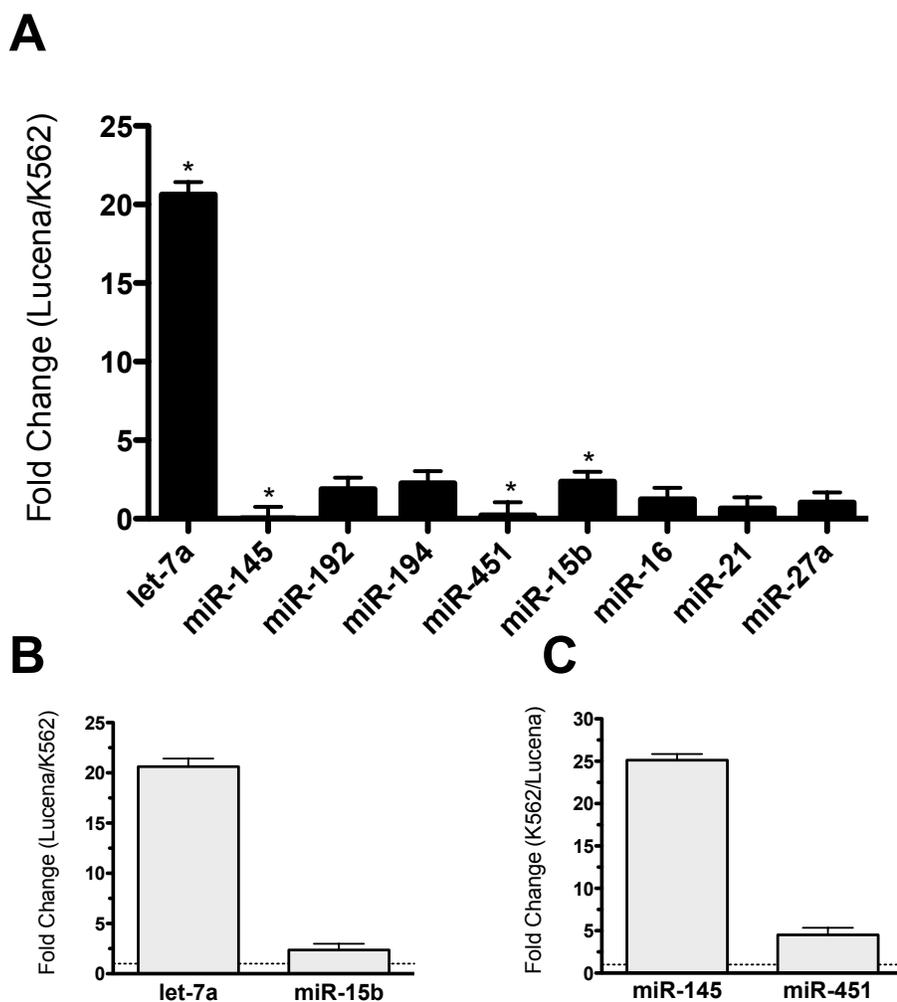
Para verificar se os níveis proteicos de componentes da via metabólica de miRNAs também estavam aumentados, a expressão de Dicer, AGO2 e GW182 foi verificada através de Western Blotting (Figura 5B). GW182 é um importante componente dos P-bodies, onde os complexos mRNA/miRNA/RISC podem ser temporariamente armazenados ou degradados (Parker e Sheth, 2007). Os resultados foram coerentes com o qRT-PCR, mostrando que a Dicer realmente está elevada na linhagem Lucena e que AGO2 e GW182 possuem pouca alteração e parecem ligeiramente menos expressas nessas células.



**Figura 5** - A) Expressão dos mRNAs de Dicer, Drosha e Argonautas na linhagem Lucena em relação à K562, determinada por qRT-PCR. GAPDH foi utilizado como controle endógeno. B) Expressão proteica de Dicer, GW182 e Argonauta 2 em K562 e Lucena, avaliada por Western Blot. A linha pontilhada indica *fold change* igual a 1.

#### 4.2 Expressão de miRNAs nas linhagens leucêmicas K562 e Lucena

Inicialmente comparamos expressão de diversos miRNAs nas linhagens celulares de leucemia mielóide crônica K562 e Lucena (a última exibindo fenótipo MDR). Além dos miRNAs representados na Figura 6, foi também avaliada a expressão dos miRNAs miR-214, miR-215, miR-203, miR-205 e miR-143, que não foram detectados nessas linhagens.



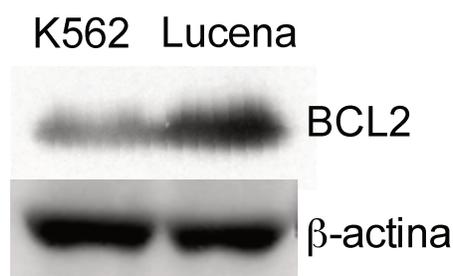
**Figura 6** - Expressão relativa de miRNAs nas linhagens K562 e Lucena, avaliada através de qRT-PCR. A) Expressão de miRNAs na linhagem Lucena (MDR) em relação à linhagem K562. \* $p < 0,05$ . B) miRNAs significativamente aumentados na linhagem Lucena. C) miRNAs significativamente aumentados na linhagem K562. U6snRNA foi utilizado como controle endógeno. A linha pontilhada indica *fold change* igual a 1.

Podemos observar que, dos miRNAs analisados, let-7a e miR-15b estão aumentados na linhagem Lucena. Curiosamente, o miRNA let-7a é na maioria dos casos considerado como um supressor de tumor. Na linhagem A549, de carcinoma pulmonar, a superexpressão de let-7a diminuiu a proliferação dessas células e causou a regulação negativa de múltiplas

proteínas associadas à progressão de ciclo celular (Johnson *et al.*, 2007). Em pacientes com câncer de pulmão, também já foi determinado que o tecido pulmonar normal exibia maiores níveis do miRNA do que o tecido tumoral e que a repressão de let-7a está associada a um pior prognóstico (Johnson *et al.*, 2007). Ras e MYC, conhecidos oncogenes, são alvos de let-7a (Johnson *et al.*, 2007; Sampson *et al.*, 2007). Na linhagem Namalwa (linfoma de Burkitt), a transfecção com let-7a é capaz de reverter o aumento de proliferação causado por MYC (Sampson *et al.*, 2007). O miRNA let-7a também está intimamente associado com a diferenciação celular, já que dois de seus alvos, RAS e HMGA2, são essenciais na renovação celular e manutenção da multipotência (Dröge e Davey, 2008). Shell e colaboradores determinaram que células de câncer mais indiferenciadas (consistindo cânceres mais avançados) expressam menos let-7a que células tumorais mais diferenciadas, sendo este miRNA um importante marcador do estado de diferenciação tumoral (Shell *et al.*, 2007). Entretanto, há evidências recentes de que let-7a também regula a expressão da caspase-3, uma importante mediadora da morte celular. Em células resistentes à doxorrubicina, este miRNA também se encontra superexpresso e sua depleção aumenta a sensibilidade ao tratamento devido à liberação da repressão da caspase-3 (Tsang e Kwok, 2008). Os resultados de Tsang e Kwok corroboram nossos dados e nos proporcionam uma interessante possibilidade de investigação do papel de let-7a na linhagem Lucena.

O miRNA miR-15 também é considerado um supressor de tumor, sendo conhecidamente deletado em pacientes com leucemia linfocítica crônica (Aqeilan *et al.*, 2010). Um importante alvo desse miRNA é BCL2, uma proteína inibidora do processo de apoptose que se encontra aumentada em uma variedade de cânceres humanos (Cimmino *et*

*al.*, 2005). O trabalho de Crimmino e colaboradores mostra que miR-15 induz apoptose em células leucêmicas através da diminuição dos níveis de BCL2. A supressão desse miRNA também já foi relacionada com a regulação do fenótipo MDR de células de carcinoma gástrico devido ao aumento desse seu alvo. Assim, é inesperado que esse miRNA se encontre aumentado na linhagem Lucena. Entretanto, miR-15 (*fold change* = 2,3) não se encontra tão superregulado como let-7a (*fold change* = 20,6). Portanto, este aumento mais modesto de expressão pode não ser suficiente para promover alterações significativas na resistência e morte dessas células ou o mesmo pode ter algum outro alvo ainda não identificado nas células Lucena. Quando avaliamos a expressão de BCL2, um dos possíveis alvos do miR-15, observamos que as células Lucena apresentam maior expressão desta proteína (Figura 7). Este dado sugere que miR-15 provavelmente não está regulando a expressão dessa proteína nessa linhagem, ou essa regulação é ineficiente. Entretanto, é possível que o mesmo miRNA possua funções diversas em diferentes tipos celulares e a totalidade de seus alvos e papéis ainda é desconhecida.



**Figura 7** - Expressão de BCL2 nas linhagens K562 e Lucena avaliada por Western Blot. A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno.

Em relação aos miRNAs miR-145 e miR-451, observamos que os mesmos estão aumentados na linhagem K562, e conseqüentemente reprimidos na linhagem resistente Lucena. O miRNA miR-145 também é amplamente considerado como supressor de tumor, estando reprimido em vários tipos de câncers humanos, como câncer colón retal, de mama, bexiga, linfomas e leucemias (Esquela-Kerscher e Slack, 2006; Akao *et al.*, 2007; Sachdeva *et al.*, 2009; Bandyopadhyay *et al.*, 2010; Ostefeld *et al.*, 2010). É interessante notar que o oncogene MYC, além de ser um alvo de let-7a, também é regulado pelo miR-145. Recentemente, foi reportado que a proteína p53, importante fator de transcrição frequentemente mutado ou deletado em tumores, promove diretamente a transcrição de miR-145, diminuindo assim os níveis de MYC na célula (Sachdeva *et al.*, 2009). Contudo, a linhagem K562 possui uma forma mutada e inativa de p53 (Law *et al.*, 1993), indicando que outros fatores de transcrição devem mediar a produção de miR-145 nas linhagens de leucemia mielóide crônica. Corroborando seu papel de supressor tumoral, ensaios *in vitro* mostram que o aumento da expressão desse miRNA diminui a proliferação de células de câncer de mama e de câncer de cólon (Wang *et al.*, 2009; Gregersen *et al.*, 2010). Assim como let-7a, miR-145 também está envolvido no processo de diferenciação celular, sendo pouco expresso em células indiferenciadas e mais expresso em células diferenciadas, em que reprime importantes reguladores da multipotência e renovação celular como SOX2, OCT4 e KLF4 (Xu *et al.*, 2009). A primeira associação desse miRNA com sensibilidade a drogas foi encontrada muito recentemente e, assim como em nossos dados, miR-145 se mostrou reprimido quando Chen e colaboradores compararam o perfil de expressão de

miRNAs em células MCF7 e ADR (MCF7 selecionada para resistência à doxorubicina) (Chen *et al.*, 2010).

O miRNA-451 já tem sido associado com o processo de resistência celular a quimioterápicos (Kovalchuk *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008). De acordo com nossos resultados, Kovalchuk e colaboradores (2008) também observaram que esse miRNA se encontra reprimido na linhagem ADR. Além disso os autores demonstraram que a transfecção com esse miRNA aumenta a sensibilidade ao quimioterápico, sendo que miR-451 regula diretamente o mRNA do transportador MDR1, bomba responsável pelo efluxo da droga (Kovalchuk *et al.*, 2008). A repressão desse miRNA e o alto nível de expressão de MDR1 (dado mostrado na Figura 13) são dois fatores que a linhagem ADR e Lucena possuem em comum, podendo indicar que o mesmo circuito de regulação envolvendo esses componentes esteja presente em ambas.

#### **4.3 Determinação de possíveis alvos de let-7a e miR-145**

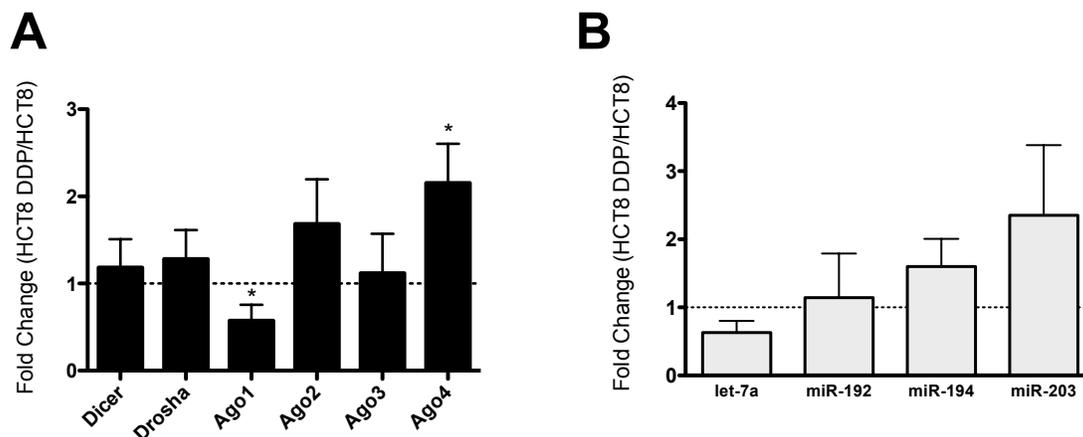
Como let-7a e miR-145 foram os miRNAs que apresentaram maior diferença de expressão entre as linhagens leucêmicas, decidimos investigar alguns de seus possíveis alvos nessas células. Para isso, utilizamos a ferramenta TargetScan ([targetscan.org](http://targetscan.org)), que permite a predição de mRNAs alvos para um determinado miRNA, bem como a predição de miRNAs reguladores para um determinado mRNA. Assim, comparamos a lista de alvos encontrados para let-7a e miR-145 com os dados do proteoma dessas linhagens. Esse cruzamento de dados resultou em uma lista coerente de proteínas (Tabela 3) cuja expressão

possa ser regulada por um desses miRNAs. Já que let-7a se encontra superexpresso em Lucena, é esperado que seus alvos estejam regulados negativamente nessas células. Isso é o que acontece quando observamos os níveis de caspase-3, uma importante protease envolvida na apoptose, cuja expressão está diminuída nas células Lucena com base na análise proteômica. Em relação ao miRNA miR-145, que está reprimido, seus alvos sofrem aumento na expressão, que é o que ocorre com CDK6, uma quinase reguladora do ciclo celular.

**Tabela 3** - Possíveis alvos dos miRNAs let-7a e miR-145 obtidos pela comparação de dados de algoritmo de predição de alvos de miRNAs (TargetScan) com o proteoma de Lucena e K562. FC= *fold change* Lucena/K562 (dados do proteoma).

<b>ALVOS</b>	<b>miRNA</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>FC</b>
CASP3	let-7a	caspase-3; protease envolvida na apoptose	0.70
$\beta$ -integrin	let-7a	integrina; proteína envolvida na adesão celular	0.73
CDC34	let-7a	enzima conjugadora de ubiquitina	0.67
CTSC	let-7a	catepsina-C; protease	0.32
CROP	let-7a	proteína associada a resistência à cisplatina	0.79
CDK6	miR-145	quinase dependente de ciclina; ciclo celular	3.26
AKAP12	miR-145	interage com a aurora kinase	29.28
PPP3CA	miR-145	subunidade catalítica da fosfatase PP2B	1.88
FXR1	miR-145	relaciona à síndrome do X frágil	1.58
ROCK1	miR-145	quinase associada à Rho	1.26
RAB14	miR-145	proteína associada ao oncogene RAS	1.26

#### 4.4 Expressão de miRNAs e de proteínas envolvidas em sua biogênese e função nas linhagens de câncer de cólon HCT8 e HCT8/DDP

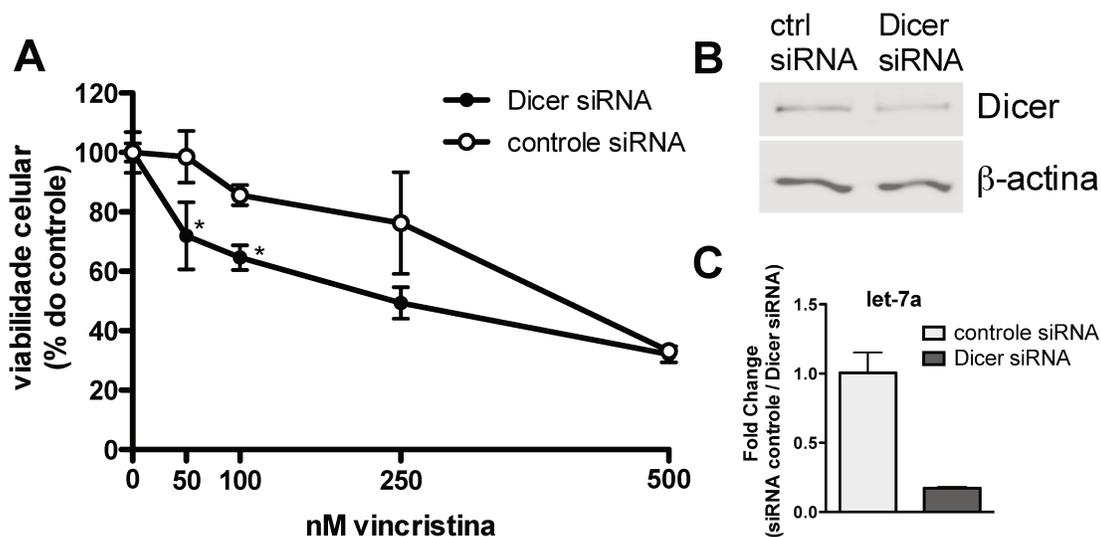


**Figura 8** - A) Expressão dos mRNAs de Dicer, Drosha e Argonautas na linhagem HCT8/DDP em relação à HCT8, determinada por qRT-PCR. GAPDH foi utilizado como controle endógeno. B) Expressão relativa de miRNAs nas linhagens HCT8 e HCT8/DDP, U6snRNA foi utilizado como controle endógeno. \* $p < 0,05$ .

Com o intuito de investigar se os resultados que obtivemos para as linhagens K562 e Lucena se repetiriam em outra linhagem de origem não leucêmica, utilizamos como modelos a linhagem de câncer de cólon (HCT8) e sua derivada com fenótipo resistente (HCT8/DDP) e verificamos a expressão dos mesmos miRNAs e do mRNA das proteínas envolvidas na síntese e função de miRNAs. A superexpressão de Dicer não foi observada na linhagem resistente e apenas 4 miRNAs puderam ser detectados nessas células. No entanto, não apresentaram nenhuma alteração significativa (Figura 8).

#### 4.5 Silenciamento de Dicer na linhagem Lucena

A fim de verificar se a elevada expressão de Dicer na linhagem Lucena de fato tem influência no processo de resistência dessas células, foi realizado o silenciamento desta endonuclease através da técnica de RNA de interferência (RNAi).



**Figura 9** - Silenciamento de Dicer na linhagem Lucena através de transfecção com siRNA. A) Resposta ao quimioterápico vincristina após 48h de transfecção com siRNA para Dicer ou siRNA controle. A viabilidade celular foi verificada 24h após o tratamento através de contagem e exclusão com o corante tripan blue. \* $p < 0,05$  B) Western Blot mostrando a expressão de Dicer 48h após a transfecção. C) Expressão de let-7a após 72h de transfecção.

O silenciamento de Dicer não foi completo e após 48h de transfecção com os siRNAs ainda havia uma quantidade considerável da proteína nas células (Figura 9B). Entretanto, após 72h a expressão do miRNA let-7a caiu para cerca de 10% em relação às células que foram transfectadas com o siRNA controle (Figura 9C). Este resultado sugere

que provavelmente a queda da quantidade de Dicer se deu depois das 48h, uma vez que a deficiência de Dicer diminuiria a síntese de miRNAs.

A sensibilidade das células silenciadas frente à vincristina também foi avaliada. Após 48h de transfecção, as células foram tratadas com o quimioterápico vincristina por 24h, em seguida a viabilidade celular foi determinada pela exclusão por azul de tripan (totalizando 72h da transfecção). O silenciamento de Dicer diminuiu significativamente a sobrevivência ao tratamento com 50 e 100nM do quimioterápico (Figura 9A). Esses resultados mostram que a endonuclease influencia a resistência à vincristina da linhagem Lucena.

A deficiência na produção de miRNAs pode levar à desregulação do nível de proteínas importantes no processo de resistência. Na linhagem de câncer de mama MCF7, foi determinado que o silenciamento de Dicer leva ao aumento da sensibilidade à cisplatina e também diminui a proliferação dessas células, levando à parada na fase G1 do ciclo celular (Bu *et al.*, 2009). Na levedura *Sacharomices pombe*, mutantes para Dicer possuem problemas na segregação de cromossomos e menor taxa de crescimento, sendo também mais sensíveis à droga tiabendazol (Provost *et al.*, 2002). Em células de câncer de boca, a superexpressão de Dicer também foi responsável por aumento na proliferação celular (Jakymiw *et al.*, 2010).

Recentemente, novos papéis para Dicer têm sido descritos. Em *Caenorhabditis elegans*, DCR-1, homóloga da Dicer de mamíferos, é um substrato direto da caspase-3. A clivagem da endonuclease pela caspase-3 impede que a mesma continue a processar

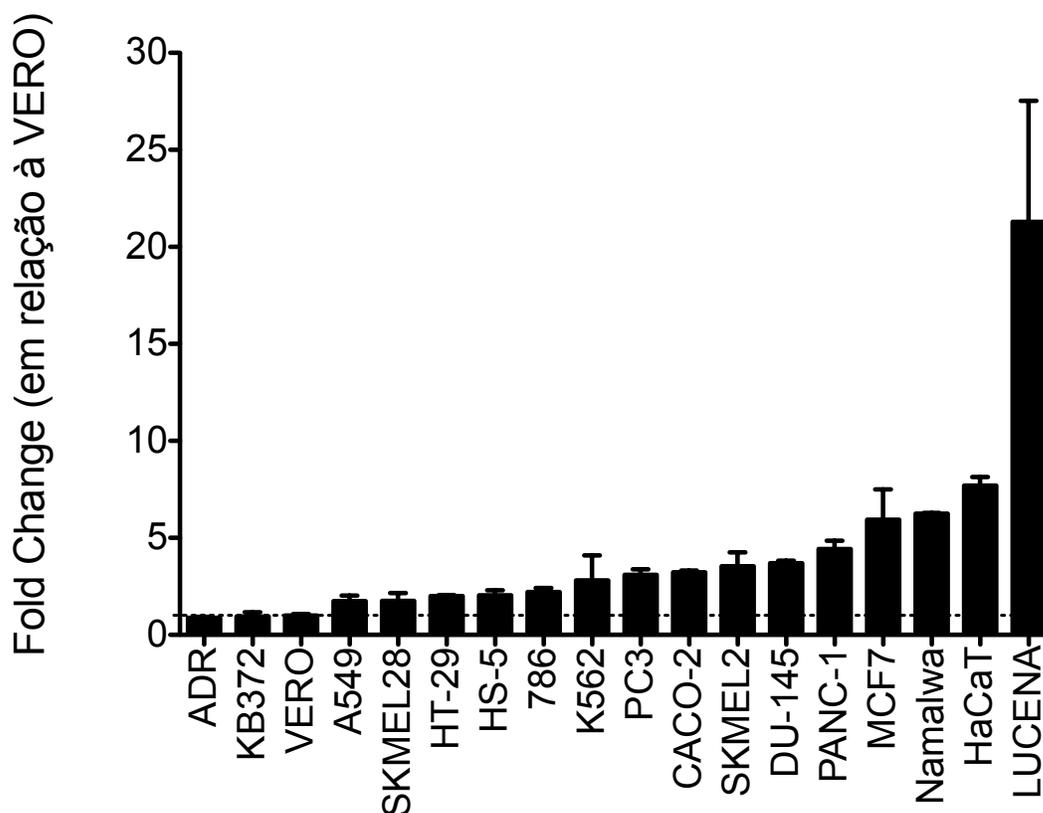
dsRNAs e passe atuar como DNase, mediando a fragmentação do DNA que ocorre na apoptose (Walker, 2010).

Assim, ainda é necessário determinar se a influência de Dicer no processo de resistência se dá devido ao seu papel na síntese de miRNAs ou através de outras funções ainda desconhecidas da proteína. Um mecanismo de ação independente do processamento de miRNAs também justificaria o fato das outras proteínas da via não terem expressão aumentada na linhagem Lucena.

#### **4.6 Triagem da expressão da Dicer e sensibilidade a quimioterápicos em diferentes linhagens celulares**

A fim de verificar se a participação da enzima Dicer na resistência se repete em outros modelos celulares, decidimos efetuar uma triagem em diversas linhagens de células tumorais e normais. Com isso buscamos estabelecer uma possível correlação entre a Dicer e agressividade e resistência tumoral (Tabela 1). Além disso, verificou-se a expressão da bomba de efluxo MDR1, que é um importante componente na resistência a múltiplas drogas.

#### 4.6.1 Análise da expressão da Dicer



**Figura 10** - Expressão de Dicer em diversas linhagens em relação a células Vero, determinada por qRT-PCR. GAPDH foi utilizado como controle endógeno. A linha pontilhada indica fold change igual a 1.

Acima, a Figura 10 mostra os níveis de expressão da endonuclease Dicer em diversas linhagens celulares. É curioso notar que somente não detectamos Dicer na linhagem COS-7. Como foram utilizados primers desenhados com base na sequência humana, foram excluídas do experimento as linhagens provenientes de camundongo. A sequência de Dicer de *Chlorocebus aethiops* (macaco verde) ainda não foi determinada, mas pela maior proximidade evolutiva com a espécie humana mantivemos as duas linhagens provenientes do macaco (COS-7 e Vero) na análise, sendo que só Vero teve o

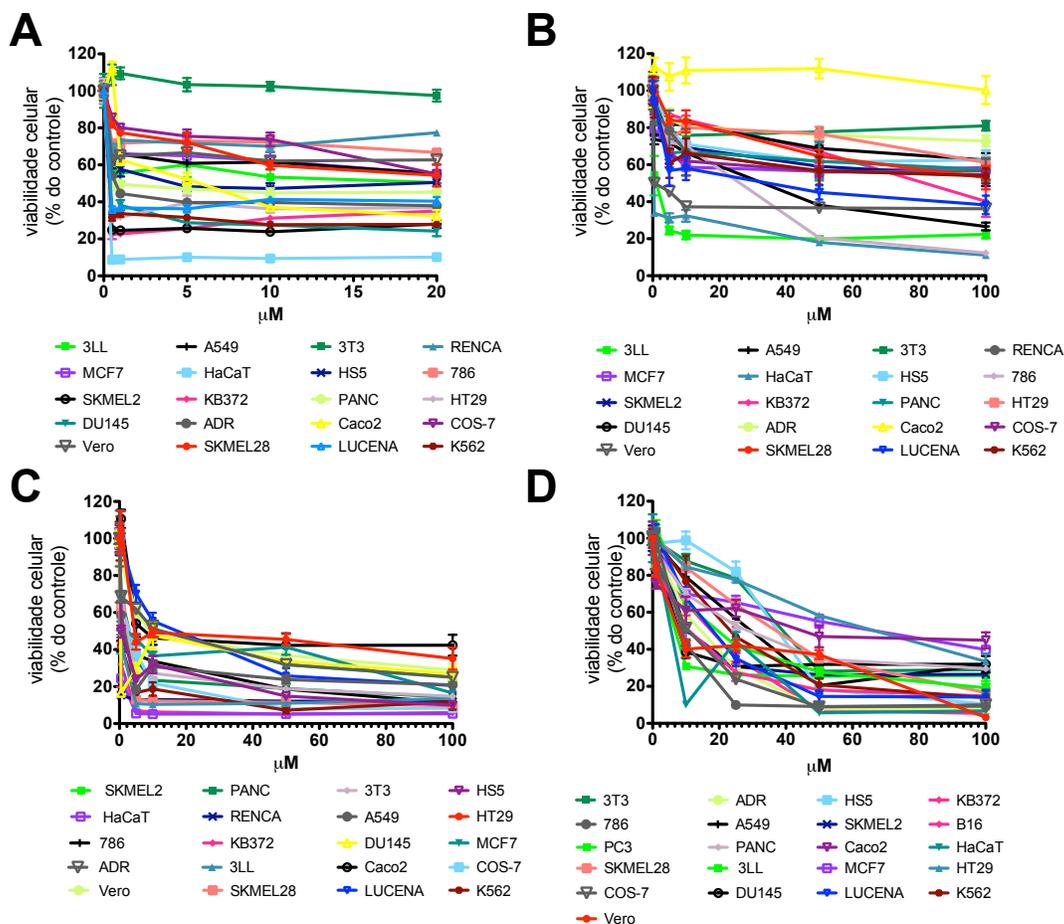
transcrito amplificado. Como COS-7 é frequentemente utilizada para a transfecção com shRNA (que requer a expressão de Dicer para o processamento do *short hairpin* RNA) é provável que essa célula expresse a proteína mas talvez possua alguma mutação que impeça a detecção de seu mRNA pelo par de primers utilizado.

É interessante apontar que, embora as células de câncer de mama resistentes (ADR) e Lucena possam compartilhar a repressão dos miRNAs miR-145 e 451 e também os altos níveis de MDR1, a linhagem de câncer de mama foi a que menos expressou Dicer, enquanto Lucena possui os níveis mais altos de expressão. De fato, o trabalho de Kovalchuk e colaboradores (2008), já mencionava que esta linhagem de câncer de mama exhibe notável repressão da endonuclease frente à sua contraparte MCF7 (células de câncer de mama não resistente). Entretanto, como já mencionado anteriormente, o silenciamento de Dicer nessa mesma linhagem levou a um aumento da sensibilidade ao tratamento (Bu *et al.*, 2009). Essas informações conflitantes mostram que os exatos mecanismos de ação dessa proteína ainda necessitam mais esclarecimento.

As células HaCaT (queratinócitos normais) apresentaram o segundo maior nível de expressão de Dicer. Segundo o nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de que essas células possuem grande quantidade de Dicer, e poucos estudos com miRNAs são encontrados com HaCaT. Outro resultado inédito é de que a linhagem SKMEL2, proveniente de um melanoma metastático, expressou cerca de 2 vezes mais Dicer do que SKMEL28 (melanoma não metastático), indicando que essa proteína possa também estar envolvida no processo de invasão. Alguns miRNAs já foram relacionados com potencial metastático e invasivo de células tumorais (Esquela-Kerscher e Slack, 2006). Existem

relatos na literatura que miR-145 suprime esse potencial (Sachdeva e Mo, 2010) e que outros miRNAs, como miR-21, estão positivamente correlacionados com metástases e malignidade tumoral (Yan *et al.*, 2008). Apesar de alguns trabalhos focarem o papel de certos miRNAs, ainda há poucos estudos que associam a expressão de Dicer nesses processos tumorais. Chiosea e colaboradores encontraram evidências de que Dicer estaria aumentada em tumores de próstata metastáticos em relação à tumores confinados ao órgão (Chiosea *et al.*, 2006), o que estaria de acordo com nossos resultados nas células de melanoma. Esses novos e interessantes dados incentivam investigações futuras sobre os aspectos moleculares do envolvimento da Dicer na malignidade tumoral.

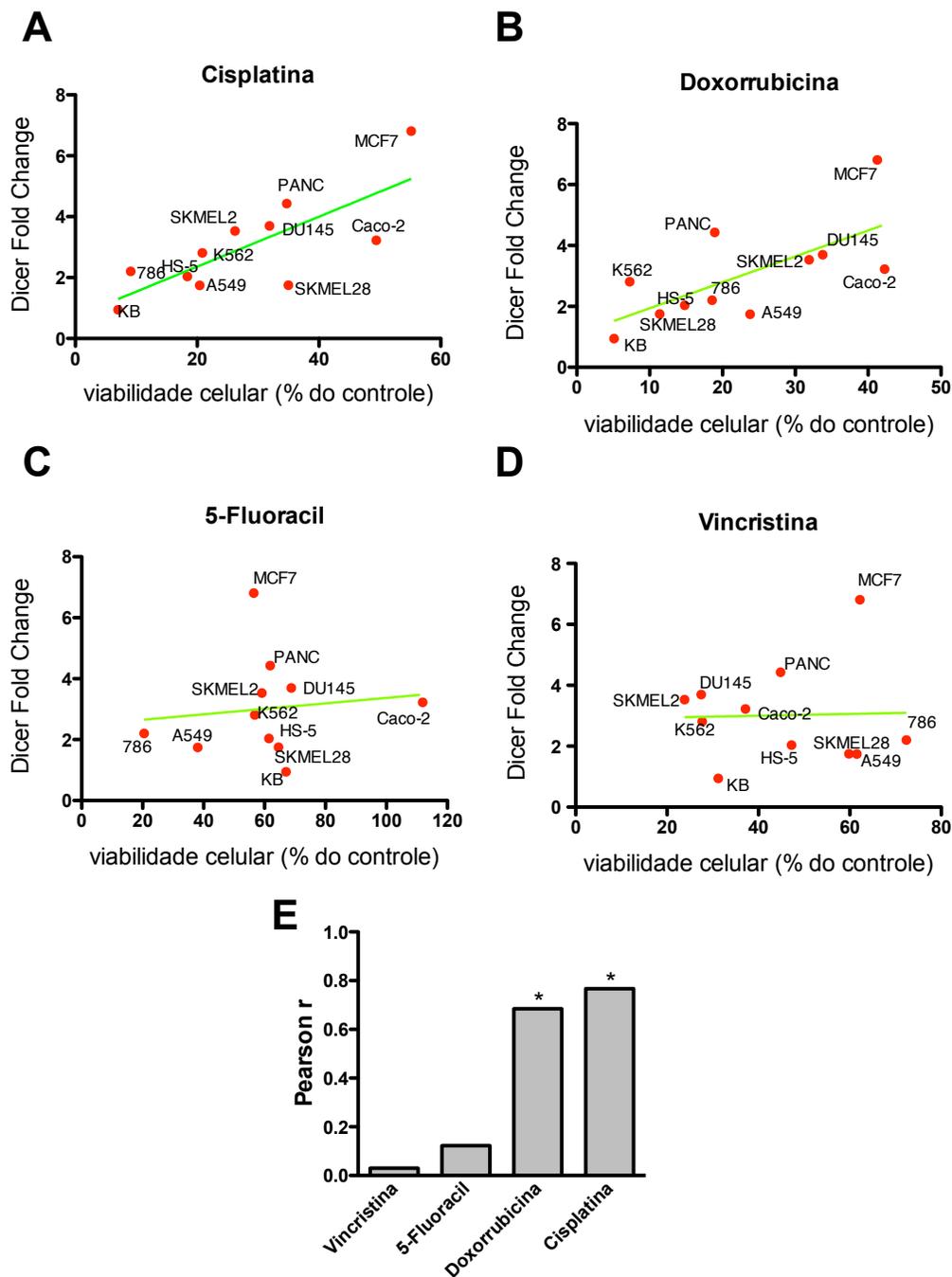
#### 4.6.2 Correlação da resistência a quimioterápicos com a expressão de Dicer



**Figura 11** - Teste de viabilidade celular (redução de MTT) após a incubação por 48h com os quimioterápicos: A) vincristina, B) 5-fluoracil, C) doxorubicina, D) cisplatina.

Para verificar a possibilidade de que o aumento da expressão de Dicer estaria associado com um aumento da resistência a agentes quimioterápicos, foram realizados testes de viabilidade das células tratadas com cisplatina, doxorubicina, vincristina e 5-fluoracil para todas as linhagens (Figura 11) utilizadas no experimento de triagem apresentado no item anterior. Dessa forma, foi possível comparar a sobrevivência das linhagens em relação ao nível de expressão da Dicer (Figura 12).

Para essa análise, foram excluídas as células de camundongo (a expressão da endonuclease não foi avaliada nessas células), e também algumas linhagens que apresentaram comportamento muito diferenciado do restante do grupo. A linhagem HaCaT, de queratinócitos normais, possui metabolismo muito particular e foi extremamente sensível a todos os quimioterápicos. A linhagem ADR, apesar de supostamente apresentar fenótipo MDR e expressar MDR1 em grande quantidade (Figura 13) foi na maioria dos casos menos resistente que sua linhagem parental, MCF7, fazendo com que sua resistência fosse questionada. A linhagem Lucena também teve que ser retirada dos gráficos devido à um problema de escala (a expressão de Dicer é muito superior à de todas as outras células). Assim, permanecemos com um grupo de 11 células, das quais 10 são tumorais e uma (HS-5) é normal.



**Figura 12** - Correlação da expressão de Dicer (fold change em relação à Vero) com a sobrevivência celular ao tratamento com quimioterápicos. A) Tratamento com 50uM de cisplatina por 48h.  $r^2=0,588$ . B) Tratamento com 50uM de doxorubicina por 48h.  $r^2=0,469$ . C) Tratamento com 50uM de 5-fluoracil por 48h.  $r^2=0,015$ . D) Tratamento com 10uM de vincristina por 48h.  $r^2=0,001$ . E) Valor do coeficiente de correlação de Pearson entre a expressão de Dicer e os valores de viabilidade celular \* $p<0,05$ .

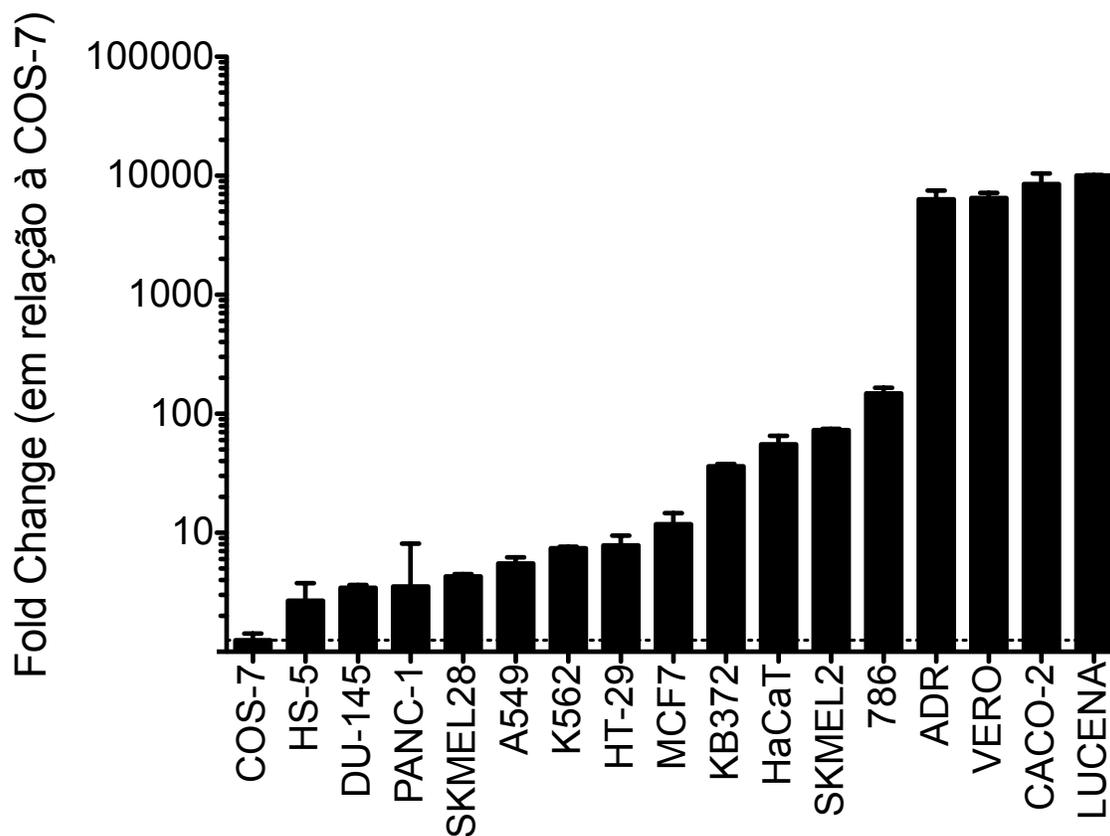
Os resultados dessa análise indicaram que a resistência à cisplatina e doxorubicina possui correlação significativa com os níveis de mRNA da Dicer. Já a vincristina e o 5-fluoracil não apresentaram a mesma correlação. Essa informação corrobora a idéia de que a endonuclease está de alguma forma relacionada com a sobrevivência à esses dois quimioterápicos nesse grupo diverso de células. Experimentos futuros com essas linhagens podem contribuir para a descoberta dos mecanismos que medeiam essa relação ainda pouco esclarecida.

#### 4.6.3 Análise da expressão de MDR1

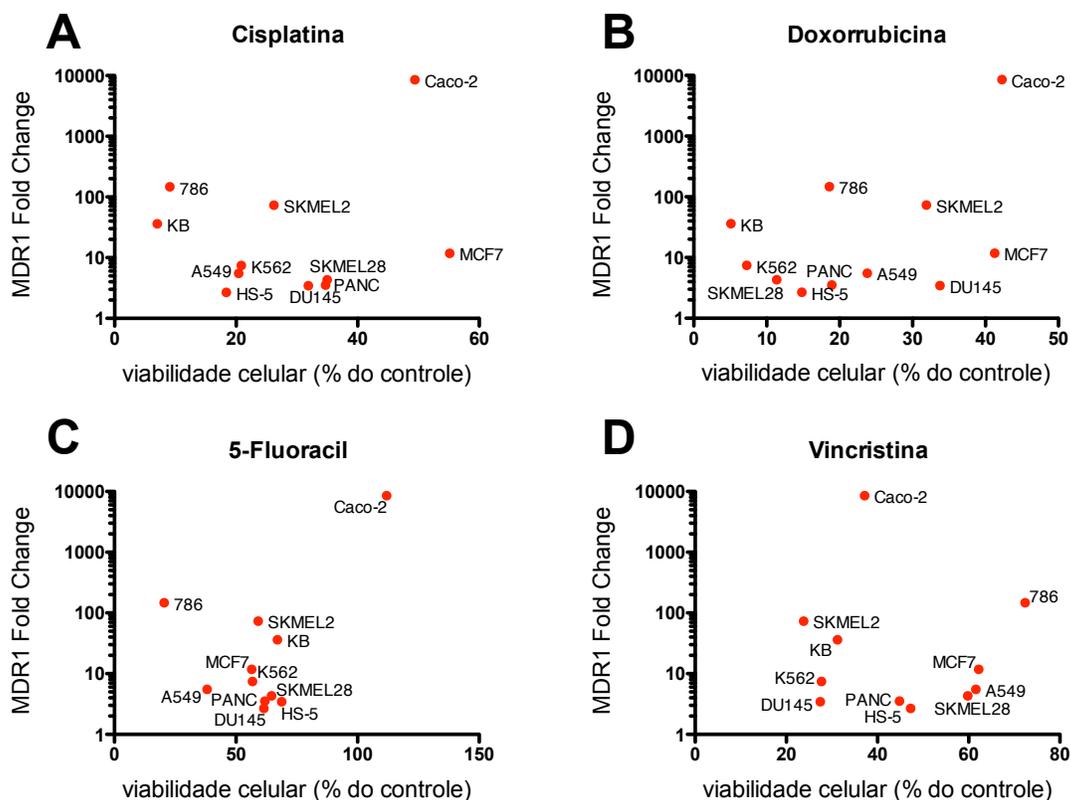
A resistência a múltiplas drogas geralmente envolve a expressão de transportadores de membrana dependentes de ATP com ampla especificidade de substratos. A bomba MDR1 se encontra nessa categoria e é capaz de promover o efluxo de diversas drogas citotóxicas (**Gottesman *et al.*, 2002**). Desse modo, resolvemos analisar a expressão de MDR1 nas linhagens celulares (Figura 13), buscando relações entre o nível da bomba e a resistência à quimioterápicos, bem como alguma associação com a expressão de Dicer (Figura 14).

É interessante notar que quando avaliamos o mesmo grupo de células em relação à correlação da expressão de MDR1 com a viabilidade celular após o tratamento com quimioterápicos (Figura 14), não obtemos nenhuma correlação. O mesmo ocorre quando levamos em conta todas as linhagens avaliadas (dados não mostrados). Outros trabalhos já encontraram correlação positiva entre a expressão da bomba de efluxo e a resistência à

drogas, conseguindo, inclusive, inferir novos possíveis substratos para o transportador (Szakács *et al.*, 2004). Entretanto, nas linhagens que avaliamos, essa relação não aparenta ser tão direta.



**Figura 13** - Expressão de MDR1 em diversas linhagens em relação a células COS-7, determinada por qRT-PCR. Eixo Y está representado em escala Log10 devido à grande diferença apresentada pelo valores de *fold change*. GAPDH foi utilizado como controle endógeno. A linha pontilhada indica *fold change* igual a 1.



**Figura 14** - Correlação da expressão de MDR1 (fold change em relação à COS-7; eixo Y em escala Log10) com a sobrevivência celular ao tratamento com quimioterápicos. A) Tratamento com 50uM de cisplatina por 48h. B) Tratamento com 50uM de doxorubicina por 48h. C) Tratamento com 50uM de 5-fluoracil por 48h. D) Tratamento com 10uM de vincristina por 48h.

#### 4.7 Análise dos ligantes de Dicer por MudPIT

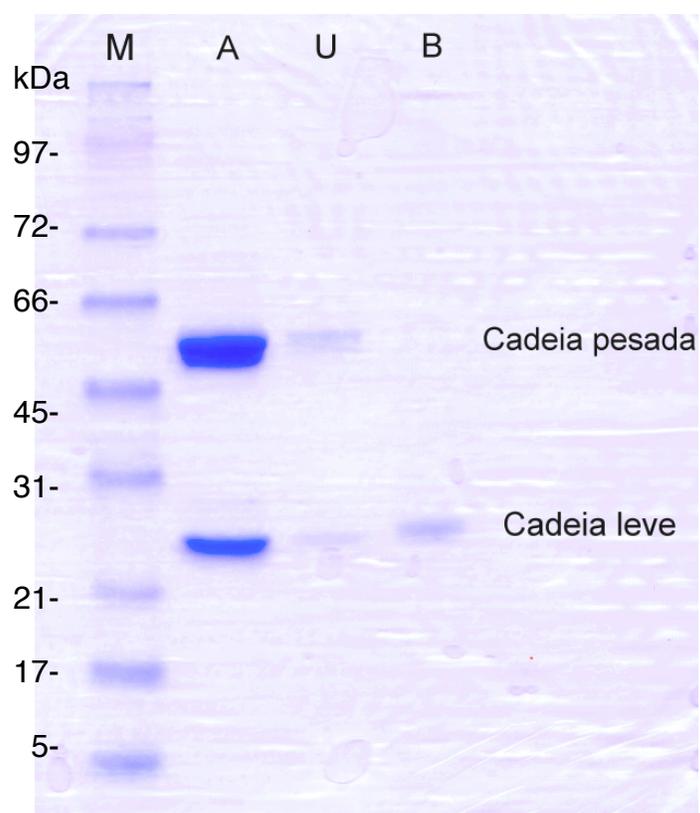
A partir das evidências mostradas acima sobre o envolvimento de Dicer na resistência de células de câncer, especialmente de CML, decidimos analisar os complexos proteicos formados por essa proteína nas células leucêmicas resistentes (Lucena) e não-resistentes (K562).

Como afirmado anteriormente, recentemente têm se descoberto novos papéis para a enzima processadora de miRNAs Dicer. O fato de que as outras proteínas da via de biogênese de miRNAs não estão superexpressas na linhagem resistente Lucena, nos fez indagar se o papel de Dicer na resistência está ou não relacionado com a sua função tradicional. Ao identificar os ligantes dessa proteína nas duas linhagens, nós encontramos diversas novas interações que são encontradas exclusivamente na linhagem Lucena. Os dados discutidos a seguir indicam que Dicer provavelmente possui diversas funções não necessariamente relacionadas com o metabolismo de miRNAs nessas células resistentes.

A técnica de MudPIT (*multidimensional protein identification technology*), que foi desenvolvida no laboratório do Prof. John Yates III (The Scripps Research Institute, San Diego, CA), já foi utilizada para investigar o nicho bioquímico da enzima de *C. elegans* DCR-1, homóloga à Dicer humana (Delahunty e Yates, 2007). A técnica alia a cromatografia líquida em duas dimensões e espectrometria de massas em tandem para identificação de peptídios em misturas complexas. No caso da análise de ligantes, os complexos proteicos são imunoprecipitados com anticorpo específico e passam por digestão enzimática antes de serem analisados por MudPIT. A técnica está ilustrada na Figura 6 (Link *et al.*, 1999).

### 4.7.1 Imunoprecipitação

Para que pudéssemos efetuar a imunoprecipitação, foi realizado o acoplamento do anticorpo anti-Dicer às *beads* de A-sepharose. A reação foi bem sucedida, como visto na Figura 15.



**Figura 15** - Gel de poliacrilamida mostrando o acoplamento do anticorpo contra Dicer às beads de A-sepharose. M: marcador de peso molecular; A: anticorpo puro; U: anticorpo que não foi incorporado às beads; B: anticorpo acoplado às beads (não vemos a cadeia pesada pois essa ainda está associada às beads, enquanto a leve se dissocia quando a amostra é desnaturada).

As *beads* acopladas ao anticorpo anti-Dicer foram então utilizadas para a imunoprecipitação da proteína. Cada extrato proteico utilizado na imunoprecipitação foi gerado a partir de 600mL de cultura (aproximadamente  $20 \times 10^7$  células). O imunoprecipitado foi então tratado e digerido (como descrito anteriormente) e então carregado na coluna microcapilar de sílica. Em seguida, a amostra passou pelas etapas de separação dos peptídeos por cromatografia líquida e análise de massas num espectômetro LTQ-ETD. As imunoprecipitações foram bem sucedidas, tendo sempre a proteína Dicer como o componente mais abundante da amostra.

#### **4.7.2 Análise das interações de Dicer nas linhagens leucêmicas K562 e Lucena**

No resultado da análise dos dados obtidos na espectrometria de massas, observamos que interações já descritas da enzima Dicer foram identificadas em nossos experimentos. Isso proporciona segurança no método, que de fato foi capaz de preservar os complexos proteicos. Entretanto, juntamente com as proteínas deslocadas por estarem associadas à complexos contendo Dicer, também são identificadas muitas outras, que se associam inespecificamente às *beads*. Para minizar esse “ruído” na análise, em cada experimento foi feito um controle com *beads* desacopladas. As proteínas encontradas em um ou mais controles foram excluídas de todas as análises. Para reduzir ainda mais o risco de identificar ligantes inespecíficos, foram selecionadas somente as proteínas que aparecem em pelo menos dois experimentos distintos (as imunoprecipitações foram efetuadas em triplicata). As proteínas que se ajustam à esses critérios estão descritas na Tabela 4.

As proteínas TARBP2, AGO1, AGO2 são alguns exemplos de interações já conhecidas que identificamos em nossos resultados. TARBP2 é o ligante mais abundante nas amostras, o que é condizente com seu papel fundamental no complexo de processamento de miRNAs do qual Dicer participa (Haase *et al.*, 2005; Kok *et al.*, 2007). Já as Argonautas 1 e 2 fazem parte do complexo efetor RISC (RNA-induced silencing complex) que é transientemente associado com a proteína Dicer para que haja o acoplamento do miRNA recém maturado ao complexo que irá atuar silenciando os mRNAs alvos (Liu *et al.*, 2004; Filipowicz, 2005; MacRae *et al.*, 2008). Isso também é condizente com a baixa abundância de AGO1 e AGO2 nos imunoprecipitados, o que fez com que as mesmas não aparecessem consistentemente nas análises (por isso não estão listadas na Tabela 4).

Alguns ligantes inesperados foram identificados nas análises, como as proteínas mitocondriais ODPX (*Pyruvate dehydrogenase protein X component*) e RPOM (*DNA-directed RNA polymerase*), ambas presentes em todas as imunoprecipitações. Assim como GCDH (*Glutaryl-CoA dehydrogenase*), exclusiva da linhagem Lucena. Curiosamente, a endonuclease Dicer - que é predominantemente citoplasmática e em certos casos nuclear (Verdel, 2004) - nunca foi encontrada na mitocôndria. Isso levanta a possibilidade de investigar se esses ligantes ou a própria Dicer estariam sendo transportados para fora de seus nichos habituais nessas células leucêmicas. Mais estudos também são necessários para desvendar o papel dessas interações, já que essa é a primeira vez que são reportadas.

Interessantemente, encontramos 10 proteínas que consistentemente interagem com a Dicer somente na linhagem resistente Lucena (Tabela 4). A descoberta da identidade dessas

proteínas pode nos dar mais informações sobre o papel da endonuclease no fenótipo MDR dessas células. Entre elas está o peptídeo DCD (Dermcidin), que foi primeiramente descoberto como um peptídeo antimicrobiano produzido pelas glândulas sudoríparas humanas (Schitteck *et al.*, 2001). Entretanto, controlar a flora microbiana da pele não é sua única função já que, desde então, o efeito positivo do peptídeo sobre a sobrevivência e proliferação de células tumorais já foi demonstrado em câncer de mama, fígado e próstata (Stewart *et al.*, 2008). Em células de câncer de próstata, determinou-se que a transfecção com DCD aumenta em mais de 50% a sobrevivência em condições de hipóxia ou estresse oxidativo (Stewart *et al.*, 2007). Outro estudo recente mostra que em uma linhagem de câncer de mama que superexpressa DCD, a expressão de fatores de crescimento e de proteínas envolvidas na resposta anti-oxidante é controlada pelo peptídeo (Moreira *et al.*, 2008). Assim, infere-se que a regulação desses mecanismos por DCD tem o objetivo de proteger as células tumorais dos efeitos tóxicos causados por espécies reativas de oxigênio, já que essas são intensamente produzidas devido ao aumento do metabolismo que ocorre no câncer. No caso da linhagem resistente Lucena, os mecanismos de expulsão e processamento de drogas (responsáveis pelo fenótipo MDR) também podem gerar estresse oxidativo. Como DCD interage com Dicer nessas células, a endonuclease pode estar de alguma forma contribuindo para a ação protetora do peptídeo e conseqüentemente para a sobrevivência das células à ação de drogas.

No grupo de proteínas que interage com Dicer na linhagem Lucena, encontramos também a proteína POFB1 (*Premature ovarian failure B1*). Suspeita-se que essa proteína possa estar relacionada com a perda de função dos ovários em mulheres de menos de 40

anos, condição que resulta no adiantamento da menopausa (Goswami e Conway, 2005; Rizzolio *et al.*, 2006). Entretanto, ainda não há evidências conclusivas disso e não se sabe exatamente sua função ou sua relação com a doença (Lacombe *et al.*, 2006; Rizzolio *et al.*, 2006). Em 2006, Lacombe e colaboradores determinaram que a proteína se liga à actina, sugerindo similaridades entre POF1B e a miosina humana. Os autores propõe que POF1B pode estar agindo no pareamento de cromossomos mitóticos ou na regulação da apoptose, embora mais estudos sejam necessários para esclarecer seu funcionamento (Lacombe *et al.*, 2006).

Outra interação interessante que a proteína Dicer estabelece nas células resistentes é com a proteína ribossomal P1 (*60S acidic ribosomal protein ou RPLP1*). Essa proteína é parte de um complexo de 3 proteínas fosforiladas (P0, P1 e P2) que integra a maior subunidade ribossomal dos eucariotos (60S) (Rich e Steitz, 1987). Recentemente, têm se especulado um papel dessa proteína em processos tumorais. Em 2005 foi reportado que a proteína P1 foi capaz de impedir a senescência e estimular a proliferação celular em fibroblastos de camundongo (Artero-Castro *et al.*, 2009). Também é interessante ressaltar que a proteína P0 (integrante do complexo de P1) se encontra superexpressa em células tumorais gástricas resistentes à vincristina (Yang *et al.*, 2006) e em câncer de mama resistente ao tamoxifeno (Besada *et al.*, 2006).

A associação de Dicer com subunidades ribossomais é um tema recente e controverso na literatura. Chendrimada e colaboradores reportaram que proteínas da subunidade ribossomal 60S estavam associadas ao complexo AGO2-Dicer-TARBP2 (Chendrimada *et al.*, 2007). O trabalho propõe um mecanismo alternativo para a ação

repressora dos miRNAs através de interações que impediriam a associação da subunidade ribossomal 60S ao complexo de tradução, impossibilitando a produção de proteína a partir do mRNA alvo. Entretanto, as conclusões do estudo de Chendrimada não são inteiramente aceitas na literatura (Filipowicz *et al.*, 2008) e mais evidências são necessárias para o esclarecimento dessa questão. Já outros trabalhos recentes mostram que Dicer se associa a cromatina do DNA ribossômico durante a mitose de células humanas (Sinkkonen *et al.*, 2010), além de também possuir um envolvimento no processamento de RNA ribossômico (Liang e Crooke, 2011).

Dentre os ligantes exclusivos da linhagem Lucena, foram encontradas duas interessantes proteínas: a HSD17B12 (*Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12*), ou 17 $\beta$ -HSD para futuras referências, e SPF27 (*Pre-mRNA-splicing factor SPF27*). Já foi mostrado que 17 $\beta$ -HSD participa de processos de alongação de ácidos graxos e da biossíntese de estradiol (Mindnich *et al.*, 2004). Sua expressão em pacientes com câncer de mama foi relacionada com piores prognósticos e seu silenciamento *in vitro* resultou em inibição do crescimento das células utilizadas. A proliferação das células de câncer de mama foi restaurado pela adição de ácido araquidônico, que é precursor de diversos ácidos graxos e o hormônios esteróides (Nagasaki *et al.*, 2009). Já SPF27 também é superexpressa em câncer de mama (Maass *et al.*, 2002), sendo identificada com uma proteína que co-purifica com a maquinaria de *splicing*, que remove íntrons de pre-mRNAs recém sintetizados no núcleo (Neubauer *et al.*, 1998). Apesar disso, seu papel no processamento de mRNAs ainda é não é claro e, em 2005, Qi e colaboradores demonstraram outra função para SPF27. Essa proteína é capaz de interagir com um receptor de estrogênio (ER) e intensificar sua atividade como

fator de transcrição em resposta ao hormônio, o que causaria a progressão do câncer (Qi *et al.*, 2005). A interação de Dicer com proteínas que estariam envolvidas no metabolismo de lipídios e ação de hormônios esteróides é muito interessante, já que essas vias estão evidenciadas na linhagem Lucena, sendo possivelmente capazes de promover o fenótipo resistente, como discutido nos próximos itens.

Muitas das proteínas encontradas na Tabela 4 são relativamente desconhecidas, dificultando a inferência de possíveis mecanismos que possam ser resultado de sua interação com a endonuclease. Esse fato demonstra que ainda há muito a se investigar em relação à Dicer, que ao que indica, exerce papéis que muito se estendem à sua função de processamento de miRNAs.

**Tabela 4** - Proteínas que participam de complexos com Dicer nas células K562 e Lucena. A média de peptídios identificados se refere às triplicatas ou duplicadas (todas as proteínas relatadas nessa tabela foram identificadas em pelo menos 2 experimentos distintos).

**INTERAÇÕES IDENTIFICADAS SOMENTE NA LINHAGEM LUCENA**

<b>Descrição</b>	<b>Gene</b>	<b>Identificador da proteína</b>	<b>Média de peptídios detectados</b>
Protein POF1B	POF1B	sp Q8WVV4 POF1B_HUMAN	5.5
Calmodulin-like protein 5	CALML5	sp Q9NZT1 CALL5_HUMAN	3.3
60S acidic ribosomal protein	RPLP1	sp P05386 RLA1_HUMAN	3.0
Ig kappa chain C region	IGKC	sp P01834 IGKC_HUMAN	2.5
Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	GCDH	sp Q92947 GCDH_HUMAN	2.5
Testis-expressed sequence 10 protein	TEX10	sp Q9NXF1 TEX10_HUMAN	2.5
G patch domain-containing protein 4	GPATCH4	sp Q5T3I0 GPTC4_HUMAN	2.5
Dermcidin	DCD	sp P81605 DCD_HUMAN	2.3
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12	HSD17B12	sp Q53GQ0 DHB12_HUMAN	2.0
Pre-mRNA-splicing factor SPF27	BCAS2	sp O75934 SPF27_HUMAN	2.0

**INTERAÇÕES IDENTIFICADAS SOMENTE NA LINHAGEM K562**

<b>Descrição</b>	<b>Gene</b>	<b>Identificador da proteína</b>	<b>Média de peptídios detectados</b>
Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a	FCGR2A	sp P12318 FCG2A_HUMAN	6.5
Uncharacterized protein C21orf70 OS=Homo sapiens	C21orf70	sp Q9NSI2 CU070_HUMAN	2.5

**INTERAÇÕES IDENTIFICADAS EM TODAS AS IMUNOPRECIPITAÇÕES**

<b>Descrição</b>	<b>Gene</b>	<b>Identificador da proteína</b>	<b>Média de peptídios detectados</b>
Endoribonuclease Dicer	DICER1	sp Q9UPY3 DICER_HUMAN	109.6
RISC-loading complex subunit TARBP2	TARBP2	sp Q15633 TRBP2_HUMAN	20.4
Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	PDHX	sp O00330 ODPX_HUMAN	10
DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial	POLRMT	sp O00411 RPOM_HUMAN	9.2
Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2	STAU2	sp Q9NUL3 STAU2_HUMAN	5

#### 4.8 Análise do Proteoma

Os dados apresentados até esse momento ressaltam o quanto ainda há de se estudar sobre mecanismo de resistência desenvolvido nessas células leucêmicas. Assim, buscando maiores informações sobre o que está ocorrendo num plano global e como esses processos se relacionam com os mecanismos já inferidos nesse trabalho, nos voltamos para a análise proteômica das duas linhagens leucêmicas.

A análise do proteoma das células de CML revelou 230 proteínas se encontram diferencialmente expressas entre as duas linhagens. As análises tem como base a quantificação das proteínas da linhagem resistente Lucena em relação à linhagem K562. Nas células resistentes, 123 proteínas estão superexpressas (*fold change* maior ou igual a 2) e 107 proteínas estão reprimidas (*fold change* menor ou igual a 0,5).

Para melhor compreender os mecanismos afetados na aquisição de resistência pela linhagem Lucena, as proteínas diferencialmente expressas foram analisadas com ajuda do software livre Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003). Também foram efetuadas análises de *Gene Ontology* (GO) utilizando a ferramenta online GOrilla (Eden *et al.*, 2009).

No panorama geral, fica claro que diversos processos estão atuando em conjunção para garantir a resistência das células Lucena. Os dados mostram que está havendo um intenso remodelamento estrutural nessas células, sendo que várias proteínas relacionadas ao citoesqueleto estão diferencialmente reguladas. Isso pode sinalizar uma reação à ação inibitória da vincristina sobre a polimerização de microtúbulos. Também é marcante que

nessas células, estejam elevados os níveis de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos, em especial colesterol e hormônios esteróides.

#### 4.8.1 Metabolismo de lipídios está aumentado em células resistentes (Lucena)

**Tabela 5** - Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos que se encontram positivamente reguladas na linhagem Lucena (FC = *fold change* da expressão na Lucena em relação à K562).

Gene	Uniprot ID	Proteína	FC	Localização celular
AKR1C3	A8K2V0	Aldo-keto reductase family 1 member C3	8.11	citoplasma
AKR1C2	P52895	Aldo-keto reductase family 1 member C2	6.35	citoplasma
STAR	P49675	Steroidogenic acute regulatory protein	5.78	mitocôndria
PMVK	Q15126	Phosphomevalonate kinase	3.52	peroxissomo
FABP5	Q01469	Fatty acid-binding protein	3.13	citoplasma
CYP51A1	Q16850	Cytochrome P450 51A1	2.85	retículo endoplasmático
ACSM3	Q53FZ2	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3	2.80	mitocôndria
LTA4H	P09960	Leukotriene A-4 hydrolase	2.51	citoplasma
DECR1	Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase	2.31	mitocôndria
DHCR24	Q15392	24-dehydrocholesterol reductase	2.00	retículo endoplasmático

A resistência a múltiplas drogas geralmente envolve a expressão de transportadores de membrana dependentes de ATP com ampla especificidade de substratos. A bomba MDR1 se encontra nessa categoria e é capaz de promover o efluxo de diversas drogas citotóxicas (Gottesman *et al.*, 2002). É conhecido que a proteína MDR1 (que é superexpressa na Lucena) possui uma relação com *lipid rafts* e colesterol (Orlowski *et al.*, 2006). Nas células Lucena, várias proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios se encontram significativamente aumentadas (Tabela 5). Sendo assim, é possível que um aumento no metabolismo de lipídios esteja relacionado com maior expressão e atividade de MDR1. Em células de leucemia linfoblástica aguda, a atividade de ATPase de MDR1

(essencial para a o transporte ativo de quimioterápicos) caiu em aproximadamente 50% após a depleção de colesterol nas membranas. A reposição do mesmo foi capaz de reverter os efeitos inibitórios (Gayet *et al.*, 2005). Efeitos similares da depleção de colesterol sobre MDR1 foram identificados também em células de hamster com fenótipo MDR (DC3F/ADX) e em células de inseto transfectadas com MDR1 (Garrigues *et al.*, 2002). Além de regular a atividade de MDR1, o colesterol pode também afetar a expressão desse transportador. Em macrófagos humanos, a depleção de colesterol resultou na diminuição dos níveis de MDR1 e a suplementação do lipídio aumentou a expressão da proteína (Klucken *et al.*, 2000). O efeito do colesterol sobre MDR1 pode se dar diretamente através da influência sobre a atividade do transportador (atuando como substrato ou co-substrato) e/ou indiretamente pela alteração da composição da membrana plasmática. Atualmente existem evidências para ambas hipóteses, indicando que ambas possam estar ocorrendo em células resistentes (Orlowski *et al.*, 2006).

Hormônios esteróides também podem estar envolvidos no aumento da expressão de MDR1 (Altuvia *et al.*, 1993) e de outras proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios e detoxificação celular como o citocromo P450, também superexpresso (*fold change* =2,85) nas linhagem Lucena (Tabela 5). A proteína STAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), que está mais de 5 vezes aumentada nas células resistentes, media a importação de colesterol para a mitocôndria e é uma importante reguladora da biogênese de hormônios esteróides (Stocco, 2001; Miller, 2007). De acordo, as alfaceto redutases AKR1C2 (*fold change* =8,11) e AKR1C3 (*fold change*=6,35) participam tanto da síntese de esteróides

quanto de processos de detoxificação celular (Bains *et al.*, 2010), estando fortemente reguladas na linhagem resistente.

Já foram descritos mecanismos por quais compostos esteróides foram capazes de estimular a expressão de enzimas envolvidas no efluxo e catabolismo de drogas (Blumberg *et al.*, 1998; Synold *et al.*, 2001). Assim, com base nos dados obtidos, propomos então um modelo onde a linhagem Lucena utiliza da síntese de colesterol e de hormônios esteróides para estimular a produção e atividade de MDR1 e de vias de detoxicação celular.

#### **4.8.2 Remodelamento do citoesqueleto nas células resistentes**

Agentes que interferem na rede de microtúbulos da célula são frequentemente utilizados na terapia contra o câncer (Hadfield *et al.*, 2003), um exemplo é a vincristina que interage com a tubulina e causa despolimerização dos microtúbulos (Himes *et al.*, 1976). Já que esses filamentos são essenciais para processos vitais da célula e também para a divisão celular, o impedimento da polimerização acaba causando a morte das células afetadas (Wang *et al.*, 1999).

**Tabela 6** - Proteínas relacionadas ao citoesqueleto positivamente reguladas na linhagem Lucena (FC = fold change da expressão na Lucena em relação à K562).

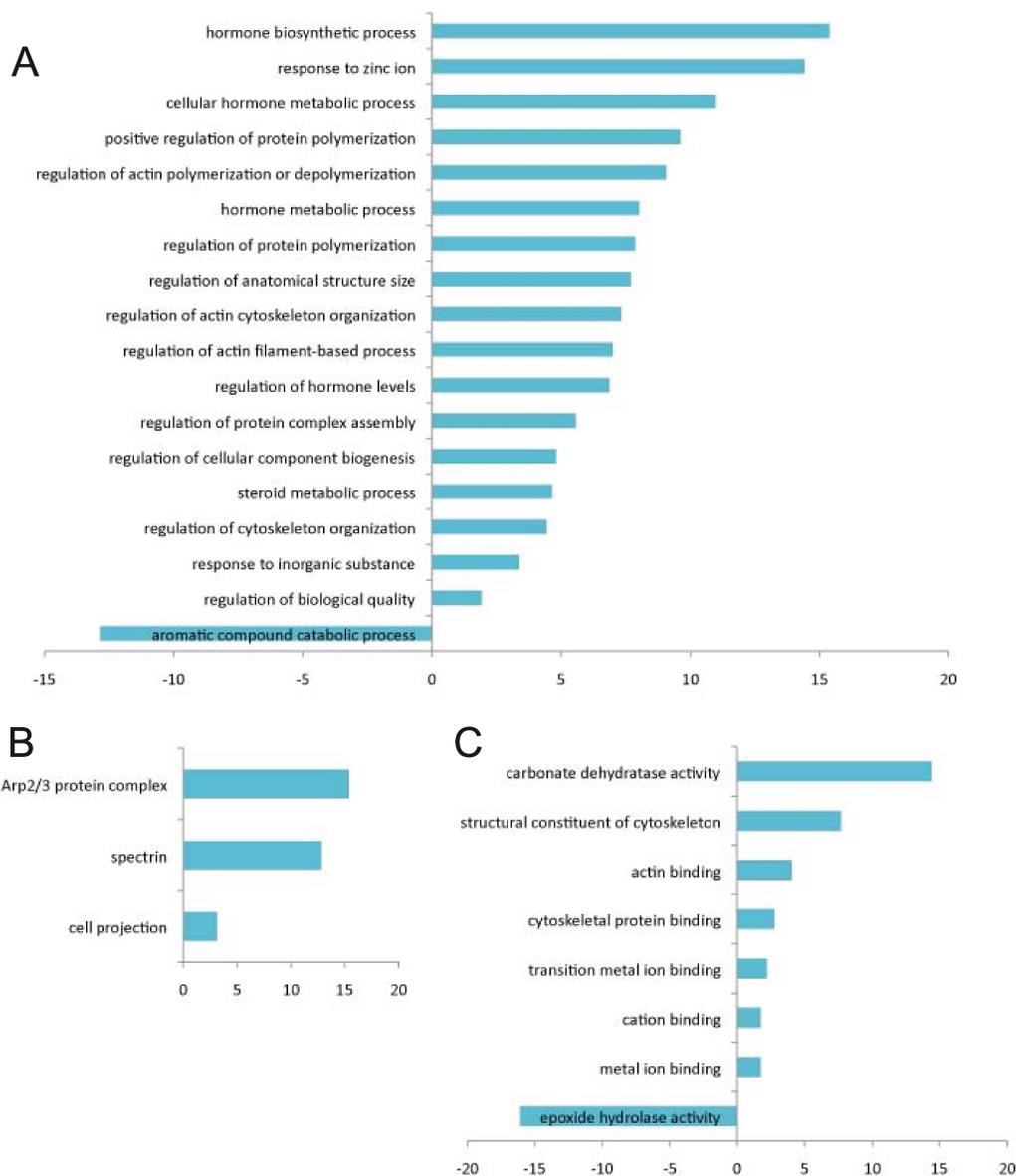
Gene	Uniprot ID	Proteína	FC	Localização
MAP1B	P46821	Microtubule-associated protein 1B	2.65	citoesqueleto
MAP1ALC3	A6NCE7	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 B2	2.25	citoesqueleto
ARPC5L	Q9BPX5	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	2.51	citoesqueleto
ARPC2	O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	2.46	citoesqueleto
ARPC3	O15145	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	2.15	citoesqueleto
ARPC4	P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	2.13	citoesqueleto
ACTR3	P61158	Actin-related protein 3	2.04	citoesqueleto
SPTB	P11277	Spectrin beta chain, erythrocyte	3.80	citoesqueleto
SPTAN1	Q13813	Spectrin alpha chain, brain	3.06	citoesqueleto
SPTA1	P02549	Spectrin alpha chain, erythrocyte	2.44	citoesqueleto

Sendo assim, é esperado que células selecionadas para resistência à esse vinca-alcalóide apresentem alterações em proteínas relacionadas ao citoesqueleto. Um exemplo é a proteína MAP1b (*microtubule-associated protein 1b*), que está 2,65 vezes aumentada na linhagem Lucena (em relação à K562). MAP1b está envolvida na estabilidade de microtúbulos, sendo que sua superexpressão torna os filamentos mais estáveis e aumenta a resistência à agentes despolimerizantes (Takemura *et al.*, 1992; Goold *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2002). A proteína MAP1ALC3 (*microtubule-associated protein 1a light chain 3*), mais comumente chamada de LC3, também está positivamente regulada na linhagem Lucena (*fold change* = 2,25). Estudos mostram que LC3 se associa à complexos contendo as proteínas MAP1a (*microtubule-associated protein 1a*) e MAPB1, mas que é também capaz de se ligar diretamente a microtúbulos (Halpain e Dehmelt, 2006). Em neurônios, mostrou-se que essa proteína é capaz de atenuar a dinâmica dos microtúbulos a que se liga, promovendo sua estabilização (Faller *et al.*, 2009). Assim, sua regulação pode estar auxiliando a manutenção da integridade dos microtúbulos nas células resistentes à

vincristina. Além disso, o aumento nos níveis de LC3 está frequentemente relacionado a processos de autofagia celular. Recentemente foi demonstrado que em células leucêmicas HL-60, a indução de autofagia causa aumento nos níveis de LC3 e promoveu maior resistência à vincristina (Liu *et al.*, 2010). A autofagia tem sido cada vez mais reconhecida como um mecanismo de sobrevivência celular em resposta à quimioterapia citotóxica ou irradiação. No tratamento da CML, a aplicação do inibidor autofágico cloroquina aumentou o efeito da terapia com o quimioterápico imatinib, indicando que a autofagia tem papel importante na sobrevivência dessas células leucêmicas(Liu *et al.*, 2010).

Além dos microtúbulos, a rede de actina da linhagem Lucena também parece estar sofrendo remodelamento. Várias subunidades do complexo ARP2/3 (*actin-related protein 2/3*) estão positivamente reguladas nessas células (Tabela 6). O citoesqueleto de actina tem papéis fundamentais em processos celulares essenciais para a função e sobrevivência das células, como a migração celular, endocitose, tráfego de vesículas e citocinese. O complexo ARP2/3 é responsável pela ramificação e estabelecimento de novos filamentos de actina, sendo crucial para vários dos processos citados acima (Goley e Welch, 2006). Além disso, observamos que 3 cadeias da proteína Spectrin têm a abundância relativa aumentada na Lucena. Essa proteína possui domínios de ligação à actina e se localiza na face intracelular da membrana plasmática, promovendo seu suporte e garantindo a integridade da membrana plasmática e da estrutura do citoesqueleto (Dubielecka *et al.*, 2005).

### 4.8.3 Processos biológicos enriquecidos e depletados nas células Lucena



**Figura 16** – Análise de *Gene Ontology* através da ferramenta GOrilla (Eden *et al.*, 2009) mostrando classes de proteínas enriquecidas ou depletadas na linhagem Lucena em relação à K562. Eixo X mostra o valor de *enrichment* que é positivo para as classes enriquecidas e negativo para as depletadas. O valor é calculado com base da representatividade das classes nas porções superexpressas ou reprimidas do proteoma em relação à totalidade das proteínas identificadas (Eden *et al.*, 2009). Foram realizadas análises de A) processos biológicos, B) componente celular e C) função molecular.

Na análise de *Gene Ontology* são avaliadas quais classes biológicas estão mais representadas entre as proteínas diferencialmente reguladas (proteínas que estão pelo menos 2x aumentadas ou reprimidas na linhagem Lucena em relação à K562) em relação ao total de proteínas identificadas no proteoma. Essa análise não leva em conta o valor de *fold change* e sim a representatividade de membros de uma certa classe entre as proteínas reguladas.

Os resultados dessa análise estão de acordo com os dados já discutidos nesse relatório. Como se pode observar na figura 16A o metabolismo de hormônios (particularmente de hormônios esteróides) está entre as classes mais enriquecidas nas células resistentes. Também há enriquecimento de proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto. Reforçando essa idéia, a figura 16B mostra que as proteínas enriquecidas na fração superregulada estão localizadas em componentes celulares relacionados ao citoesqueleto. O mesmo se repete quando observamos a função molecular na figura 16C. Isso reforça a importância do metabolismo de esteróides e da reorganização estrutural na aquisição de resistência da linhagem Lucena. É interessante notar que, no panorama geral, quase não há classes depletadas na linhagem resistente. A aquisição do fenótipo MDR parece então envolver predominantemente ganho e não perda de funções.

## 5 CONCLUSÕES

- As células leucêmicas resistentes Lucena apresentam altos níveis da endonuclease Dicer em relação à linhagem não-resistente K562;
- Let-7a se encontra altamente superregulado na linhagem Lucena e miR-145 está intensamente reprimido em relação à K562;
- O silenciamento da Dicer nas células Lucena aumentou a sensibilidade destas células à vincristina;
- A resistência de diversas linhagens celulares frente à cisplatina e doxorrubicina possui correlação significativa com os níveis de mRNA da Dicer;
- A avaliação dos ligantes de Dicer na linhagem Lucena resultou na descoberta de novas interações que indicam participação da enzima em vias de sobrevivência e proliferação celular, proteção anti-oxidante e metabolismo de lipídios e hormônios esteróides;
- A análise do proteoma das linhagens K562 e Lucena indica que o metabolismo de lipídios, a produção de hormônios esteróides e o remodelamento do citoesqueleto são processos aumentados na linhagem Lucena.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akao, Y., Y. Nakagawa, Y. Kitade, *et al.* (2007). "Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies." Cancer Sci **98**(12): 1914-20.
- Al-Shawi, M. K. e H. Omote (2005). "The remarkable transport mechanism of P-glycoprotein: a multidrug transporter." J Bioenerg Biomembr **37**(6): 489-96.
- Altuvia, S., W. D. Stein, S. Goldenberg, *et al.* (1993). "Targeted disruption of the mouse *mdr1b* gene reveals that steroid hormones enhance *mdr* gene expression." J Biol Chem **268**(36): 27127-32.
- Aqeilan, R. I., G. A. Calin e C. M. Croce (2010). "miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives." Cell Death Differ **17**(2): 215-20.
- Artero-Castro, A., H. Kondoh, P. J. Fernández-Marcos, *et al.* (2009). "Rplp1 bypasses replicative senescence and contributes to transformation." Experimental Cell Research **315**(8): 1372-83.
- Bains, O. S., T. A. Grigliatti, R. E. Reid, *et al.* (2010). "Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **335**(3): 533-45.
- Bandyopadhyay, S., R. Mitra, U. Maulik, *et al.* (2010). "Development of the human cancer microRNA network." Silence **1**(1): 6.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-97.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-33.
- Besada, V., M. Diaz, M. Becker, *et al.* (2006). "Proteomics of xenografted human breast cancer indicates novel targets related to tamoxifen resistance." Proteomics **6**(3): 1038-48.
- Blumberg, B., W. Sabbagh, H. Juguilon, *et al.* (1998). "SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor." Genes & Development **12**(20): 3195-205.

- Bu, Y., C. Lu, C. Bian, *et al.* (2009). "Knockdown of Dicer in MCF-7 human breast carcinoma cells results in G1 arrest and increased sensitivity to cisplatin." Oncol Rep **21**(1): 13-7.
- Chen, G.-Q., Z.-W. Zhao, H.-Y. Zhou, *et al.* (2010). "Systematic analysis of microRNA involved in resistance of the MCF-7 human breast cancer cell to doxorubicin." Med Oncol **27**(2): 406-15.
- Chendrimada, T. P., K. J. Finn, X. Ji, *et al.* (2007). "MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6." Nature **447**(7146): 823-8.
- Chiosea, S., E. Jelezcova, U. Chandran, *et al.* (2006). "Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma." Am J Pathol **169**(5): 1812-20.
- Cimmino, A., G. A. Calin, M. Fabbri, *et al.* (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." Proc Natl Acad Sci USA **102**(39): 13944-9.
- Deininger, M. W., S. Vieira, R. Mendiola, *et al.* (2000). "BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia." Cancer Res **60**(7): 2049-55.
- Delahunty, C. M. e J. R. Yates (2007). "MudPIT: multidimensional protein identification technology." BioTechniques **43**(5): 563, 565, 567 passim.
- Diamond, J. M. e J. V. Melo (2011). "Mechanisms of resistance to BCR-ABL kinase inhibitors." Leuk Lymphoma **52 Suppl 1**: 12-22.
- Ding, J., J.-J. Liu, A. S. Kowal, *et al.* (2002). "Microtubule-associated protein 1B: a neuronal binding partner for gigaxonin." J Cell Biol **158**(3): 427-33.
- Dröge, P. e C. A. Davey (2008). "Do cells let-7 determine stemness?" Cell Stem Cell **2**(1): 8-9.
- Druker, B. J. (2008). "Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML." Blood **112**(13): 4808-17.
- Dubielecka, P. M., B. Jaźwiec, S. Potoczek, *et al.* (2005). "Changes in spectrin organisation in leukaemic and lymphoid cells upon chemotherapy." Biochem Pharmacol **69**(1): 73-85.

- Eden, E., R. Navon, I. Steinfeld, *et al.* (2009). "GORilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists." BMC Bioinformatics **10**: 48.
- Esquela-Kerscher, A. e F. J. Slack (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." Nat Rev Cancer **6**(4): 259-69.
- Faller, E. M., T. S. Villeneuve e D. L. Brown (2009). "MAP1a associated light chain 3 increases microtubule stability by suppressing microtubule dynamics." Mol Cell Neurosci **41**(1): 85-93.
- Filipowicz, W. (2005). "RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine." Cell **122**(1): 17-20.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya e N. Sonenberg (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet **9**(2): 102-14.
- Garrigues, A., A. E. Escargueil e S. Orlowski (2002). "The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane." Proc Natl Acad Sci USA **99**(16): 10347-52.
- Gaur, A., D. A. Jewell, Y. Liang, *et al.* (2007). "Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines." Cancer Res **67**(6): 2456-68.
- Gayet, L., G. Dayan, S. Barakat, *et al.* (2005). "Control of P-glycoprotein activity by membrane cholesterol amounts and their relation to multidrug resistance in human CEM leukemia cells." Biochemistry **44**(11): 4499-509.
- Giles, F. J., J. Cortes, D. Jones, *et al.* (2007). "MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation." Blood **109**(2): 500-2.
- Goley, E. D. e M. D. Welch (2006). "The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(10): 713-26.

- Goold, R. G., R. Owen e P. R. Gordon-Weeks (1999). "Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones." J Cell Sci **112 ( Pt 19)**: 3373-84.
- Goswami, D. e G. S. Conway (2005). "Premature ovarian failure." Human Reproduction Update **11(4)**: 391-410.
- Gottesman, M. M., T. Fojo e S. E. Bates (2002). "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." Nat Rev Cancer **2(1)**: 48-58.
- Gregersen, L. H., A. B. Jacobsen, L. B. Frankel, *et al.* (2010). "MicroRNA-145 targets YES and STAT1 in colon cancer cells." PLoS ONE **5(1)**: e8836.
- Griswold, I. J., M. MacPartlin, T. Bumm, *et al.* (2006). "Kinase domain mutants of Bcr-Abl exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib." Mol Cell Biol **26(16)**: 6082-93.
- Haase, A. D., L. Jaskiewicz, H. Zhang, *et al.* (2005). "TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing." EMBO Rep **6(10)**: 961-7.
- Hadfield, J. A., S. Ducki, N. Hirst, *et al.* (2003). "Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs." Prog Cell Cycle Res **5**: 309-25.
- Halpain, S. e L. Dehmelt (2006). "The MAP1 family of microtubule-associated proteins." Genome Biol **7(6)**: 224.
- Himes, R. H., R. N. Kersey, I. Heller-Bettinger, *et al.* (1976). "Action of the vinca alkaloids vincristine, vinblastine, and desacetyl vinblastine amide on microtubules in vitro." Cancer Res **36(10)**: 3798-802.
- Hirose, M., E. Hosoi, S. Hamano, *et al.* (2003). "Multidrug resistance in hematological malignancy." J Med Invest **50(3-4)**: 126-35.
- Jakymiw, A., R. S. Patel, N. Deming, *et al.* (2010). "Overexpression of dicer as a result of reduced let-7 MicroRNA levels contributes to increased cell proliferation of oral cancer cells." Genes Chromosomes Cancer **49(6)**: 549-59.
- Johnson, C. D., A. Esquela-Kerscher, G. Stefani, *et al.* (2007). "The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells." Cancer Res **67(16)**: 7713-22.

- Joske, D. J. L. (2008). "Chronic myeloid leukaemia: the evolution of gene-targeted therapy." Med J Aust **189**(5): 277-82.
- Kantarjian, H., E. Jabbour, J. Grimley, *et al.* (2006). "Dasatinib." Nat Rev Drug Discov **5** (9): 717-8.
- Kappelmayer, J., A. Simon, F. Kiss, *et al.* (2004). "Progress in defining multidrug resistance in leukemia." Expert Rev Mol Diagn **4**(2): 209-17.
- Klucken, J., C. Büchler, E. Orsó, *et al.* (2000). "ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport." Proc Natl Acad Sci USA **97**(2): 817-22.
- Kok, K. H., M.-H. J. Ng, Y.-P. Ching, *et al.* (2007). "Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA." J Biol Chem **282**(24): 17649-57.
- Kondo, Y., T. Kanzawa, R. Sawaya, *et al.* (2005). "The role of autophagy in cancer development and response to therapy." Nat Rev Cancer **5**(9): 726-34.
- Kovalchuk, O., J. Filkowski, J. Meservy, *et al.* (2008). "Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin." Mol Cancer Ther **7**(7): 2152-9.
- Kruh, G. D. e M. G. Belinsky (2003). "The MRP family of drug efflux pumps." Oncogene **22**(47): 7537-52.
- Lacombe, A., H. Lee, L. Zahed, *et al.* (2006). "Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure." Am J Hum Genet **79** (1): 113-9.
- Law, J. C., M. K. Ritke, J. C. Yalowich, *et al.* (1993). "Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line." Leuk Res **17**(12): 1045-50.
- Lee, C. H. (2010). "Reversing agents for ATP-binding cassette drug transporters." Methods Mol Biol **596**: 325-40.
- Li, S., R. L. Ilaria, R. P. Million, *et al.* (1999). "The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in

- mice but have different lymphoid leukemogenic activity." J Exp Med **189**(9): 1399-412.
- Liang, X.-H. e S. T. Crooke (2011). "Depletion of key protein components of the RISC pathway impairs pre-ribosomal RNA processing." Nucleic Acids Research.
- Link, A. J., J. Eng, D. M. Schieltz, *et al.* (1999). "Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry." Nat Biotechnol **17**(7): 676-82.
- Liu, J., M. A. Carmell, F. V. Rivas, *et al.* (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." Science **305**(5689): 1437-41.
- Liu, L., M. Yang, R. Kang, *et al.* (2010). "HMGB1-induced autophagy promotes chemotherapy resistance in leukemia cells." Leukemia **25**(1): 23-31.
- Liu, T., H. Tang, Y. Lang, *et al.* (2009). "MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin." Cancer Lett **273**(2): 233-42.
- Livak, K. J. e T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lozzio, C. B. e B. B. Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood **45**(3): 321-34.
- Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, *et al.* (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." Nature **435**(7043): 834-8.
- Maass, N., F. Rösel, C. Schem, *et al.* (2002). "Amplification of the BCAS2 gene at chromosome 1p13.3-21 in human primary breast cancer." Cancer Lett **185**(2): 219-23.
- MacRae, I. J., E. Ma, M. Zhou, *et al.* (2008). "In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex." Proc Natl Acad Sci USA **105**(2): 512-7.
- Mahon, F.-X., S. Hayette, V. Lagarde, *et al.* (2008). "Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression." Cancer Res **68**(23): 9809-16.
- Mann, M. (2006). "Functional and quantitative proteomics using SILAC." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(12): 952-8.

- Miller, W. L. (2007). "StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import." Molecular Endocrinology **21**(3): 589-601.
- Mindnich, R., G. Möller e J. Adamski (2004). "The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases." Mol Cell Endocrinol **218**(1-2): 7-20.
- Moreira, D. F., B. E. Strauss, E. Vannier, *et al.* (2008). "Genes up- and down-regulated by dermcidin in breast cancer: a microarray analysis." Genet Mol Res **7**(3): 925-32.
- Nagasaki, S., T. Suzuki, Y. Miki, *et al.* (2009). "17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 in human breast carcinoma: a prognostic factor via potential regulation of fatty acid synthesis." Cancer Res **69**(4): 1392-9.
- Neubauer, G., A. King, J. Rappsilber, *et al.* (1998). "Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex." Nat Genet **20**(1): 46-50.
- Nobili, S., I. Landini, B. Giglioli, *et al.* (2006). "Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance." Curr Drug Targets **7**(7): 861-79.
- O'Connor, R. (2007). "The pharmacology of cancer resistance." Anticancer Res **27**(3A): 1267-72.
- Olsen, J. V., L. M. F. de Godoy, G. Li, *et al.* (2005). "Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap." Mol Cell Proteomics **4**(12): 2010-21.
- Ong, S.-E., B. Blagoev, I. Kratchmarova, *et al.* (2002). "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." Mol Cell Proteomics **1**(5): 376-86.
- Orlowski, S., S. Martin e A. Escargueil (2006). "P-glycoprotein and 'lipid rafts': some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?)." Cell Mol Life Sci **63**(9): 1038-59.
- Ostenfeld, M. S., J. B. Bramsen, P. Lamy, *et al.* (2010). "miR-145 induces caspase-dependent and -independent cell death in urothelial cancer cell lines with targeting of an expression signature present in Ta bladder tumors." Oncogene **29**(7): 1073-84.

- Ozben, T. (2006). "Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer." FEBS Lett **580**(12): 2903-9.
- Parker, R. e U. Sheth (2007). "P bodies and the control of mRNA translation and degradation." Mol Cell **25**(5): 635-46.
- Provost, P., R. A. Silverstein, D. Dishart, *et al.* (2002). "Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells." Proc Natl Acad Sci USA **99** (26): 16648-53.
- Qi, C., Y. T. Zhu, J. Chang, *et al.* (2005). "Potentiation of estrogen receptor transcriptional activity by breast cancer amplified sequence 2." Biochem Biophys Res Commun **328**(2): 393-8.
- Quackenbush, R. C., G. W. Reuther, J. P. Miller, *et al.* (2000). "Analysis of the biologic properties of p230 Bcr-Abl reveals unique and overlapping properties with the oncogenic p185 and p210 Bcr-Abl tyrosine kinases." Blood **95**(9): 2913-21.
- Rappsilber, J., Y. Ishihama e M. Mann (2003). "Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics." Anal Chem **75**(3): 663-70.
- Rich, B. E. e J. A. Steitz (1987). "Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly." Molecular and Cellular Biology **7**(11): 4065-74.
- Rizzolio, F., S. Bione, C. Sala, *et al.* (2006). "Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature." Hum Reprod **21**(6): 1477-83.
- Rumjanek, V. M., G. S. Trindade, K. Wagner-Souza, *et al.* (2001). "Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1." An Acad Bras Cienc **73**(1): 57-69.
- Sachdeva, M. e Y.-Y. Mo (2010). "MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1." Cancer Res **70**(1): 378-87.
- Sachdeva, M., S. Zhu, F. Wu, *et al.* (2009). "p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145." Proc Natl Acad Sci USA **106**(9): 3207-12.

- Sampson, V. B., N. H. Rong, J. Han, *et al.* (2007). "MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells." Cancer Res **67**(20): 9762-70.
- Sawyers, C. L. (1998). "Molecular abnormalities in myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes." Leuk Res **22**(12): 1113-1122.
- Schittek, B., R. Hipfel, B. Sauer, *et al.* (2001). "Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands." Nat. Immunol. **2**(12): 1133-7.
- Schroeder, M. J., J. Shabanowitz, J. C. Schwartz, *et al.* (2004). "A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry." Anal Chem **76**(13): 3590-8.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, *et al.* (2003). "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." Genome Research **13**(11): 2498-504.
- Shell, S., S.-M. Park, A. R. Radjabi, *et al.* (2007). "Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer." Proc Natl Acad Sci USA **104**(27): 11400-5.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, *et al.* (1996). "A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone." Biochem Soc Trans **24**(3): 893-6.
- Si, M.-L., S. Zhu, H. Wu, *et al.* (2007). "miR-21-mediated tumor growth." Oncogene **26**(19): 2799-803.
- Sinkkonen, L., T. Hugenschmidt, W. Filipowicz, *et al.* (2010). "Dicer is associated with ribosomal DNA chromatin in mammalian cells." PLoS ONE **5**(8): e12175.
- Soverini, S., S. Colarossi, A. Gnani, *et al.* (2007). "Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leukemia patients and the presence or the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain." Haematologica **92**(3): 401-4.
- Stewart, G. D., A. G. Lowrie, A. C. P. Riddick, *et al.* (2007). "Dermcidin expression confers a survival advantage in prostate cancer cells subjected to oxidative stress or hypoxia." Prostate **67**(12): 1308-17.

- Stewart, G. D., R. J. Skipworth, J. A. Ross, *et al.* (2008). "The dermcidin gene in cancer: role in cachexia, carcinogenesis and tumour cell survival." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **11**(3): 208-13.
- Stocco, D. M. (2001). "StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis." Annu Rev Physiol **63**: 193-213.
- Synold, T. W., I. Dussault e B. M. Forman (2001). "The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux." Nat Med **7**(5): 584.
- Szakács, G., J.-P. Annereau, S. Lababidi, *et al.* (2004). "Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells." Cancer Cell **6**(2): 129-37.
- Szakács, G., J. K. Paterson, J. A. Ludwig, *et al.* (2006). "Targeting multidrug resistance in cancer." Nat Rev Drug Discov **5**(3): 219-34.
- Takemura, R., S. Okabe, T. Umeyama, *et al.* (1992). "Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau." J Cell Sci **103 ( Pt 4)**: 953-64.
- Talpaz, M., N. P. Shah, H. Kantarjian, *et al.* (2006). "Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias." N Engl J Med **354**(24): 2531-41.
- Tennant, J. R. (1964). "Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability." Transplantation **2**: 685-94.
- Tsang, W. P. e T. T. Kwok (2008). "Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3." Apoptosis **13**(10): 1215-22.
- van den Heuvel-Eibrink, M. M., E. A. C. Wiemer, A. Prins, *et al.* (2002). "Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML)." Leukemia **16**(5): 833-9.
- Verdel, A. (2004). "RNAi-Mediated Targeting of Heterochromatin by the RITS Complex." Science **303**(5658): 672-676.
- Verfaillie, C. M. (1998). "Biology of chronic myelogenous leukemia." Hematol Oncol Clin North Am **12**(1): 1-29.
- Walker, D. (2010). "Apoptosis: Which way will the Dicer roll?" Nat Rev Mol Cell Biol.

- Wang, L. G., X. M. Liu, W. Kreis, *et al.* (1999). "The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review." Cancer Chemother Pharmacol **44**(5): 355-361.
- Wang, S., C. Bian, Z. Yang, *et al.* (2009). "miR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN." Int J Oncol **34**(5): 1461-6.
- Warmuth, M., N. Simon, O. Mitina, *et al.* (2003). "Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant Bcr-Abl kinases." Blood **101**(2): 664-72.
- Xia, L., D. Zhang, R. Du, *et al.* (2008). "miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells." Int J Cancer **123**(2): 372-9.
- Xu, N., T. Papagiannakopoulos, G. Pan, *et al.* (2009). "MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells." Cell **137**(4): 647-58.
- Yan, L.-X., X.-F. Huang, Q. Shao, *et al.* (2008). "MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis." RNA **14**(11): 2348-60.
- Yang, Y.-X., Z.-Q. Xiao, Z.-C. Chen, *et al.* (2006). "Proteome analysis of multidrug resistance in vincristine-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR." Proteomics **6**(6): 2009-21.
- Yu, J., F. Wang, G.-H. Yang, *et al.* (2006). "Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines." Biochem Biophys Res Commun **349**(1): 59-68.
- Zhang, B., X. Pan, G. P. Cobb, *et al.* (2007). "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors." Developmental Biology **302**(1): 1-12.
- Zhu, H., H. Wu, X. Liu, *et al.* (2008). "Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells." Biochem Pharmacol **76**(5): 582-8.

## **7 ANEXOS**

### **7.1 Colaboração com a Dra. Jantine van Baal na Utrecht University - Holanda**

Realizei estágio 3 meses (abril a junho de 2009) no Departamento de Gastroenterologia do University Medical Center (UMC), na cidade de Utrecht, na Holanda. O estágio foi realizado sob a supervisão da Dra. Jantine van Baal, com o objetivo de aprender a técnica de quantificação de miRNAs e aplicá-la às minhas amostras, dando início ao presente trabalho.

### **7.2 Colaboração com o Prof. Dr. John Yates no The Scripps Research Institute - EUA**

Realizei estágio 3 meses (fevereiro a maio de 2011) no The Scripps Research Institute em San Diego/CA. O estágio foi realizado no laboratório de proteômica do Prof. Dr. John Yates, com o objetivo de realizar os experimentos de MudPIT apresentados nesse trabalho.

### 7.3 Apresentação de resumo e pôster na Reunião Anual da SBBq - 2010

#### **A possible role for DICER and miRNA regulation on the resistant phenotype of chronic myeloid leukemia cells.**

Sarah Azoubel<sup>1</sup>, Jantine val Baal<sup>2</sup>, Maikel P. Peppelenbosch<sup>3</sup>, Carmen Veríssima Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, State University of Campinas, Brazil. <sup>2</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands. <sup>3</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands.

Treatment for chronic myeloid leukemia (CML) commonly induces the selection of mutations that confer drug resistance to the leukemic cells. Recent evidence has related cancer resistance and aggressiveness to alterations in microRNA (miRNA) regulation. These small RNAs are post transcriptional regulators that affect mRNA translation or stability. Here we study the differential expression of miRNAs and the importance of the key miRNA processing enzyme DICER in two CML cell lines, K562 and its counterpart with multi-drug resistant phenotype (Lucena). DICER is overexpressed in resistant cells at mRNA and protein level, as confirmed by qRT-PCR, western blot and proteome data. DICER mRNA is 6-fold increased in resistant cells and protein amount was coherently higher. siRNA treatment shows that DICER depleted cells are considerably more sensitive to the chemotherapeutic vincristine. Expression analysis of miRNAs showed that let-7a and miR-145 were significantly altered in resistant cells. Let-7a was 20-fold upregulated and miR-145 was 25-fold deregulated. Our results indicate miRNAs might play an important role on CML acquired drug resistance. Therefore, miRNA metabolism modulation could be a promising strategy for conquering CML resistance.

Keywords: *leukemia, microRNA, resistance, cancer*

Supported by: FAPESP

#### **7.4 Artigos publicados**

SOUZA, A. C. S ; **AZUBEL, S.** ; QUEIROZ, K. C. S. ; PEPPELENBOSCH, M. P. ; FERREIRA, C. V. From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, p. 1140-1153, 2009.

OURIQUE, A. F. ; **AZUBEL, S.** ; FERREIRA, C. V ; SILVA, C. B. ; MARCHIORI, M. C. L. ; POHLMANN, A. R. ; GUTERRES, S. S. ; BECK, R. C. R. . Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2010.