INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ONCOLOGIA

Deborah Delbue da Silva

"Localização subcelular de XIAP: implicações na proliferação celular, resistência às drogas e prognóstico no câncer de mama"

Orientadora: Drª Gabriela Nestal de Moraes

Co-orientadora: Drª Raquel Ciuvalschi Maia

Rio de Janeiro

Março 2017

Instituto Nacional de Câncer

José Alencar Gomes da Silva

Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

Deborah Delbue da Silva

"Localização subcelular de XIAP: implicações na proliferação celular, resistência às drogas e prognóstico no câncer de mama"

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Drª Gabriela Nestal de Moraes

Co-orientadora: Drª Raquel Ciuvalschi Maia

Rio de Janeiro

Março 2017

S586l Silva, Deborah Delbue da.

Localização subcelular de XIAP: implicações na proliferação celular, resistência às drogas e prognóstico no câncer de mama / Deborah Delbue da Silva. – Rio de Janeiro, 2017.
83 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.

Orientador: Gabriela Nestal de Moraes.
Co-orientador: Raquel Ciuvalschi Maia.

1. Neoplasias da Mama. 2. Proteína Inibidora da Apoptose Ligadas ao Cromossomo X. 3. Proliferação de Células. 4. Resistência a Medicamentos 5. Prognóstico. I. Nestal de Moraes, Gabriela (Orient.). II. Maia, Raquel Ciuvalschi (Co-orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99449

Instituto Nacional de Câncer
José Alencar Gomes da Silva

Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

Deborah Delbue da Silva

"Localização subcelular de XIAP: implicações na proliferação celular, resistência às drogas e prognóstico no câncer de mama"

Orientadora: Drª Gabriela Nestal de Moraes

Co-orientadora: Drª Raquel Ciuvalschi Maia

Aprovada em: 28 de março de 2017

Banca examinadora:

Dr. Miguel Ângelo Moreira (INCA)

Dr. Martin Hernan Bonamino (INCA)

Dr. Rafael Linden (UFRJ)

Drª. Patrícia Abrão Possik (Suplente interno)

Dr. Bruno Kaufmann Robbs (Suplente externo)

Rio de Janeiro

Março 2017

À minha família, pelo apoio incondicional. Sem vocês, seria impossível.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional, por todo amor e paciência, e toda força que sempre me impulsiona para frente. Sem vocês, eu jamais conseguiria chegar aonde cheguei. A vitória é dedicada a vocês. Amo vocês demais!

À Gabi, me faltam palavras para descrever o quanto você é importante e responsável por todo crescimento científico que desenvolvi ao longo dos anos. Mas nossa relação vai muito além disso. Você é mais que orientadora. Eu tenho prazer em poder dizer que você é minha amiga. Obrigada pela orientação. Obrigada por acreditar em mim, às vezes, mais do que eu mesma. Obrigada por estar presente sempre. Obrigada por ser minha amiga.

À minha co-orientadora Drª Raquel, por ter me recebido de braços abertos por todos esses anos no laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, onde esse trabalho foi desenvolvido com todo esforço e carinho. Obrigada por todo apoio científico e incentivo sempre e, também, pelo delicioso bolo de banana.

Aos membros do laboratório, que me recebem sempre tão bem. Cada pessoa tem um brilho especial, que é responsável por alegrar meu dia. Obrigada pelas discussões científicas, mas muito mais do que isso. Obrigada por cada sorriso e cada gargalhada, obrigada por cada pausa nos experimentos para o café, e cada encontro fora do laboratório. Amo vocês!

À Flavia. Nossa, é até difícil escrever o quanto sua amizade é importante para mim. É tão bonito ver o quanto nossa parceria e amizade cresceram com o tempo. Obrigada por ser minha confidente e "consoladora". Obrigada por sempre transmitir sua alegria e melhorar meu dia. Fifty, fifty sempre (tomara que você se lembre dessa piada) Espero fazer o mesmo por você :)

À Dani, por ser nosso elo com Deus no laboratório. Obrigada pela força, gata. Torço muito por você e sei que grandes coisas ainda virão.

À Fofa (Thaís). Por ser a amiga mais fofa que tenho (mentira!). Obrigada por ser parceira. Sei que você estará presente para o que der e vier. Obrigada por acreditar em mim. Pode contar comigo!

Ao Bielson. Obrigada por ter aparecido nesse laboratório, menino. Que achado! Obrigada por alegrar meus dias e por segurar meus choros. Obrigada por ter se tornado essa pessoa tão especial pra mim.

À Lauana, minha irmã científica e a paranaense mais gonçalense que eu conheço. Obrigada por tudo e por todos os conselhos (mesmo eu não os seguindo quase sempre hehe)

Ao Gustavo, pelos conselhos e por aguentar meus loopings e portas giratórias! Obrigada!

Aos meus colaboradores Pedro Ivo Lucena e ao Dr. João Viola, pelo apoio científico e pelas idéias importantes para o desenvolvimento do trabalho.

À Drª. Claudete, pelas sugestões e discussões relevantes acerca do estudo desenvolvido.

À Marcela, pelos auxílios em biologia molecular. Obrigada por me explicar e responder minhas perguntas até por WhatsApp.

À Lídia Magalhães, patologista envolvida no estudo com as amostras de pacientes.

Aos membros da banca, por terem gentilmente aceitado o convite. Muito obrigada.

Aos meus grandes amigos da família 2232. Sei que cada um seguiu um caminho, mas a gente sempre arruma um jeitinho de se encontrar, pelo menos uma vez por ano. Esses encontros são muito importantes para mim. Torço demais por cada um de vocês.

Aos meus amigos mais chegados do que irmãos: Isabele, Carol, Calvin, Ricardo e Yago. Vocês são muito importantes para mim. Obrigada.

À Ludmilla, que sempre me acompanha e tem uma palavra amiga nos momentos em que eu mais preciso. Obrigada mesmo.

Às Agências de fomento FAPERJ, CNPq, Programa de Oncobiologia e ao Ministério da Saúde por ter financiado e permitido o desenvolvimento do trabalho.

Meu “Muito obrigada” a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar onde estou. Ainda há muito por vir, muitos desafios e descobertas, mas sei que com vocês ao meu lado, não preciso ter medo. Não estou sozinha. Obrigada.

Palavras me faltam para expressar tamanha gratidão que sinto.
Amo vocês!

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

Deborah Delbue da Silva

LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE XIAP: IMPLICAÇÕES NA PROLIFERAÇÃO CELULAR, RESISTÊNCIA AS DROGAS E NO PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA

RESUMO

O câncer de mama é o tipo tumoral que mais acomete as mulheres no Brasil e no mundo, além de causar elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Essa neoplasia tem como importante característica o desbalanço entre proliferação e morte celular. Nesse contexto, se insere a XIAP, uma proteína inibidora da apoptose (IAP), que exerce sua função antiapoptótica através da ligação e inibição de caspases, bem como ubiquitinação de proteínas-alvo. A XIAP é encontrada principalmente na porção citoplasmática tanto em células tumorais quanto em não neoplásicas, porém estudos mostram que também é possível detectar a sua expressão no núcleo. Dados prévios do nosso grupo mostram que a XIAP pode estar localizada tanto no citoplasma quanto no núcleo em pacientes com câncer de mama, porém não há muitos relatos acerca dos papéis exercidos pela XIAP em diferentes compartimentos celulares. O objetivo do presente estudo é elucidar o impacto da XIAP e sua localização subcelular na proliferação celular, resistência às drogas e no prognóstico no câncer de mama. Nossos dados mostram que todas as linhagens celulares investigadas apresentaram XIAP citoplasmática, exceto as células MCF-7 Dox^R, resistentes à doxorrubicina (dox), que também apresentaram XIAP na fração nuclear, como avaliado por fracionamento subcelular e Western blotting. Pelos ensaios de MTT e clonogênico, observamos que o tratamento com a dox diminuiu a viabilidade celular e a capacidade de formação de colônias nas células MDA-MB-231 e MCF-7, porém o mesmo resultado não foi observado nas células MCF-7 Dox^R, sugerindo que a localização nuclear de XIAP esteja associada ao fenótipo de resistência à dox. Corroborando esses achados, as células MCF-7 Tax^R, resistentes ao paclitaxel, apresentaram expressão nuclear de XIAP, confirmando uma possível correlação da presença de XIAP nuclear com o perfil de resistência aos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama, independentemente do mecanismo de ação. Além disso, o tratamento com as drogas não alterou a localização subcelular de XIAP em nenhuma das células testadas. Adicionalmente, a indução da superexpressão dos mutantes $XIAP^{\Delta RING}$ e $XIAP^{NLS\ C\text{-}term}$ por transfecção transiente, onde é possível detectar expressão de XIAP nuclear, resultou no aumento da capacidade proliferativa das células MCF-7, como examinado pela contagem de células, ensaio clonogênico e de viabilidade celular. De maneira consistente, a indução de XIAP no núcleo promoveu a resistência ao tratamento com dox, confirmando os nossos achados prévios referentes à presença da XIAP no núcleo de células quimiorresistentes. Por fim, a análise de curvas de Kaplan-Meyer revelou que a localização nuclear da XIAP conferiu um prognóstico adverso nas pacientes negativas para receptores hormonais, enquanto que a presença de XIAP citoplasmática conferiu uma tendência ao melhor prognóstico nas pacientes desse subgrupo. De acordo, a expressão de XIAP citoplasmática foi associada à idade igual ou superior a 50 anos e ao tamanho de tumor T1, fatores de prognóstico favorável no câncer de mama. Em conjunto, nossos dados mostram que a expressão de XIAP pode ser encontrada em diferentes compartimentos subcelulares em linhagens celulares e amostras de pacientes com câncer de mama, estando a presença de XIAP no núcleo associada a um fenótipo de maior proliferação e resistência às drogas *in vitro*, além de um prognóstico desfavorável em pacientes com câncer de mama negativas para receptores hormonais.

Palavras-chave: Câncer de mama; localização subcelular de XIAP; XIAP nuclear; proliferação celular; resistência às drogas; prognóstico.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

Deborah Delbue da Silva

SUBCELLULAR LOCALIZATION OF XIAP: IMPLICATIONS FOR CELL PROLIFERATION, DRUG RESISTANCE AND PROGNOSIS IN BREAST CANCER

ABSTRACT

Breast cancer is the most incident malignancy in women in Brazil and worldwide, and causes high rates of morbidity and mortality. The alteration in the balance between proliferation and cell death is a hallmark of this tumor. In this context, XIAP emerges as an inhibitor of apoptosis protein (IAP) which exerts its antiapoptotic function through the binding and inhibition of caspases, as well as ubiquitination of target proteins. XIAP is mainly found at the cytoplasm of both tumor and non-tumor cells, although its expression can also be detected at the nucleus. Previous data from our group show that XIAP may be located at the cytoplasm and nucleus in breast cancer patients samples, but the roles of XIAP in different cell compartments remain to be elucidated. The aim of the present study is to evaluate the impact of XIAP subcellular localization on cell proliferation, drug resistance and prognosis in breast cancer. Our data show that all cell lines investigated had only cytoplasmic XIAP expression, except for doxorubicin (dox) resistant cells, MCF-7 Dox^R, which also exhibited XIAP at the nuclear fraction, as assessed by subcellular fractionation and Western blotting. Through MTT and clonogenic assays, we observed that dox treatment reduced cell viability and colony formation capacity in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, but not in MCF-7 Dox^R cells, suggesting that nuclear localization of XIAP is associated with dox resistance phenotype. Accordingly, MCF-7 Tax^R paclitaxel resistant cells showed XIAP nuclear expression, confirming a possible correlation between the presence of nuclear XIAP and resistance to drugs used in the breast cancer treatment, regardless of its mechanism of action. In addition, drug treatment did not alter XIAP subcellular localization in any of the tested cell lines. Also, overexpression of $XIAP^{\Delta RING}$ and $XIAP^{NLS\ C\text{-}term}$ mutants by transient transfection, which leads to nuclear XIAP expression, resulted in increased proliferative capacity of MCF-7 cells, as examined by cell counting, clonogenic and cell viability assays. Consistently, induction of nuclear XIAP promoted resistance to dox treatment, confirming our previous findings regarding the presence of XIAP in the nucleus of chemoresistant cells. Analysis of Kaplan-Meyer curves revealed that XIAP nuclear localization conferred an adverse prognosis, different from cytoplasmic XIAP, which was associated with a trend of increased survival rate in hormone receptor-negative patients. Accordingly, cytoplasmic XIAP expression was associated with age $\geq$ 50 years and T1 tumor size, known favorable prognostic factors in breast cancer. Taken together, our data show that XIAP expression can be found at different subcellular compartments in cell lines and breast cancer patients samples. Remarkably, nuclear XIAP was associated with cell growth and drug resistance *in vitro*, as well as poor outcome in hormone receptor-negative breast cancer patients.

Keywords: Breast cancer; XIAP subcellular localization; Nuclear XIAP; Cell proliferation; Drug resistance; Prognosis.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ABC	*ATP-binding cassette*
APAF1	Protease apoptótica ativadora do fator1
APS	Persulfato de amônio
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATF4	*Activating transcription factor 4*
ATP	Adenosina -5'-trifosfato
BIR	*Baculoviral IAP repeat*
BRCA1	Gene de suscetibilidade ao câncer de mama1
BRCA2	Gene de suscetibilidade ao câncer de mama2
BRUCE/Apollon	Enzima conjugada à ubiquitina contendo BIR
BSA	Albumina sérica bovina
CARD	Domínio de ativação e recrutamento de caspases (*Caspase activation and recruitment domain*)
COMMD1	COMM [*copper metabolism Murr1 (mouse U2af1-rs1 region 1)] domain-containing*
DISC	Complexo indutor de sinalização de morte (*Death-induced signaling complex*)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
eIF2α	*Eukaryotic translation initiation factor 2*
ER	Receptor de estrógeno
FADD	Domínio de morte associado a Fas (*Fas-associated death domain*)
FasL	Ligante de Fas
FOX	*Forkhead box*
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HER2	Receptor de fator de crescimento epidermal humano 2
IAP	Proteína inibidora da apoptose (*Inhibitor of apoptosis protein*)
IBM	Motivo de ligação às IAPs (*IAP-binding motif*)
JNK	*c-Jun N-terminal kinases*
LMA	Leucemia mielóide aguda

ML-IAP	IAP de melanoma (*Melanoma IAP*)
MTT	3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio brometo (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)*
NAIP	Proteína inibidora da apoptose neuronal
NFκB	*Nuclear factor* kappa *B*
NES	Sequência de exportação nuclear
NLS	Sequência de localização nuclear
NPC	Complexo do poro nuclear
PBS	Solução salina de fosfato
PgP	Glicoproteína P
PTHrP	Proteína relacionada ao hormônio da paratireóide
PI3K/Akt	*Phosphoinositide 3-kinase/Akt*
PTEN	*Phosphatase and tensin homologue*
PR	Receptor de progesterona
RING	*Really interesting new gene*
RH	Receptores Hormonais
SDS	Dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)
SFB	Soro fetal bovino
SMAC/DIABLO	*Second mithocondrial-derived activator of caspases*/ *Direct IAP binding with lowPI*
STR	*Short tandem repeats*
TAB1	*TAK1-binding protein*
TAK1	*Transforming growth factor β-activated protein kinase 1*
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TBS	Solução salina de Tris
UBA	Domínio associado à ubiquitina
UBC	Conjugação à ubiquitina de Apollon
Vgl-4	*Vestigal-like 4*
XAF1	Fator associado à XIAP 1
XIAP	IAP ligada ao cromossomo X (*X-linked IAP*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura molecular dos quimioterápicos doxorrubicina (A) e paclitaxel (B), utilizados no tratamento do câncer de mama **3**

Figura 1.2: Mecanismos de resistência ao tratamento no câncer de mama **5**

Figura 1.3: Vias de indução da apoptose e inibição pelas proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) **7**

Figura 1.4: Membros da família das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) em humanos **8**

Figura 1.5: Estrutura de XIAP e função dos seus domínios **10**

Figura 1.6: Esquema simplificado dos reguladores e das funções de XIAP **12**

Figura 1.7: Mecanismos clássicos de transporte nuclear **17**

Figura 3.1: Esquema de tratamento com as drogas **24**

Figura 3.2: Figura esquemática ilustrando os vetores de XIAP utilizados neste estudo **28**

Figura 3.3: Esquema da transfecção plasmidial nas células MCF-7 e posterior tratamento com a doxorrubicina **29**

Figura 4.1: Fluxograma ilustrando o desenho experimental **30**

Figura 5.1: Expressão e localização subcelular de XIAP em um painel de linhagens celulares **31**

Figura 5.2: Alterações na viabilidade celular induzidas pela doxorrubicina (dox) nas células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^{R} **33**

Figura 5.3: Comparação do perfil de sensibilidade à doxorrubicina (dox) das linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^{R} **34**

Figura 5.4: Alterações induzidas pela doxorrubicina (dox) no padrão de formação de colônias nas células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^{R} **35**

Figura 5.5: Localização subcelular de XIAP nas células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^{R} após o tratamento com a doxorrubicina (dox) **37**

Figura 5.6: Perfil de sensibilidade de células MCF-7 e MCF-7 Tax^{R} ao paclitaxel **38**

Figura 5.7: Localização subcelular de XIAP nas células MCF-7 e MCF-7 Tax^{R} após o tratamento com o paclitaxel **39**

Figura 5.8: Expressão e localização subcelular de XIAP em células MCF-7 superexpressando os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$, XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ c\text{-}term}$ **40**

Figura 5.9: Eficiência de transfecção plasmidial através da manipulação dos níveis de DNA internalizado nas células MCF-7 **42**

Figura 5.10: Efeito da indução da superexpressão de XIAP e seus mutantes no padrão de crescimento de células de câncer de mama **44**

Figura 5.11: Taxa viabilidade celular das células MCF-7 após a superexpressão de XIAP e seus mutantes **45**

Figura 5.12: Alterações na viabilidade celular induzidas pela dox em células MCF-7 transfectadas com os vetores XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$, XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ c\text{-}term}$ **47**

Figura 5.13: Alterações induzidas pela dox no padrão de formação de colônias nas células MCF-7 superexpressando os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$, XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ c\text{-}term}$ **48**

Figura 5.14: Expressão de XIAP em células MCF-7 superexpressando os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$, XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ c\text{-}term}$ 24 e 96 horas após a transfecção **49**

Figura 5.15: Diferenças na sobrevida global de pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama agrupadas de acordo com a expressão total, citoplasmática ou nuclear de XIAP na população total e nos subgrupos positivo e negativo para receptores hormonais (RH) **50**

Figura 5.16: Diferenças na sobrevida global de pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama agrupadas de acordo com a presença de XIAP apenas na fração citoplasmática ou nuclear na população total e nos subgrupos positivo e negativo para receptores hormonais **52**

Figura 5.17: Diferenças na sobrevida global de pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama estratificadas de acordo com a positividade de receptores hormonais (RH) e localização de XIAP **53**

Figura 6.1: Figura esquemática da associação entre a localização nuclear de XIAP e um fenótipo mais agressivo no câncer de mama **65**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Estimativa da incidência de câncer de mama no Brasil no ano de 2016 **1**

Tabela 3.1: Tabela com as características da coorte de pacientes utilizada no estudo **21**

Tabela 3.2: Linhagens celulares utilizadas no estudo e suas características **23**

Tabela 3.3: Condições de plaqueamento para os experimentos realizados em linhagens celulares **23**

Tabela 3.4: Tabela esquemática de preparação dos géis para Western Blotting **26**

Tabela 3.5: Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de Western blotting **27**

Tabela 5.1: Expressão de XIAP nas pacientes pertencentes ao subgrupo positivo para receptores hormonais de acordo com os parâmetros clínico-biológicos **54**

Tabela 5.2: Expressão de XIAP nas pacientes pertencentes ao subgrupo negativo para receptores hormonais de acordo com os parâmetros clínico-biológicos **55**

SUMÁRIO

1. Introdução **1**

1.1 Câncer de mama **1**

1.2 Tratamento do câncer de mama **2**

1.3 Resistência ao tratamento **4**

1.4 Proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) **5**

1.5 XIAP **9**

1.5.1 Estrutura e função da XIAP **9**

1.5.2 Expressão de XIAP **13**

1.5.3 Localização subcelular de XIAP **14**

1.6 Justificativa para o estudo **19**

2. Objetivos **20**

2.1 Objetivo geral **20**

2.2 Objetivos específicos **20**

3. Materiais e métodos **21**

3.1 Amostras de pacientes com câncer de mama **21**

3.2 Cultura de células **22**

3.3 Tratamento das células com doxorrubicina e paclitaxel **23**

3.4 Ensaio de viabilidade celular (MTT) **24**

3.5 Ensaio clonogênico **25**

3.6 Fracionamento subcelular **25**

3.7 Western blotting **25**

3.8 Construção dos plasmídeos **27**

3.9 Transfecção Plasmidial **28**

3.10 Análises estatísticas **29**

4. Desenho Experimental do Estudo **30**

5. Resultados **31**

5.1 A expressão de XIAP nuclear é encontrada de forma mais abundante na linhagem celular resistente à dox, MCF-7 Dox^{R} **31**

5.2 As células MCF-7 Dox^{R} são resistentes à diminuição da viabilidade celular e redução da capacidade de formação de colônias induzidas pela dox 32

5.3 O tratamento com a dox não modula a localização subcelular de XIAP nas linhagens celulares estudadas 36

5.4 A expressão nuclear de XIAP também é encontrada nas células resistentes ao paclitaxel, MCF-7 Tax^{R} 36

5.5 As células superexpressando os vetores plasmidiais XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ apresentam expressão nuclear de XIAP 39

5.6 A indução da superexpressão dos vetores XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ aumenta a capacidade proliferativa das células MCF-7 43

5.7 A indução da superexpressão dos vetores XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ confere resistência ao tratamento com dox 46

5.8 A expressão de XIAP nuclear identifica uma população com pior prognóstico dentre pacientes com câncer de mama negativo para receptores hormonais 49

5.9 A expressão de XIAP citoplasmática e nuclear foi associada com fatores clínico-biológicos das pacientes com câncer de mama 53

6. Discussão 56

7. Conclusões 66

8. Perspectivas 67

9. Referências 68

ANEXO I 82

ANEXO II 83

1. Introdução

1.1 Câncer de mama

O câncer está entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde). Aproximadamente 14 milhões de novos casos são diagnosticados por ano, sendo esperado que esse número aumente em 70% nas próximas duas décadas. Dentre os tipos tumorais mais frequentemente diagnosticados, encontra-se o câncer de mama, que é a maior causa de morte em mulheres no Brasil. De acordo com estimativas recentes do Instituto Nacional de Câncer (INCA), 57.960 mulheres foram acometidas pela doença em todo o território nacional no ano de 2016, correspondendo a cerca de 30% dos tipos tumorais detectados em mulheres (Tabela 1.1). O câncer de mama é considerado de bom prognóstico quando diagnosticado em fases iniciais da doença, porém, essa neoplasia ainda é diagnosticada tardiamente no Brasil, o que compromete a eficiência do tratamento, diminuindo consideravelmente as chances de cura (Ministério da Saúde, Estimativas 2016, Incidência de Câncer no Brasil, 2016).

Tabela 1.1: Estimativa da incidência de câncer de mama no Brasil no ano de 2016

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
	Cólon e Reto	17.620	8,6%
	Colo do útero	16.340	7,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
	Estômago	7.600	3,7%
	Corpo do útero	6.950	3,4%
	Ovário	6.150	3,0%
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: Ministério da Saúde/INCA

O câncer de mama é considerado um tipo de tumor altamente heterogêneo, acompanhado de diferentes características clínicas, moleculares e histológicas, tornando a doença de difícil prognóstico e tratamento (DAI *et al.*, 2015). Uma variedade de alterações como instabilidades cromossômicas, além de mutações e alterações epigenéticas (JOVANOVIC *et al.*, 2010; CURTIS *et al.*, 2012) podem ser encontradas no câncer de mama, podendo modificar a expressão de diversos genes supressores tumorais e oncogenes. Dentre

os oncogenes usualmente alterados no câncer de mama, encontra-se o receptor de fator de crescimento epidermal humano 2 (Her2). A superexpressão de Her2 é observada em aproximadamente 15 – 20% das pacientes com carcinoma de mama, normalmente, devido à amplificação gênica e está envolvida na proliferação e sobrevivência das células tumorais (LOIBL & GIANNI 2016; RAKHA & GREEN, 2016). Entre os genes supressores tumorais mais frequentemente mutados em neoplasias, encontra-se o *TP53*. Mutações em *TP53* são encontradas em 80% dos tumores agressivos e estão associadas à progressão e prognóstico desfavorável no câncer de mama (FERNANDEZ *et al.,* 2014). Além disso, outros genes são comumente mutados no câncer de mama, como *BRCA1* (gene de susceptibilidade ao câncer de mama 1) e *BRCA 2* (gene de susceptibilidade ao câncer de mama 2) que desempenham papel na fase inicial da doença, visto que aumentam o risco para o desenvolvimento do câncer de mama hereditário (FORD *et* al., 1998; ATCHLEY *et al.* 2008).

O câncer de mama é classificado clinicamente de acordo com características histológicas, tamanho do tumor, comprometimento dos linfonodos e presença de metástases à distância. Os tumores de mama são separados em subgrupos imunohistoquímicos de acordo com a expressão de receptores hormonais (RH) de estrógeno (RE) e/ou progesterona (RP) e de Her2: RH positivos e status negativo para Her2; RH positivos e status positivo para Her2; RH negativos e status positivo para Her2; RH e status de Her2 negativos (triplo negativos) (DAI *et al.,* 2015). Esses marcadores são importantes para direcionar decisões terapêuticas, visto que são fatores preditivos de resposta a determinadas terapias (ONITILO *et al.,* 2009; MALHOTRA *et al.,* 2010; LANGLANDS *et al.,* 2013).

1.2 Tratamento do câncer de mama

O tratamento do câncer de mama se divide em local e sistêmico. O tratamento local baseia-se em radioterapia e cirurgia, enquanto o tratamento sistêmico é baseado em hormonioterapia, terapia-alvo e quimioterapia. Os pacientes positivos para ER e/ou PR são considerados pacientes positivos para RH e possuem uma terapia específica baseada na utilização do tamoxifeno e/ou inibidores de aromatase (FITZGIBBONS *et al.,* 2000; TANG *et al.,* 2016). Na terapia-alvo, se utiliza o anticorpo monoclonal trastuzumabe ou o inibidor tirosina-quinase lapatinibe em pacientes superexpressando Her2 (WOLFF *et al.,* 2007; MEDINA & GOODIN *et al.,* 2008). As pacientes classificadas como triplo negativas correspondem a cerca de 15% dos casos de câncer de mama e não possuem terapia específica,

sendo tratadas sistemicamente apenas com a quimioterapia convencional (TANG *et al.*, 2016).

A quimioterapia para o tratamento do câncer de mama se baseia na utilização de duas classes de quimioterápicos: antraciclinas (doxorrubicina ou epirrubicina) e taxanos (paclitaxel ou docetaxel) (Figura 1.1). A combinação desses quimioterápicos conduz a uma melhor resposta ao tratamento, aumentando a sobrevida das pacientes com câncer de mama (McGROGAN *et al*., 2007; BURNELL *et al.*, 2010). O paclitaxel é utilizado no tratamento de diversos tipos de tumores sólidos como ovário, próstata e mama. Tal quimioterápico tem a capacidade de interferir na dinâmica do fuso mitótico através da ligação com a β-tubulina, estabilizando os microtúbulos e levando à parada no ciclo celular, com consequente encaminhamento para morte celular (McGROGAN *et al*., 2007). A doxorrubicina (dox) é um potente agente quimioterápico utilizado no tratamento do câncer, incluindo neoplasias hematológicas e tumores sólidos, como o câncer de mama (KEIZER *et al.*, 1990). O principal mecanismo de ação da dox é intercalar ao DNA e impedir a atividade de religação da dupla fita mediada pela topoisomerase II, inibindo a sua função. Desse modo, a síntese de DNA é prejudicada e as células são direcionadas para morte. Além disso, a dox também pode gerar espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo e consequente peroxidação lipídica. Dessa forma, as membranas celulares, o DNA e as proteínas são danificados, culminando com a ativação de vias de morte celular (THORN *et al.*, 2011; TACAR *et al.*, 2012).

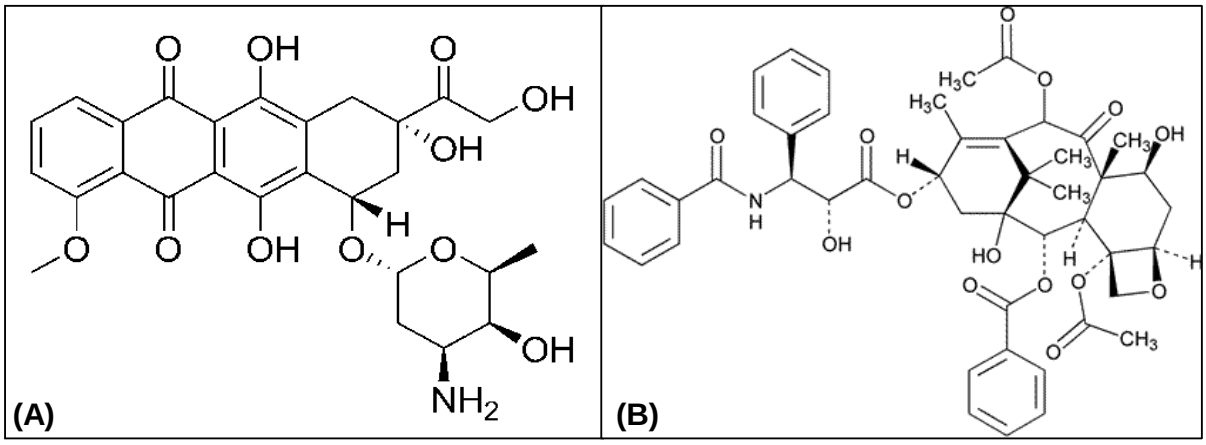


Figura 1.1: Estrutura molecular dos quimioterápicos doxorrubicina (A) e paclitaxel (B), utilizados no tratamento do câncer de mama.

1.3 Resistência ao tratamento

Apesar da melhora no tratamento com a implementação de terapias mais específicas para os subtipos do câncer de mama, uma parcela das pacientes apresenta resistência intrínseca ou adquirida ao tratamento. A resistência ao tamoxifeno pode ocorrer através do desenvolvimento de respostas adaptativas capazes de transpor o bloqueio da sinalização do estrógeno induzida pelo tamoxifeno usando vias alternativas. Por exemplo, a regulação negativa de supressores tumorais, como PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) aumenta a fosforilação da *dephosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/Akt, levando a resistência ao tamoxifeno e crescimento celular (MILLER *et al.*, 2009). A resistência ao tratamento com o anticorpo monoclonal trastuzumabe pode acontecer devido a alterações de vias *downstream* a Her2, como a via de PI3K/Akt, além de mudanças na resposta imune que levariam a morte celular (LUQUE-CABAL *et al.*, 2016). Ademais, diversos mecanismos podem ser associados à resistência aos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama (Figura 1.2). Dentre eles, podemos citar mutações e deleções em genes importantes para o controle e progressão do ciclo celular, além de alteração na expressão de genes associados com reparo ao DNA, como *TP53*, *BRCA 1* e *2* (SMITH & ISAACS., 2011; KNAPPSKOG & LONNING, 2012). A superexpressão de bombas de efluxo pertencentes à família ABC (ATP-binding cassette), como a glicoproteína P, (KENICER *et al*., 2014), alterações de moléculas-alvo de quimioterápicos, como a topoisomerase II (KONECNY *et al*., 2010), além de mutações no gene e expressão diferencial de isotipos de β-tubulina (resistência ao tratamento com taxanos), (SHALLI *et al.*, 2005) também podem ser associados à resistência aos quimioterápicos. Além disso, é observada a desregulação dos fatores de transcrição pertencentes à família *forkhead box* (FOX) com inativação dos fatores de transcrição proapoptóticos, como FOXO (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2016) e superexpressão dos membros antiapoptóticos, como o fator de transcrição FOXM1 (SABA *et al.*, 2016). Outro mecanismo de quimiorresistência bem descrito é o desbalanço entre os níveis de proliferação e morte celular, com desregulação dos membros da família Bcl-2 (SHAMAS-DIN *et al.*, 2013) e superexpressão das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) (OBEROI-KHANUJA & RAJALINGAM, 2013). A quimioressistência está intimamente ligada à resistência a apoptose, um *hallmark* do câncer, podendo contribuir para a progressão tumoral. Portanto, nosso estudo terá como foco a resistência à apoptose mediada pelos altos níveis de expressão das IAPs como um mecanismo importante para a quimiorresistência em células tumorais.

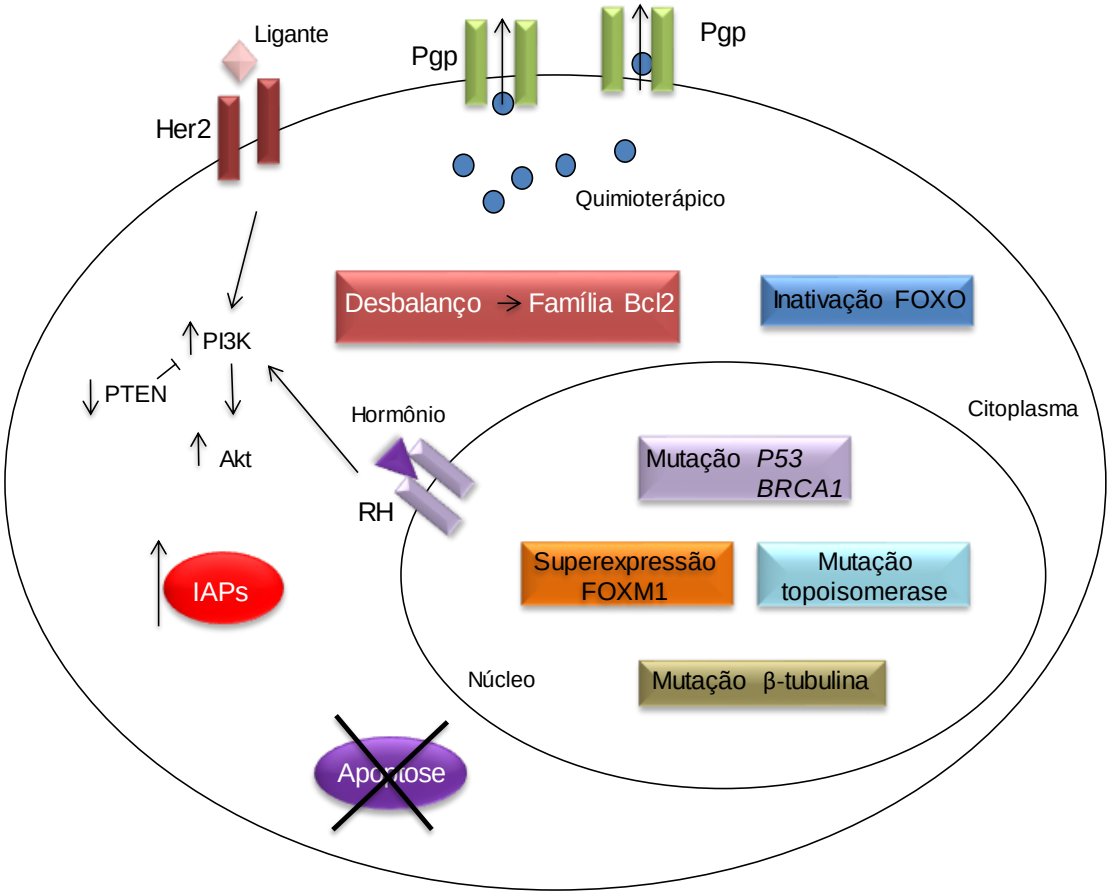


Figura 1.2: Mecanismos de resistência ao tratamento no câncer de mama. Os quimioterápicos atravessam a membrana plasmática das células por difusão simples, porém tem seus efeitos reduzidos por conta da superexpressão de bombas de efluxo, como a Pgp, que transportam a droga para fora da célula, diminuindo sua expressão intracelular. O desbalanço entre os membros da família Bcl-2, a superexpressão das IAPs, bem como inativação dos fatores de transcrição FOXO, culminam com alterações nos níveis de proliferação celular e apoptose. Além disso, a superexpressão de FOXM1 e das vias de PI3K/AKT e mutações nas topoisomerases, β-tubulina, *TP53* e *BRCA* também podem estar envolvidos na quimiorresistência. Todos esses fatores culminam com alterações nos níveis de morte celular e, consequentemente, resultam em respostas insatisfatórias ao tratamento. BRCA 1: gene de suscetibilidade ao câncer de mama 1; FOX: *forkhead box*, Pgp: Glicoproteína p; PI3K: *dephosphoinositide 3-kinase* PTEN: *phosphatase and tensin homologue*; IAPs: Proteínas inibidoras da apoptose; Her2: fator de crescimento epidermal humano 2; RH: Receptores Hormonais.

1.4 Proteínas inibidoras da apoptose (IAPs)

A apoptose é um tipo de morte celular programada, ativada classicamente por duas vias: intrínseca e extrínseca (Figura 1.3). A via intrínseca é desencadeada a partir de estímulos internos, como o tratamento com quimioterápicos e dano ao DNA. Esses estímulos alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial, culminando com a liberação de proteínas como o citocromo c, que juntamente com outras moléculas, como APAF-1 (protease apoptótica

ativadora fator 1), formam o apoptossomo, levando a ativação das caspases e apoptose. Já a via extrínseca é ativada por estímulos externos, como citocinas, a partir da ligação dos ligantes específicos a seus receptores de membrana. Moléculas adaptadoras são recrutadas por esses receptores formando um complexo de sinalização indutora de apoptose (DISC), culminando com a ativação das caspases e posteriormente, a apoptose (McILWAIN *et al.*, 2013). Esse tipo de morte é mediado pela ativação de proteases denominadas caspases que são importantes cisteína-proteases responsáveis pela clivagem de proteínas celulares através do reconhecimento de uma sequencia específica em seu substrato. As caspases envolvidas na apoptose podem ser classificadas como iniciadoras, que interagem com moléculas adaptadoras e as caspases efetoras, que dependem da ativação proteolíca mediada pelas caspases iniciadoras, para então, poderem clivar seus substratos (FULDA & VUCIC, 2012; McILWAIN *et al.*, 2013). Tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca podem ser reguladas pelas IAPs (Figura 1.3), que assumem um papel de importantes inibidores endógenos da apoptose.

As IAPs foram primeiramente descritas em baculovírus em um estudo que buscava identificar genes antiapoptóticos essenciais para a replicação viral na célula hospedeira (CROOK *et al.*, 1993). A função inicialmente postulada para tais proteínas é a regulação negativa da apoptose, através da inibição direta ou indireta de caspases. Atualmente oito membros das IAPs já foram descritos: NAIP (Proteína inibidora da apoptose neuronal ou *BIRC1*), cIAP1 (*BIRC2*), cIAP2 (*BIRC3*), XIAP (proteína inibidora da apoptose ligada ao X ou *BIRC4*), Survivina (*BIRC5*), Bruce/Apollon (enzima conjugada à ubiquitina contendo BIR ou *BIRC6*), ML-IAP (*BIRC7*) e ILP2 (*IAP-like* 2 ou *BIRC 8*) (Figura 1.4). A principal característica das IAPs é a presença do domínio BIR (*baculoviral IAP repeat*), cuja função primordial é a interação entre proteínas (SRINIVASULA & ASHWELL, 2008). Além desse domínio, algumas IAPs possuem também o domínio RING (*really interesting new gene*) que tem função ubiquitina E3 ligase responsável pela ligação de ubiquitina a proteínas e a si própria, encaminhando para degradação via proteassoma. Dessa forma, esse domínio é importante para a auto regulação e regulação de outras proteínas (FULDA & VUCIC, 2012; KOCAB & DUCKETT, 2016). Outros domínios, cujas funções ainda não estão elucidadas completamente, podem ser encontrados em alguns membros da família.

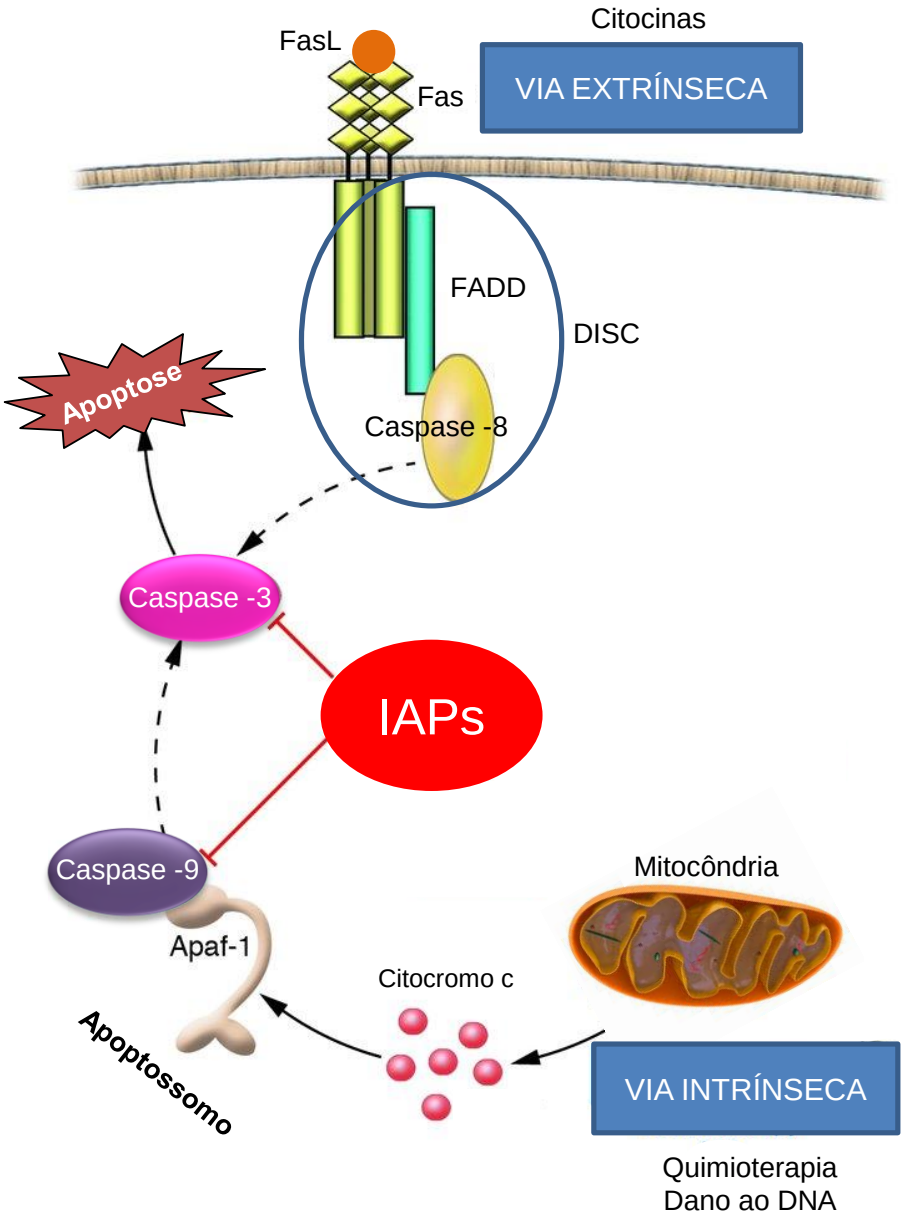


Figura 1.3: Vias de indução da apoptose e inibição pelas proteínas inibidoras da apoptose (IAPs). A via intrínseca de morte celular é iniciada por estímulos como irradiação, tratamento com agentes quimioterápicos e dano ao DNA. Subsequentemente, o potencial da membrana mitocondrial é alterado, levando a liberação do citocromo-c. No citoplasma, o citocromo-c forma um complexo denominado apoptossomo com a APAF-1, resultando na ativação das caspases e, posteriormente, na apoptose. A via extrínseca é desencadeada a partir de estímulos externos que culminam com a interação entre o ligante e seus receptores de morte específicos, exemplificados pelo Fas. Moléculas adaptadoras, como FADD, são recrutadas pelos receptores e formam o DISC, culminando com a ativação das caspases e a apoptose. Tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca podem ser reguladas pelas IAPs, que inibem direta ou indiretamente a ativação das caspases e, consequentemente, a cascata apoptótica. APAF1: protease apoptótica ativadora do fator 1; DISC: complexo de sinalização indutora de apoptose; FasL: ligante de Fas; IAPs: proteínas inibidoras da apoptose. Adaptado de WRIGHT & DUCKETT, 2005.

Dentre eles estão presentes os domínios CARD (domínio de ativação e recrutamento de caspases) e o domínio UBA (domínio associado à ubiquitina). O domínio CARD está envolvido, principalmente, na interação entre proteínas associadas às caspases e a auto regulação de cIAP1 (LOPEZ *et al.*, 2011). O domínio UBA facilita o recrutamento de outros fatores envolvidos no processo de ubiquitinação, além de participar na ligação com ubiquitina nos seus substratos (BUDHIDARMO & DAY, 2014). Outro domínio que não possui funções ainda bem elucidadas é o domínio UBC (conjugação a ubiquitina de Apollon) que assim como o domínio UBA, está associado com funções no processo de ubiquitinação e degradação via proteassoma (OBEXER & AUSSERLESHNER, 2014).

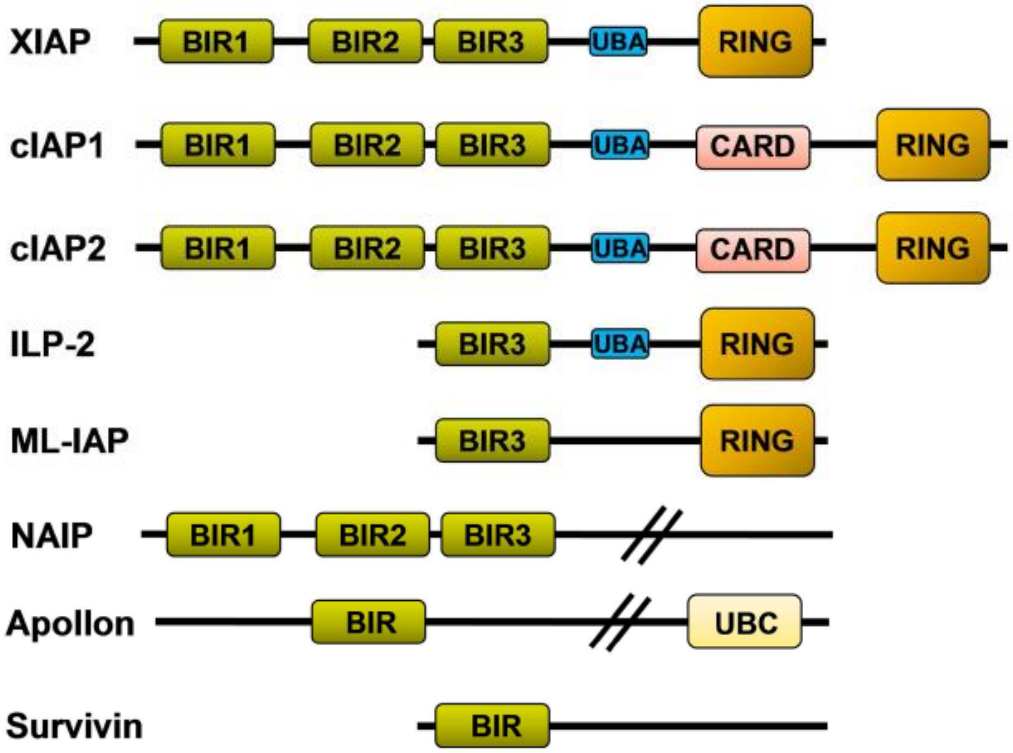


Figura 1.4: Membros da família das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) em humanos. A figura mostra os principais domínios presentes nas IAPs. BIR: *baculoviral IAP repeat*; RING: *really interesting new gene*; UBC: conjugação à ubiquitina de Apollo; UBA: domínio associado à ubiquitina); CARD: domínio de ativação e recrutamento de caspases.. NAIP: Proteína inibidora da apoptose neuronal ou *BIRC1*; cIAP1: *Cellular inhibitor of apoptosis 1* ou *BIRC2;* cIAP2: *Cellular inhibitor of apoptosis 2* ou *BIRC3*; XIAP: proteína inibidora da apoptose ligada ao X ou *BIRC4*, Survivina (*BIRC5*), Bruce/Apollon (enzima conjugada à ubiquitina contendo BIR ou *BIRC6*), ML-IAP (*BIRC7*) e ILP2 (IAP-*like* 2 ou *BIRC 8*). Adaptado de OBEXER & AUSSERLESHNER, 2014.

A função tradicionalmente associada às IAPs é a inibição das caspases e, consequentemente, o bloqueio das vias apoptóticas, porém diversos estudos mostram que essas proteínas podem estar envolvidas em diferentes funções biológicas, além de seu papel

na inibição da morte celular. Como exemplos da diversidade de outras funções onde as IAPs já foram implicadas, temos a participação na formação do fuso mitótico e divisão celular (MITA *et al*., 2008), regulação de outras vias de sinalização, como ativação das vias de NFκB e JNK1 (SANNA *et al.*, 2002; KOCAB & DUCKETT, 2016), metabolismo do cobre (MUFTI *et al*., 2007), ubiquitinação de proteínas e encaminhamento para degradação via proteassoma (BUDHIDARMO & DAY, 2014) e indução de migração e proliferação celular (LIU *et al*., 2011; OBEROI-KHANUJA & RAJALINGAM, 2013). Dentre os membros das IAPs descritos, no presente estudo será dada uma atenção especial a XIAP como molécula envolvida na quimiorresistência e potencial alvo terapêutico no câncer de mama.

1.5 XIAP

1.5.1 Estrutura e função da XIAP

A XIAP foi identificada por LISTON *et al*. (1996) a partir de uma análise em banco de dados utilizando o programa BLAST com sequência de IAPs em *Cydia pomonella*. Nesse estudo, foi possível identificar a sequência responsável por codificar a proteína presente no cromossomo X, que foi denominada XIAP. Em termos estruturais, a XIAP possui três domínios BIR (BIR1, BIR2 e BIR3) na porção N-terminal e os domínios UBA e RING estão contidos na porção C-terminal (Figura 1.5) (OBEXER & AUSSERLECHNER, 2014). Os diferentes domínios da XIAP estão associados a interações proteicas diversas e, consequentemente, funções distintas. Através do domínio BIR2, a XIAP interage com as caspases efetoras -3 e -7, e pelo domínio BIR3, a XIAP interage com a caspase iniciadora -9, se ligando diretamente e inibindo-as efetivamente (SCOTT et al., 2005), interferindo tanto com a via intrínseca quanto a via extrínseca da apoptose. Por ser capaz de estabelecer uma ligação inibitória potente e estável com as caspases, a XIAP é considerada a IAP com o maior potencial antiapoptótico e por conta disso, é uma das IAPs mais estudadas (OBEXER & AUSSERLECHNER, 2014).

Adicionalmente ao seu papel na inibição de caspases, o domínio BIR1 da XIAP interage diretamente com TAB1 (*TAK1-binding protein*) que está *upstream* na via de ativação da quinase TAK1 (*transforming growth factor β-activated protein kinase 1*), culminando com a ativação de NFκB (*nuclear factor* kappa *B*), fator de transcrição envolvido em processos de progressão tumoral, angiogênese, invasão e metástase (LU, *et al.*, 2007). Nesse estudo, também foi demonstrado, através da utilização de plasmídeos de XIAP com deleção do

domínio RING, que esse domínio não parece desempenhar função na ativação da via de NFκB. O domínio UBA de XIAP participa do processo de sinalização dependente de ubiquitina (TSE *et al.*, 2011). GYRD-HANSEN *et al.* (2008) demonstraram que, embora o domínio UBA seja dispensável para a função inibitória das caspases exercida pela XIAP, esse domínio, assim como o BIR1, possui papel importante na ativação de NFκB. Nesse mesmo estudo, foi visto que a expressão de XIAP mutante para UBA e para BIR1, impediu a ativação de NFκB. Já o domínio RING da XIAP possui função de ubiquitina E3 ligase, que se liga à ubiquitina E2 ligase e promove a transferência direta da ubiquitina para sua proteína alvo, que pode ser SMAC/DIABLO (*Second mitochoncrial-derived activator of caspases/Direct IAP binding with low PI*) e caspase-9 (MORIZANE *et al.*, 2005) ou a própria XIAP (YANG *et al.*, 2000). Além disso, o domínio RING é importante para a ubiquitinação de XIAP por outras IAPs, como a cIAP1. Tal proteína, assim como XIAP, possui o domínio RING e a partir dele, é capaz de marcar a XIAP para degradação por vias dependentes e independentes de ubiquitina (CHEUNG *et al.*, 2008). Esses dados mostram que o domínio RING desempenha um papel importante na regulação dos níveis de XIAP. Em geral, as proteínas-alvo de ubiquitinação de XIAP são proteínas com função pró-apoptótica, sugerindo que o domínio RING também seja importante para a regulação negativa da apoptose promovida pela XIAP.

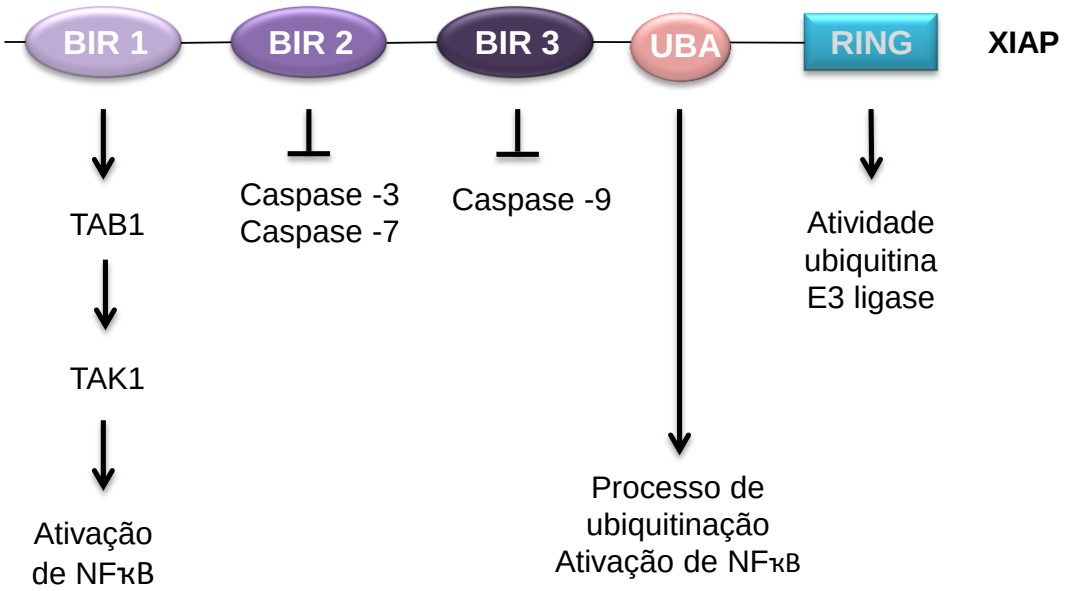


Figura 1.5: Estrutura da XIAP e função dos seus domínios. A figura mostra os domínios presentes na XIAP e suas funções. BIR: *baculoviral IAP repeat*; NFκB: *nuclear factor* kappa *B* RING: *really interesting new gene*; UBA: domínio associado à ubiquitina; TAB1:*TAK1-binding protein*); TAK1: *transforming growth factor β-activated protein kinase 1*.

A XIAP também está envolvida na regulação da homeostase do cobre (MUFTI *et al.*, 2007). BURSTEIN *et al.* (2004) demonstraram que fibroblastos derivados de camundongos *knockout* para XIAP apresentam níveis menos elevados de cobre quando comparados com fibroblastos de camundongos normais. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que XIAP pode promover a ubiquitinação e degradação da proteína COMMD1 *COMM [copper metabolism Murr1 (mouse U2af1-rs1 region 1)] domain-containing*, proteína envolvida na regulação dos níveis intracelulares de cobre. De forma interessante, COMMD1 funciona como regulador negativo de NFkB, através da ubiquitinação e degradação via proteassoma de subunidades de NFkB (MAINE *et al*., 2007). Esse dado aponta para outra forma de ativação indireta de NFkB por XIAP através da diminuição dos níveis de COMMD1. Além disso, também foi demonstrado que a função ubiquitina E3 ligase exercida pelo domínio RING da XIAP é importante para degradação de COMMD1 via proteassoma. MAINE *et al.* (2009) demonstraram que as células HEK-293 transfectadas com a forma mutante de XIAP - H467A (mutação pontual que impacta na função de ubiquitina E3 ligase), faz com que os níveis de COMMD1 não sejam alterados, mostrando o papel importante exercido pela função ubiquitina E3 ligase da XIAP na regulação de outras proteínas. A expressão de XIAP também já foi relacionada com migração e invasão celular em células tumorais. MEHROTRA *et al.* (2010) demostraram que a inibição de XIAP diminuiu a migração e invasão celular em células derivadas de câncer de mama e próstata, independentemente de sua função inibitória de caspases, uma vez que foram utilizados mutantes de XIAP que impedem a ligação da proteína com as caspases. Além disso, a XIAP foi associada a funções exercidas no sistema imune. CONTE *et al.* (2001) observaram que camundongos deficientes para XIAP apresentaram perturbação na maturação dos linfócitos T, apontando para um possível papel de XIAP na manutenção do sistema imune. BAULER *et al.* (2008) mostraram que XIAP é requerida para o controle da resposta imune inata na infecção por *Listeria monocytogenes*. Nesse estudo, foram avaliados camundongos deficientes para XIAP e foi observado que esses camundongos apresentaram maior infecção bacteriana e menor sobrevida quando comparados com os camundongos normais. Ainda foi visto nesse mesmo estudo que XIAP regula o sistema imune através da ativação de vias dependentes de NFkB e JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), e também pela indução da produção de citocinas pró-inflamatórias após a infecção bacteriana *in vitro* e *in vivo.* Em conjunto, esses dados mostram que a XIAP pode estar envolvida em diferentes processos biológicos além de sua função na inibição da apoptose.

A XIAP pode ser regulada negativamente pela SMAC/DIABLO e HtrA2/Omi. Essas proteínas estão localizadas na mitocôndria das células e são liberadas para o citoplasma após

estímulos apoptóticos e alterações na permeabilidade da membrana mitocontrial. No citoplasma, SMAC/DIABLO e HtrA2/Omi podem se ligar à XIAP através de um domínio específico denominado IBM (motivo de ligação as IAPs), e atuam como inibidores competitivos das caspases, impedindo assim a função inibitória das caspases exercidas pela XIAP (Figura 1.6) (SEONG *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2007).

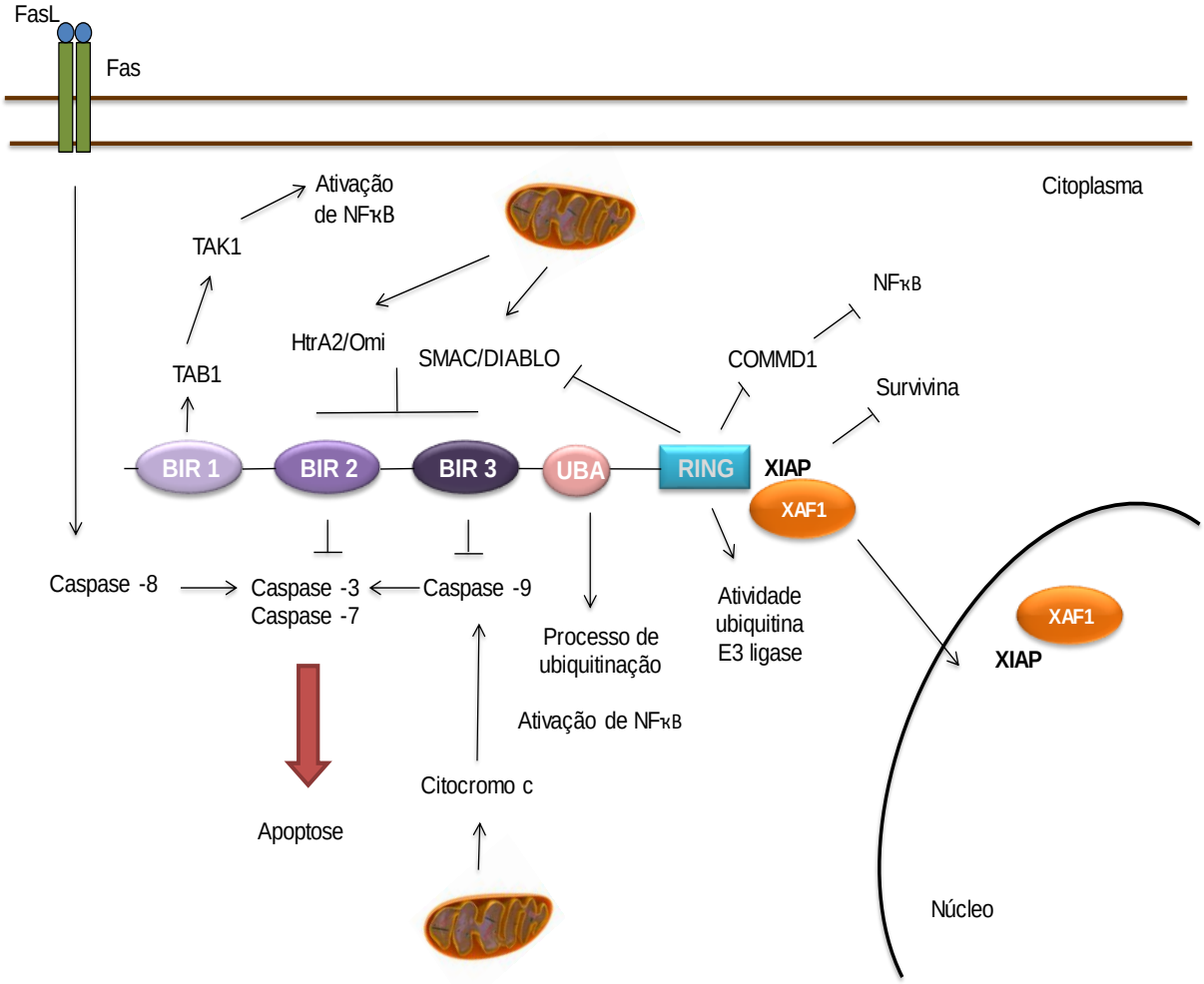


Figura 1.6: Esquema simplificado dos reguladores e das funções de XIAP. A XIAP inibe a apoptose através da ligação direta às caspases -9, -3 e -7, impedindo a ativação de ambas as vias da apoptose. Paralelamente, a XIAP também está envolvida em processos de ubiquitinação de proteínas-alvo e ativação de NFκB. A XIAP é regulada negativamente pela SMAC/DIABLO e HtrA2/Omi, que são liberadas pela mitocôndria após estímulo apoptótico. A XIAP também pode ter a sua função inibida pela XAF1 que se liga a XIAP translocando-a para o núcleo e afastando-a de seu papel antiapoptótico. XAF1 também forma um complexo com XIAP capaz de inibir a expressão de Survivina. O domínio RING da XIAP é responsável pela ubiquitinação e degradação de proteínas, como SMAC/DIABLO e COMMD1, proteína envolvida no metabolismo do cobre e reguladora negativa da ativação de NFκB. SMAC/DIABLO: XAF1: Fator associado a XIAP 1; BIR: *baculoviral IAP repeat*; NFκB: *nuclear factor* kappa *B;* RING: *really interesting new gene*; UBA: domínio associado à ubiquitina; TAB1:*TAK1-binding protein*); TAK1: *transforming growth factor β-activated protein kinase 1*.

Além disso, MACFARLANE *et al.* (2002) demonstraram que XIAP promove a ubiquitinação e encaminhamento para degradação via proteassoma de SMAC/DIABLO, apontando para a regulação negativa entre essas proteínas. A XIAP também pode ser regulada pela proteína supressora tumoral, XAF1 (fator associado a XIAP 1). LISTON *et al.* (2001) avaliaram a localização de XAF1 e XIAP em células co-transfectadas com ambas as proteínas. Foi observado que XAF1 desencadeia a redistribuição de XIAP do citoplasma para o núcleo, afastando-a do seu papel bem estabelecido de inibição de caspases exercido no citoplasma. A XAF1 também pode formar um complexo com XIAP que ubiquitina e encaminha Survivina para degradação via proteassoma, de maneira dependente da atividade E3 ligase da XIAP (ARORA *et al.,* 2007).

1.5.2 Expressão de XIAP

A expressão de XIAP pode ser detectada tanto em tecidos normais quanto em neoplásicos, sendo sua expressão elevada encontrada em diversos tipos tumorais (VISCHIONI e*t al.,* 2006). A superexpressão de XIAP pode ser associada a um prognóstico adverso em pacientes com inúmeros tipos de câncer, tais como renal (RAMP *et al.,* 2004), pulmão (HOFMAN *et al.,* 2002), linfomas (MURIS *et al.,* 2005) e leucemia mielóide aguda (LMA) (TAMM *et al.,* 2000). De forma consistente, altos níveis de XIAP promovem a resistência às drogas em diversos modelos *in vitro* de células tumorais. Em linhagens celulares derivadas de câncer pancreático, o silenciamento de XIAP diminui a resistência à gencitabina, quimioterápico utilizado no tratamento desse tipo de câncer (SHRIKHANDE *et al.,* 2006). A resistência à cisplatina em células derivadas de câncer de próstata também foi correlacionada com a expressão de XIAP, e o silenciamento da XIAP induziu apoptose e aumentou a sensibilidade ao tratamento nessas células (AMANTANA *et al.,* 2004). SILVA *et al.* (2013) demonstraram que o silenciamento de XIAP também sensibiliza as células derivadas de leucemia mielóide crônica ao tratamento com imatinibe. Além de associada à quimiorresistência, altos níveis de XIAP também são correlacionados com a resistência a radioterapia. FLANAGAN *et al.* (2015) identificaram a expressão elevada de XIAP como indicativo para radiorresistência em amostras de pacientes com câncer colorretal. Em conjunto, esses achados indicam o papel na resistência ao tratamento do câncer exercido pela XIAP, seja à quimio ou radioterapia, em linhagens celulares derivadas dos mais diversos tipos tumorais.

A expressão de XIAP também pode ser detectada em altos níveis em amostras de pacientes com câncer de mama. Estudos demonstram que a sua expressão pode ser encontrada em 65 (JAFFER *et al.,* 2007) a 83% (ZHANG *et al.,* 2011) das pacientes. Apesar de os percentuais de positividade variarem consideravelmente, a expressão de XIAP foi associada a uma sobrevida global reduzida (PANDEY *et al.,* 2016) e ao grau de invasividade do tumor (JAFFER *et al.,* 2007). AIRD *et al.* (2010) mostraram que a expressão de XIAP está associada com a resistência ao tratamento e sua expressão esteve associada a um prognóstico desfavorável em pacientes com câncer de mama. Contradizendo esses achados, PARTON *et al.,* (2002), HINNIS *et al* (2007) e KLEINBERG *et al* (2007) observaram que a XIAP pôde ser detectada em altos níveis em amostras de pacientes com câncer de mama, porém sua expressão não foi correlacionada à nenhum parâmetro clínico-biológico. O conjunto dessas evidências mostra que o valor prognóstico da XIAP ainda se apresenta de forma controversa no câncer de mama, portanto mais estudos se tornam necessários para elucidar essa questão. Estudos *in vitro* demonstram que a diminuição dos níveis de XIAP e o uso de miméticos de SMAC/DIABLO – que antagonizam a ação inibitória da apoptose mediada pelas IAPs - sensibilizam as linhagens celulares triplo negativas derivadas de câncer de mama, como as células MDA-MB-231, à morte celular (GONZÁLEZ-LÓPEZ et al., 2011). AIRD *et al.,* (2008) mostraram que o silenciamento dos níveis de XIAP sensibilizou as células superexpressando Her2 ao tratamento com trastuzumabe. Isso mostra que a modulação da expressão de XIAP pode representar uma estratégia interessante para o câncer de mama do ponto de vista terapêutico.

1.5.3 Localização subcelular de XIAP

O padrão de distribuição subcelular de XIAP é heterogêneo, tanto em células normais quanto em células tumorais, e pode variar de acordo com o tipo celular. Em células normais, a XIAP é encontrada, predominantemente, na porção citoplasmática, porém em alguns tipos celulares, como os ácinos pancreáticos e nas células de Sertolli, a XIAP pode ser encontrada também na porção nuclear (VISCHIONI *et al.,* 2006). Em células neoplásicas, a XIAP foi detectada apenas no citoplasma em amostras de pacientes com leucemia linfocítica crônica (SILVA *et al*., 2006), tumores de pulmão (FERREIRA *et al*., 2001) e ovário (LI *et al*., 2001). FERREIRA *et al.,* (2001) detectaram expressão exclusivamente no citoplasma no câncer de pulmão, porém a expressão de XIAP não foi capaz de predizer pacientes que responderiam a quimioterapia. Em linhagens celulares de próstata foi possível a detecção nuclear de XIAP,

apesar de a expressão citoplasmática ser mais proeminente e não ser correlacionada a nenhum outro parâmetro (McELENY *et al.*, 2002). LIU *et al.,* (2001) demonstraram que a expressão e localização subcelular de XIAP foi difusa e predominantemente citoplasmática, porém foi possível observar marcação nuclear em pacientes com carcinoma cervical. A localização nuclear de XIAP foi detectada no linfoma difuso de grandes células B, não sendo correlacionada com o prognóstico (FACCION *et al.*, 2012). RAMP *et al.,* (2004) detectou positividade para a expressão de XIAP em cerca de 95% dos pacientes com carcinoma renal. Nesse estudo, foi encontrada heterogeneidade intratumoral na expressão e localização subcelular de XIAP, portanto os pacientes não foram separados quanto à localização subcelular e sim foram separados em níveis altos e baixos de XIAP, onde altos níveis foram associados com estadiamento e grau do tumor. TAMM *et al.,* (2000) não avaliaram a localização subcelular de XIAP nas amostras de pacientes de LMA. Nesse estudo, apenas os níveis proteicos e de mRNA foram avaliados e associados com a sobrevida global reduzida nos pacientes que apresentaram altos níveis de XIAP. No câncer de mama, ZHANG *et al.* (2011) mostraram que a expressão de XIAP pode ser encontrada em 83% das pacientes avaliadas. Nesse trabalho, foi detectada a expressão de XIAP em diferentes compartimentos subcelulares e a expressão nuclear foi considerada um marcador independente de prognóstico adverso nessas pacientes. Corroborando esse achado, um estudo recente do nosso grupo mostrou que a expressão de XIAP pode ser encontrada em diferentes compartimentos subcelulares em amostras de pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama (NESTAL DE MORAES *et al.,* 2015). Nesse estudo, demonstramos que a co-expressão de XIAP nuclear, de Survivina e do fator de transcrição oncogênico FOXM1 identificou pacientes com prognóstico desfavorável, diferentemente da expressão citoplasmática da XIAP. Em conjunto, essas evidências indicam que a XIAP pode ser encontrada em diferentes compartimentos subcelulares e em diferentes tipos tumorais, sendo seu valor prognóstico ainda não elucidado completamente.

Estudos mostram que a XIAP pode ser translocada do citoplasma para o núcleo mediante determinados estímulos, sugerindo que a localização subcelular de XIAP seja um processo dinâmico. SIEGELIN *et al.,* (2005) e RUSSEL *et al.* (2008) observaram que a localização subcelular de XIAP é predominantemente citoplasmática ou perinuclear em condições normais, porém quando as células do cérebro de ratos são expostas à isquemia cerebral, a localização subcelular de XIAP é mais difusa, encontrando marcações tanto no citoplasma quanto no núcleo. Além disso, esses trabalhos mostram co-localização de XIAP e XAF1, sugerindo que XAF1 pode translocar XIAP para o núcleo também nesse modelo,

assim como demonstrado por LISTON *et al.*, (2001). Outra proteína que também pode estar envolvida na translocação de XIAP para o núcleo é a Vgl-4, cofator transcricional do músculo esquelético. JIN *et al.* (2011) identificaram a proteína Vgl-4 (*Vestigal-like 4*), como carreadora de XIAP para o núcleo. A Vgl-4 interage diretamente com outras IAPs, cIAP 1 e cIAP2, além da XIAP e desencadeia mudança na distribuição subcelular dessas proteínas. Além disso, foi demonstrado que XIAP pode ser translocada para o núcleo a partir da indução de apoptose após o tratamento de células de linfoma com quimioterápicos (NOWAK *et al*., 2004). Nesses trabalhos, a translocação de XIAP para o núcleo é associada a um fenótipo de sensibilidade a morte celular, principalmente devido ao afastamento da XIAP da sua função inibitória de caspases, e consequentemente do seu papel na inibição da apoptose. Contrastando esses achados, CAO *et al.* (2014) mostraram que células de carcinoma de cólon transfectadas com uma forma mutante de XIAP, com deleção do domínio RING, apresentam a XIAP no núcleo, desempenhando um papel na sobrevivência celular. Esse estudo mostrou que a XIAP no núcleo interage diretamente com o fator de transcrição E2F1, resultando no aumento da expressão de ciclina E e da capacidade proliferativa das células. Esses dados sugerem que a XIAP pode exercer diferentes papéis dependentes de sua localização subcelular e do modelo em estudo. Apesar de a mudança da localização subcelular de XIAP já ter sido demonstrada em alguns modelos, os mecanismos envolvidos com o transporte núcleo-citoplasmático de XIAP não foram explorados até o presente momento.

O transporte de macromoléculas para dentro do núcleo se dá a partir de estruturas moleculares presentes na membrana nuclear, chamadas de complexos do poro nuclear (NPC), que compreendem cerca de 30 proteínas denominadas nucleoporinas. Esses canais, com cerca de 30 nm de diâmetro, permitem a passagem de íons e moléculas pequenas de até 40 kDa por difusão simples. Porém, para a passagem de moléculas maiores, é necessário que essas proteínas contenham sinais específicos em sua estrutura. Esses sinais são chamados de sequência de localização nuclear (NLS) para importação nuclear, ou sequência de exportação nuclear (NES) (Figura 1.7). Tais sinais são reconhecidos por fatores solúveis que utilizam as RanGTPases para coordenar a importação e exportação de proteínas no núcleo (LANGE *et al.*, 2007; MARFORI *et al.*, 2010). O processo de exportação nuclear é baseado na ligação da proteína cargo contendo NES com um receptor de exportação, denominado exportina. Todas as exportinas necessitam da presença da RanGTP para que aconteça a ligação com a proteína cargo que será exportada do núcleo. Ran é uma proteína ligada a GTP (guanosina trifosfato) ou GDP (guanosina difosfato), importante para todo o processo de importação e/ou exportação nuclear. É formado um complexo proteína-exportina-RanGTP que é rapidamente

translocado para o citoplasma, através dos NPCs. Esse complexo é dissociado através da hidrólise de GTP, induzida pela proteína citoplasmática RanGAP (Proteína ativada por RanGTPase) e as exportinas voltam para o núcleo. A distribuição de Ran é assimétrica, sendo mais abundante sua forma associada à GTP no núcleo e GDP no citoplasma (KAFFMAN & O'SHEA, 1999).

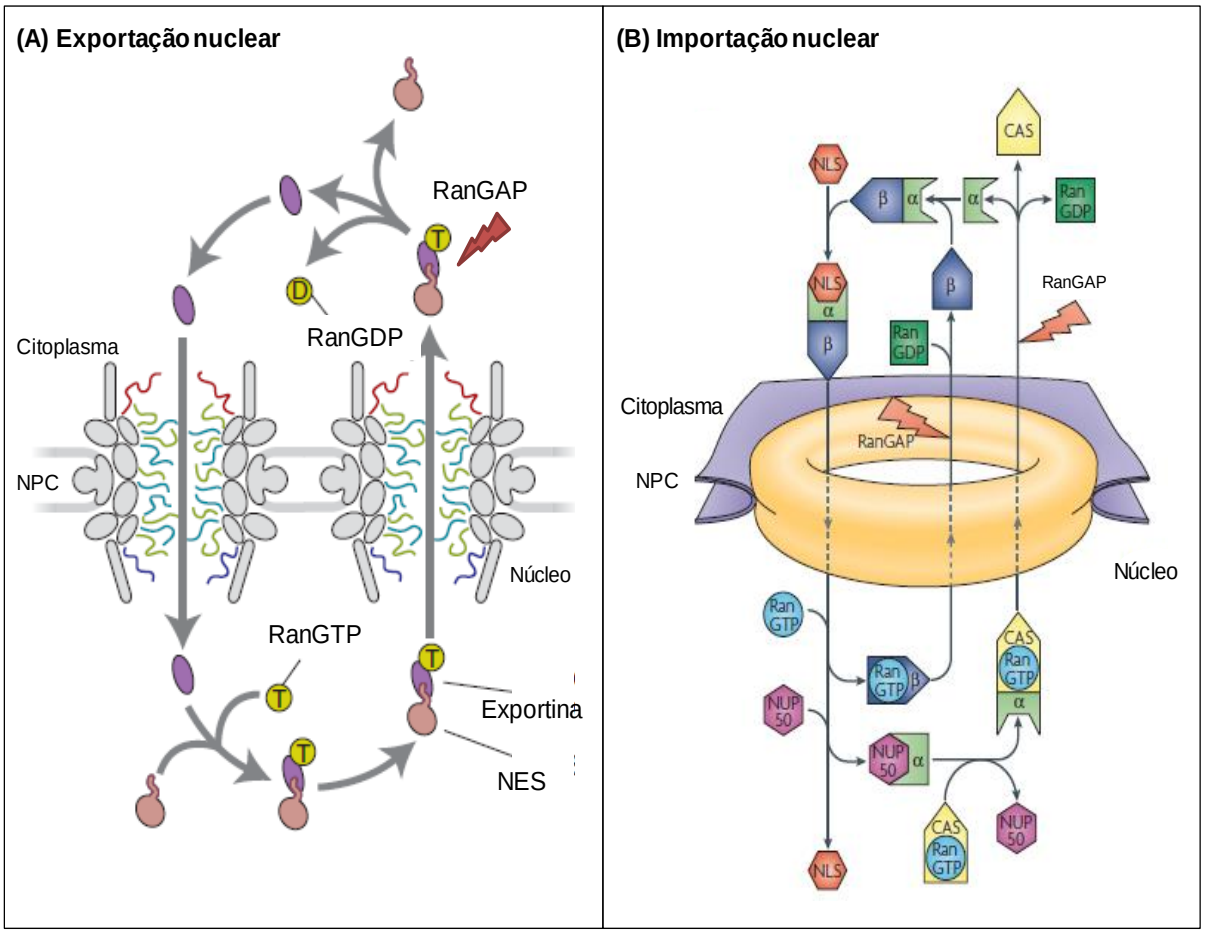


Figura 1.7: Mecanismos clássicos de transporte nuclear. (A) Exportação nuclear: As proteínas que são endereçadas para fora do núcleo possuem NES. O NES é reconhecido por exportinas presentes no núcleo que, juntamente com a RanGTP, são levadas para o citoplasma. Uma vez no citoplasma, esse complexo é hidrolisado pela RanGAP culminando com a sua dissociação, liberação da proteína cargo no citoplasma e volta da exportina para o núcleo. (B) Importação nuclear: As proteínas que possuem o NLS interagem com as importinas e passam pelo NPC em direção ao núcleo. Uma vez no núcleo, o complexo é dissociado por enzimas como NUP50 e RanGTP e a proteína cargo é liberada. As importinas interagem com fatores importantes de transporte, como CAS e RanGTP e então, são levadas novamente ao citoplasma para exercer mais um *round* de transporte núcleo-citoplasma. GTP: guanosina difosfato; NPC: complexos do poro nuclear; NES: sequência de exportação nuclear; NLS: sequência de localização nuclear; RanGAP: Proteína ativada por RanGTPase. Adaptado de STEWART (2007) e WENTE & ROUT (2010).

As proteínas que serão translocadas para o núcleo devem conter o NLS. Esse sinal é reconhecido pela proteína adaptadora importina α que medeia a interação do substrato com a importina β, na via de transporte nuclear clássico. As importinas β funcionam como receptores nucleares de transporte. A proteína cargo se associa, através do NLS, com as importinas e então é encaminhada para o núcleo. Uma vez no núcleo, nucleoporinas como NUP50, e RanGTP catalisam a dissociação do complexo proteína-importina, e a proteína cargo é liberada no núcleo. A importina α se dissocia da importina β e se liga ao seu receptor de exporte, CAS, que interage com RanGTP formando um complexo trimérico que então é transportado para o citoplasma, liberando a importina α, através da hidrólise de GTP pela RanGAP, para continuar exercendo sua função no importe de substratos para dentro do núcleo. A importina β também interage com RanGTP e sai do núcleo, através da hidrólise de GTP pela Ran-GAP para mais um *round* de importação nuclear (Figura 1.7) (STEWART, 2007; FREITAS & CUNHA, 2009).

Os NLS são, classicamente, sequências pequenas caracterizadas pela presença de aminoácidos básicos, como lisina (K) e arginina (R), em sua sequência. Tais aminoácidos são importantes para o reconhecimento das proteínas pela importina α, responsável pelo endereçamento para o núcleo. Dois tipos de NLSs são considerados clássicos: os NLS monopartidos que consistem, basicamente em um *cluster* de aminoácidos básicos, ou, os NLS bipartidos, caracterizados pela sequência de dois *clusters* de aminoácidos básicos separados por 10-12 resíduos (FONTES *et al.*, 2000; HODEL *et al.*, 2001; LANGE *et al.*, 2007). O primeiro NLS monopartido descrito foi o NLS presente no antígeno T do vírus SV40 (PKKKRKV) (KALDERON *et al.*, 1984). Um exemplo de NLS bipartido é o presente na sequência da nucleoplasmina (KR[PAATKKAGQA]KKKK), proteína que se liga a histonas na formação e montagem dos nucleossomos (ROBBINS *et al.*, 1991). Além dos NLS clássicos, existem os chamados NLS não clássicos, que são sequências reconhecidas por receptores específicos da família das importinas β sem a interação com a importina α. Alguns fatores de transcrição, como Smad-3 e PTHrP (proteína relacionada ao hormônio da paratireóide), se ligam diretamente a importina β e são translocados para o núcleo (CINGOLANI *et al.*, 2002). Outros exemplos de NLS não clássicos são os presentes na proteína ribossomal rpL23a, onde a sequência responsável por translocá-la para o núcleo contém 42 aminoácidos, com diversos aminoácidos básicos, e na proteína c-myc, que contém uma sequência de nove aminoácidos, sendo que apenas três são básicos (DANG & LEE, 1988). Portanto, existem diversas sequências responsáveis pela translocação nuclear de proteínas que são diferentes das classicamente descritas (JAKEL & GORLICH *et al.*, 1988;

FREITAS & CUNHA, 2009). Para as proteínas que não apresentam o NLS clássico nem o não clássico, como é o caso da XIAP, o transporte se dá a partir da interação com outras proteínas que possuem o NLS em sua estrutura. A XIAP interage com XAF1 (LISTON *et al.*, 2001) e Vgl-4 (JIN *et al.,* 2011) como citado anteriormente, e por conta dessa interação, ela é translocada do citoplasma para o núcleo das células. Outras possíveis proteínas envolvidas no transporte nuclear de XIAP não foram descritas e ainda precisam ser identificadas, para um melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pelo transporte nuclear de XIAP.

1.6 Justificativa para o estudo

A XIAP já foi amplamente estudada em relação à inibição de caspases e quimiorresistência, funções associadas à sua presença no citoplasma. Porém, ainda não está elucidado o papel exercido quando a XIAP se encontra no núcleo das células tumorais, tampouco foram descritos os mecanismos envolvidos no transporte nuclear de XIAP. A presença de XIAP no núcleo, como a induzida pelo sequestro pela XAF1 (LISTON *et al.,* 2001) foi classicamente considerada um evento interessante do ponto de vista terapêutico, devido ao afastamento da XIAP de seu papel antiapoptótico no citoplasma. Entretanto, mais recentemente, outros trabalhos mostraram que a XIAP no núcleo pode desempenhar um papel oncogênico, interagindo com o fator de transcrição E2F1 e levando ao aumento na capacidade proliferativa das células tumorais (CAO *et al.,* 2014), além de conferir um pior prognóstico para pacientes oncológicos (ZHANG *et al.,* 2011). O câncer de mama possui alta incidência no Brasil e no mundo e apesar da melhoria no tratamento com a implementação de terapias mais específicas, uma parcela das pacientes ainda são resistentes ao tratamento (DAI *et al.,* 2016). Portanto, a identificação de novos biomarcadores no câncer de mama se faz necessário. Além disso, se torna importante o estudo do possível papel exercido por XIAP nuclear e seu impacto na proliferação celular, resistência às drogas e no prognóstico, a fim de identificar possíveis biomarcadores no câncer de mama, bem como prover uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares de quimiorresistência nessa neoplasia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Avaliar o papel da localização subcelular de XIAP na proliferação celular, resistência às drogas e no prognóstico no câncer de mama.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a localização subcelular de XIAP em linhagens celulares derivadas de câncer de mama e células não neoplásicas de mama;

- Verificar a associação entre a localização subcelular de XIAP e o perfil de sensibilidade e/ou resistência observado nas linhagens celulares de câncer de mama;

- Investigar se ocorre a modulação da localização de XIAP após o tratamento com as drogas utilizadas no tratamento do câncer de mama;

- Avaliar o papel da localização subcelular de XIAP na capacidade proliferativa através da indução da superexpressão de XIAP nuclear nas células de câncer de mama;

- Analisar o papel da localização subcelular de XIAP na resistência à dox através da indução da superexpressão de XIAP nuclear nas células de câncer de mama quimiossensíveis;

- Analisar o papel da localização subcelular de XIAP no prognóstico das pacientes com câncer de mama;

- Investigar a correlação entre a expressão de XIAP no núcleo ou no citoplasma e as características clinico-biológicas das pacientes com câncer de mama.

3. Materiais e métodos

3.1 Amostras de pacientes com câncer de mama

A expressão de XIAP foi previamente avaliada por imunohistoquímica para um estudo anterior com amostras de pacientes com câncer de mama (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015). Brevemente, a coorte inclui 145 pacientes diagnosticadas entre 2001 e 2006 no INCA em estágio IIIa, como mostrado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Tabela com as características da coorte de pacientes utilizada no estudo.

	Número dos casos (%)
Pacientes	**145**
Idade ao diagnóstico	**n=145**
18-49	64 (44)
50-69	81 (56)
Tamanho do tumor (cm)	**n=124**
T1 (≤2)	27 (21,7)
T2 (2.1 - 5)	81 (65,3)
T3 (≥5)	16 (12,9)
Comprometimento linfonodal	**n=63**
1 - 3	25 (39,7)
4 - 9	20 (31,7)
≥ 10	18 (28,6)
Invasão vascular	**n=95**
Sim	52 (54,7)
Não	43 (45,3)
Expressão de Receptores Hormonais	**n=145**
Sim	100 (69)
Não	45 (31)
Her2	**n=141**
Sim	13 (9.2)
Não	128 (90.8)
Expressão total de XIAP	**n=138**
Sim	108 (78.3)
Não	30 (21.7)
XIAP citoplasmática	**n=138**
Sim	91 (65.9)
Não	47 (34.1)
XIAP nuclear	**n=138**
Sim	31 (22.5)
Não	107 (77.5)

Adaptada de NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015

De acordo com a classificação TNM de tumores malignos (2009), pacientes com o estágio IIIa apresentam o tamanho do tumor variando de T1 a T3, comprometimento nodal e ausência de metástases. As pacientes incluídas nesse estudo não receberam quimioterapia neoadjuvante. Para a realização do presente estudo, os dados referentes à expressão de XIAP foram reanalisados com enfoque no impacto da sua localização nuclear ou citoplasmática na sobrevida global das pacientes. A sobrevida global foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data do óbito. A expressão e localização de XIAP foram correlacionadas com os parâmetros clinico-biológicos das pacientes: idade, grau do tumor, tamanho do tumor, número de linfonodos acometidos, presença de invasão vascular e expressão de RH e de Her2. As informações clínicas referentes às pacientes com câncer de mama foram obtidas através de prontuários. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do INCA sob o número 153/09.

3.2 Cultura de células

Nesse estudo, foram utilizadas as linhagens celulares MCF-7, MCF-7 Dox^R, MCF-7 Tax^R, MDA-MB-231 e BT549, cujas características são mostradas na Tabela 3.2**.** Com exceção das células BT549, que foram cultivadas em meio RPMI 1640, todas as linhagens derivadas de câncer de mama foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado e penicilina/estreptomicina (1 µL/mL). As células MCF-7 Dox^R e MCF-7 Tax^R são derivadas da MCF-7 e apresentam resistência à dox e ao paclitaxel, respectivamente. As linhagens foram genotipadas e o perfil de STR (*short tandem repeats*) foi compatível com o perfil descrito pelo ATCC. As células não-neoplásicas HB4a foram cultivadas em meio DMEM suplementadas com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), penicilina/estreptomicina (1 µL/mL), além de 5 µM hidrocortisona e insulina.

Tabela 3.2: Linhagens celulares utilizadas no estudo e suas características.

Linhagens celulares	Características
MCF-7	Positivas para receptores hormonais e expressão basal de Her2; p53 selvagem
MCF-7 Dox^R	Resistentes à dox. Células derivadas da linhagem celular MCF-7.
MCF-7 Tax^R	Resistentes ao paclitaxel. Células derivadas da linhagem celular MCF-7.
MDA-MB-231	Triplo negativas; p53 mutado
BT549	Triplo negativas; p53 mutado
HB4a	Células não neoplásicas de mama

As linhagens celulares foram mantidas em estufa (Thermo Scientific) contendo 5% de CO_2 a 37°C e foram monitoradas quanto à contaminação por micoplasma. As células foram tripsinizadas (Tripsina 0.125%, Gibco) duas vezes por semana para manutenção ou para preparo dos experimentos, como mostrado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Condições de plaqueamento para os experimentos realizados em linhagens celulares. Quantidade de células e volume de meio de cultura mais soro fetal bovino relativos à área da superfície para adesão celular.

Experimento	Área (cm^2)	Número de células	Volume
Placa de 96 poços	0,32	1×10^4	200 µL
Placa de 6 poços	9,4	3×10^5	500 µL
Placa de Petri	60,1	$1,8 \times 10^6$	10 mL
Garrafa de 75	75	$2,3 \times 10^6$	12 mL
Garrafa de 150	150	$4,7 \times 10^6$	20 mL

3.3 Tratamento das células com dox e paclitaxel

As células foram tratadas com o quimioterápico dox (Fauldox® - Libbs Farmacêutica Ltda, São Paulo) e paclitaxel (Paclitaxel® - Accord Farmacêutica Ltda, São Paulo) em diferentes concentrações e tempos para a realização dos experimentos, como mostrado na Figura 3.1. As diluições seriadas da solução estoque de dox e paclitaxel foram preparadas no momento da utilização.

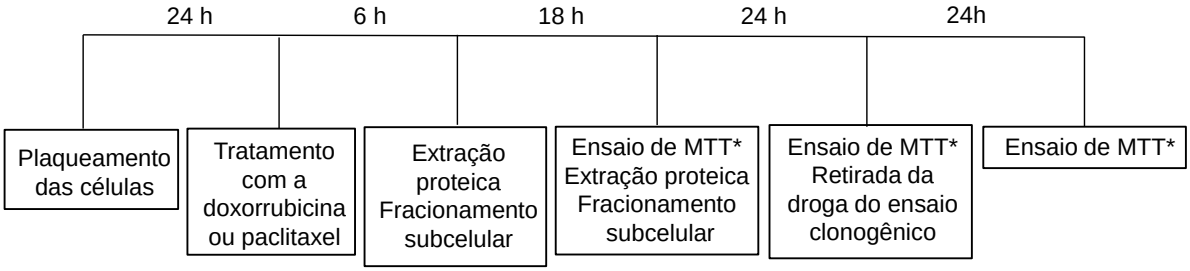


Figura 3.1: Esquema de tratamento com as drogas. Os asteriscos* ilustram experimentos realizados apenas com a dox.

3.4 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Esse ensaio foi utilizado para avaliar alterações na viabilidade celular mediada pelo quimioterápico dox. Esse ensaio se baseia na utilização do sal de tetrazólio MTT brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio que é reduzido por enzimas desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas, formando cristais de coloração roxa, denominados cristais de formazana. Posteriormente, esses cristais são dissolvidos com DMSO (dimetilsulfóxido) e a densidade óptica é obtida por espectofotometria (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços utilizando triplicatas tanto no controle (sem o quimioterápico) quanto nas demais concentrações utilizadas. O plaqueamento ocorreu no dia anterior à adição do quimioterápico para que as células pudessem aderir à placa. As placas foram mantidas na presença de dox em estufa a 37°C contendo 5% de CO_2 pelos tempos de 24, 48 e 72 h. Quatro horas antes do término dos tempos estabelecidos, foram adicionados 20 µL de MTT aos poços e então, as placas, protegidas da luz, retornaram para a estufa pelo tempo restante. Posteriormente, o sobrenadante foi removido, e os cristais formados foram dissolvidos em 150 µL de DMSO. A densidade óptica foi obtida através de espectofotometria no comprimento de onda de 570 nm.

A porcentagem de células viáveis foi calculada desta forma: Média das absorbâncias dos tratados X 100/ Média das absorbâncias do grupo controle (não tratados). A partir desse cálculo, foram feitas as médias dos percentuais de viabilidade celular de cada concentração obtida em três experimentos independentes. O cálculo da taxa de viabilidade celular foi realizado através da divisão da média das densidades óticas nos tempos de 48 e 72 h pela média das densidades óticas em 24 h.

3.5 Ensaio clonogênico

Esse ensaio foi utilizado para avaliar a capacidade de formação de colônias e o potencial proliferativo das células. Um total de 2000 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e deixadas aderir por 24 h. No dia seguinte, o quimioterápico foi adicionado em diferentes concentrações e retirado após 48 h em cultura. As placas foram mantidas na estufa a 37°C contendo 5% de CO_2 por aproximadamente 14 dias ou até as colônias se formarem. Em seguida, as colônias foram fixadas com etanol 100% e coradas com cristal violeta 0,05%. As colônias foram diluídas em ácido acético 33% e a densidade óptica foi obtida por espectofotometria no comprimento de onda de 595 nm.

3,6 Fracionamento subcelular

Essa técnica foi utilizada para avaliar a localização subcelular de XIAP nas linhagens celulares, bem como investigar possíveis alterações na localização mediante ao tratamento com os quimioterápicos. O kit NE-PER (NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents; Thermoscientific) foi utilizado para separar as frações citoplasmáticas e nucleares, e então, os níveis de XIAP foram avaliados por Western blotting em cada fração subcelular. As proteínas Hsc70 ou β-tubulina foram utilizadas como constitutivo citoplasmático, enquanto a Lamina B, como constitutivo nuclear.

3.7 Western blotting

Para verificar a expressão proteica e localização de XIAP, bem como avaliar a eficiência da transfecção de XIAP, a técnica de Western blotting foi utilizada. Após o tratamento com a dox ou transfecção plasmidial, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (5 min a 770 g) e lavadas 2x com PBS (solução salina de fosfato), para preparo dos pellets. Os pellets foram armazenados no freezer -80°C até o momento da extração proteica. O tampão de extração (Invitrogen®) foi utilizado para lise celular e desnaturação proteica. Foram adicionados aos pellets 80 – 100 µL de tampão, dependendo do número de células em cada pellet. O processo de lise e desnaturação proteica ocorreu em 30 minutos, com intervalos a cada 10 minutos para homogeneização no vórtex. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 16000 g por 10 min em microcentrífuga refrigerada a 4ºC. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo quando as proteínas foram

quantificadas através do Kit BioRad®. Depois de quantificadas, foram adicionados água Milli-Q e tampão loading (115mM Tris-HCl pH 6,8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100mM de 2-β-mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol) às amostras. Posteriormente, 15 – 20 µg de proteínas foram submetidos a uma corrida de eletroforese em gel de acrilamida 10 ou 12% como mostrado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Tabela esquemática de preparação dos géis para Western blotting

Para 2 géis	**Resolving gel**		**Stacking**
	10%	**12%**	**5%**
H_20 Milli-Q (mL)	8,03	6,7	3,67
Tris pH 8,8 (mL)	5	5	-
Tris pH 6,8 (mL)	-	-	0,42
Acrilamida 30% (mL)	6,67	8	0,83
10% SDS (µL)	200	200	50
10% APS (µL)	200	200	50
TEMED (µL)	20	20	10
Total	20	20	5

Após 2h a 100 V no tampão de corrida BioRad® diluído 10x em água milli-Q, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond) utilizando tampão de transferência BioRad® diluído 10x em água milli-Q. A transferência ocorreu em câmara úmida da BioRad® por 2 h a 100V. Para verificar o padrão de corrida foi utilizado o Ponceau Red (Ponceau Red 0,2%; ácido acético 3%). Posteriormente, a membrana foi bloqueada por 2 h com uma solução a 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS/Tween 0,05% (10 mM Tris-HCL, pH 8,0; 150 mM de NaCl; 0,05% Tween). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários, diluídos em TBS Tween 0,05%/BSA 2%, *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3x por 5 minutos e então, incubadas com seus anticorpos secundários específicos (anti-mouse ou anti-rabbit), diluídos em TBS/Tween 0,05% por 1 h sob agitação, como mostrado na Tabela 3.5**.** Posteriormente, as membranas foram lavadas 4x por 10 minutos e então, foi utilizado o kit de revelação ECL (ECL Prime, GE Healthcare) sendo a membrana exposta a um filme ultrassensível (GE Healthcare) ou então, submetida à revelação eletrônica utilizando o aparelho C-Digit (Licor®).

Tabela 3.5: Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de Western blotting.

Anticorpos	Catálogo	Diluição	Fabricante
XIAP	#2045	1:1000	Cell Signaling
Hsc 70	sc-7298	1:1000	Santa Cruz
Lamina B	NA12	1:300	Calbiochem
β-actina	A5441	1:1000	Sigma
β-tubulina	sc-9104	1:1000	Santa Cruz
Anti-mouse	A9044	1:40000	Sigma
Anti-rabbit	A0545	1:40000	Sigma

3.8 Construção dos plasmídeos

Os vetores plasmidiais pEBB (vetor vazio), pEBB-HA-XIAP$^{wild\ type}$, pEBB-HA-XIAP^{H467A} (troca de um aminoácido histidina por alanina, resultando na perda da função ubiquitina E3 ligase) e pEBB-HA-XIAP$^{\Delta RING}$ (deleção do domínio RING) foram gentilmente cedidos pelo laboratório do Professor Colin Duckett (University of Michigan, EUA). Para simplificar a nomenclatura dos vetores, o pEBB-HA foi omitido do texto e das figuras. Uma vez que foi demonstrado que a transfecção de células tumorais com o vetor XIAP$^{\Delta RING}$ resulta na superexpressão de XIAP na fração nuclear (CAO *et al.*, 2014), utilizamos esse vetor como uma ferramenta para a avaliação do seu papel oncogênico em diferentes frações subcelulares. A superexpressão de XIAP$^{\Delta RING}$ resulta na produção de uma proteína sem atividade ubiquitina E3 ligase dependente do domínio RING (LEWIS *et al.*, 2004), de forma que o vetor XIAP^{H467A} foi utilizado como um controle da perda da função ubiquitina ligase, cuja expressão é estritamente citoplasmática. É importante ressaltar que tais mutações não interferem com a inibição da apoptose mediada pelos domínios BIR de XIAP, uma vez que a estrutura de tais domínios permanece intacta (LEWIS *et al.*, 2004). Adicionalmente, utilizamos os vetores XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, que foram construídos em colaboração com o grupo do laboratório liderado pelo Dr. João Viola (INCA, Brasil, Rio de Janeiro), por técnicas de biologia molecular (Figura 3.2).

Figura 3.2: Figura esquemática ilustrando os vetores de XIAP utilizados nesse estudo.

Os vetores XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ foram construídos através da fusão da sequência codificante para o NLS do antígeno T do vírus SV40 (sequência de aminoácidos: SPKKKRKVEAS) ao cDNA de XIAP a 5' ou a 3', respectivamente. Para a construção do vetor XIAP$^{NLS\ N\text{-}ternn}$, dois oligonucleotídeos complementares contendo a sequência do NLS foram sintetizados, anelados e inseridos entre o tag de HA e o códon de iniciação de XIAP no vetor XIAP$^{wild\ type}$, utilizando as enzimas *BamH*I e *Bgl*II. Para a construção do vetor XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, primeiramente, o códon de parada de XIAP foi removido por amplificação por PCR seguida de subclonagem para o vetor pEBB utilizando as enzimas *EcoR*V e *Cla*I. Posteriormente, dois oligonucleotídeos complementares contendo a sequência do NLS foram sintetizados, anelados e inseridos a 3' do cDNA de XIAP utilizando as enzimas de restrição *Cla*I e *Not*I. Todas as construções foram confirmadas por mapeamento com enzimas de restrição e sequenciamento (Applied Biosystems) utilizando os primers: Forward 5' TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC 3'; XIAP 468 Forward 5' AGACCTGATACTCTCAAGGGT 3' e Reverse 5' ATCAGACACCATATACCCGAGG 3'. Após a confirmação da identidade e expansão dos plasmídeos em meio LB para posterior extração por maxi-prep (Hispeed Plasmid Maxi Kit; Qiagen), as transfecções foram realizadas.

3.9 Transfecção plasmidial

As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 10 cm, de maneira que, no dia seguinte, houvesse 90 - 95% de confluência. A transfecção foi realizada utilizando uma

proporção de 1:1 de DNA para Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Os vetores plasmidiais e a Lipofectamina 2000 foram diluídas em meio OPTI-MEM (OPTI-MEM® I Reduced Serum Media, Invitrogen) e então, adicionados às placas com as células. Após 24 h de transfecção, as células foram tripsinizadas, contadas por exclusão de Azul de Tripan e replaqueadas para os experimentos subsequentes. Após 24 h de adesão, as células foram tratadas com a dox e avaliadas através do ensaio clonogênico e de MTT, de acordo com os tempos mostrados na Figura 4.3. A eficácia da transfecção e a localização subcelular de XIAP foram avaliadas por Western blotting e fracionamento subcelular, 24 h após a transfecção. Por utilizarmos um método de transfecção transiente, as células foram recolhidas alternativamente 96 h após a transfecção para verificar a permanência da superexpressão da XIAP.

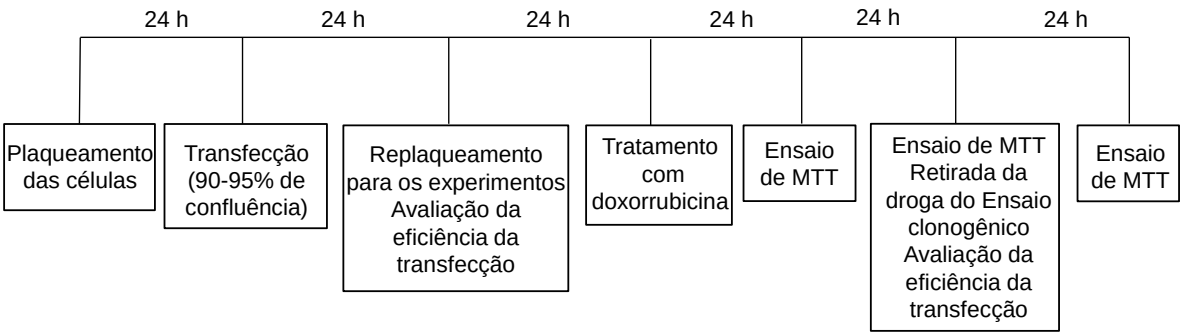


Figura 3.3: Esquema da transfecção plasmidial nas células MCF-7 e posterior tratamento com a doxorrubicina.

3.10 Análises estatísticas

O *software* SPSS 17.0 foi utilizado para a realização das análises estatísticas com as amostras de pacientes com câncer de mama. As curvas de sobrevida foram construídas através do método de Kaplan-Meier e comparadas através do teste *log-rank*. O teste qui-quadrado foi empregado a fim de avaliar a associação entre a expressão e localização de XIAP com os parâmetros clinico-biológicos das pacientes. O teste *t student* foi utilizado para avaliar as diferenças entre células controle (não tratadas) e tratadas com a dox, bem como comparar as diferenças entre as células transfectadas com diferentes vetores plasmidiais. O intervalo de segurança utilizado foi de 95% e o valor de $p<0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. Desenho Experimental do Estudo

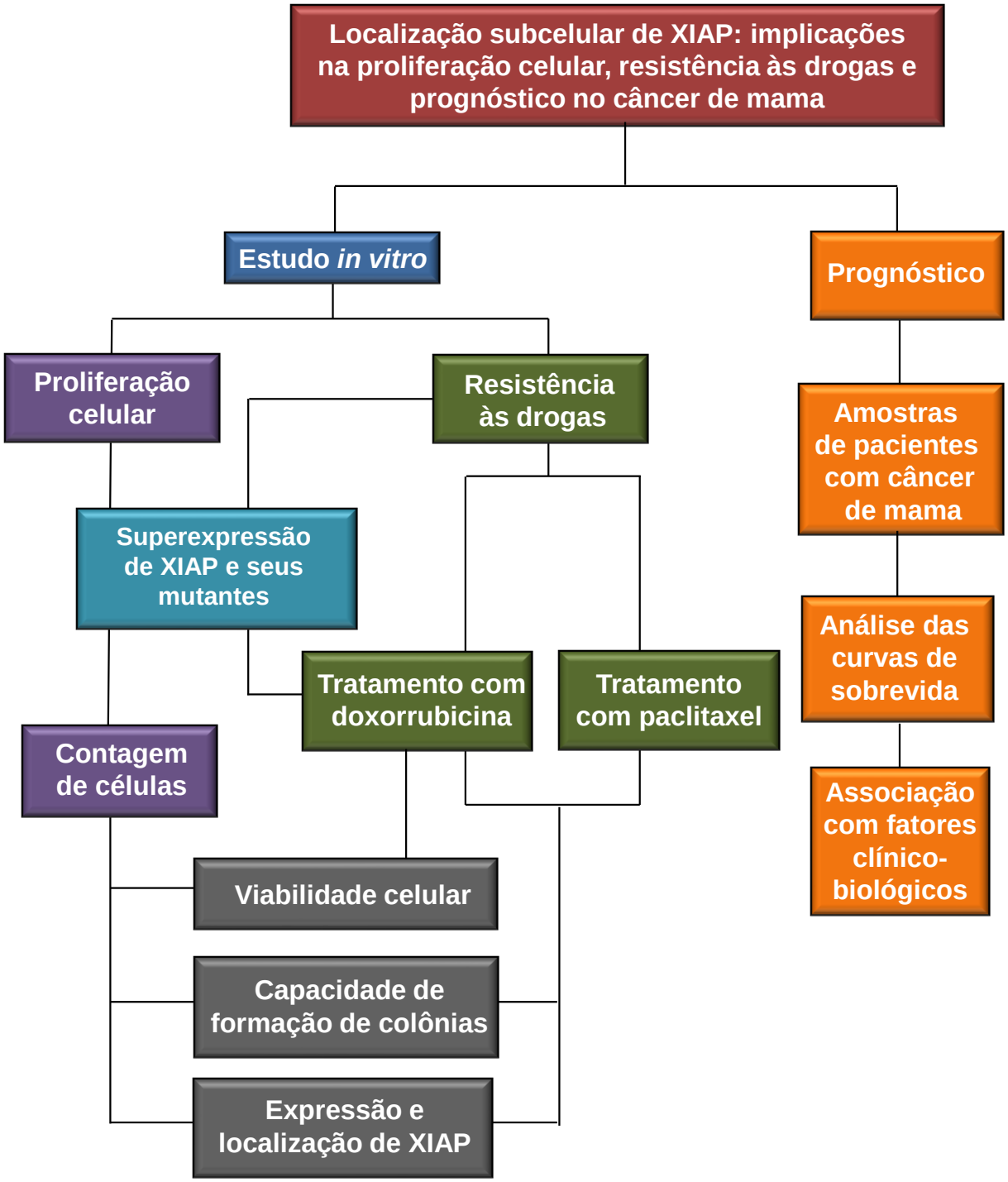


Figura 4.1: Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo.

5. Resultados

5.1 A expressão de XIAP nuclear é encontrada de forma mais abundante na linhagem celular resistente à dox, MCF-7 Dox^R

Em tecidos não neoplásicos, a localização subcelular da XIAP é, predominantemente, citoplasmática, porém em alguns tipos celulares, como os ácinos pancreáticos, a XIAP pode ser encontrada também na fração nuclear (VISCHIONI *et al*., 2006). O padrão de distribuição subcelular de XIAP em células tumorais varia de acordo com o tipo tumoral. No câncer de mama, a presença de XIAP na fração nuclear foi detectada como marcador independente de prognóstico (ZHANG *et al*., 2011). Portanto, o primeiro passo desse estudo foi avaliar a localização subcelular de XIAP em linhagens celulares derivadas de câncer de mama, e uma linhagem celular não neoplásica derivada da mama. Inicialmente, avaliamos a expressão de XIAP nos extratos totais e observamos que todas as linhagens celulares expressam XIAP, porém em níveis distintos (Figura 5.1A). Em relação à localização subcelular, a expressão de XIAP foi encontrada na porção citoplasmática de todas as linhagens celulares testadas. Em contrapartida, as células resistentes à dox, MCF-7 Dox^R, apresentaram expressão de XIAP na fração nuclear de forma mais abundante do que as outras linhagens (Figura 5.1B). Esse dado nos sugere que XIAP na porção nuclear pode estar associada à quimiorresistência.

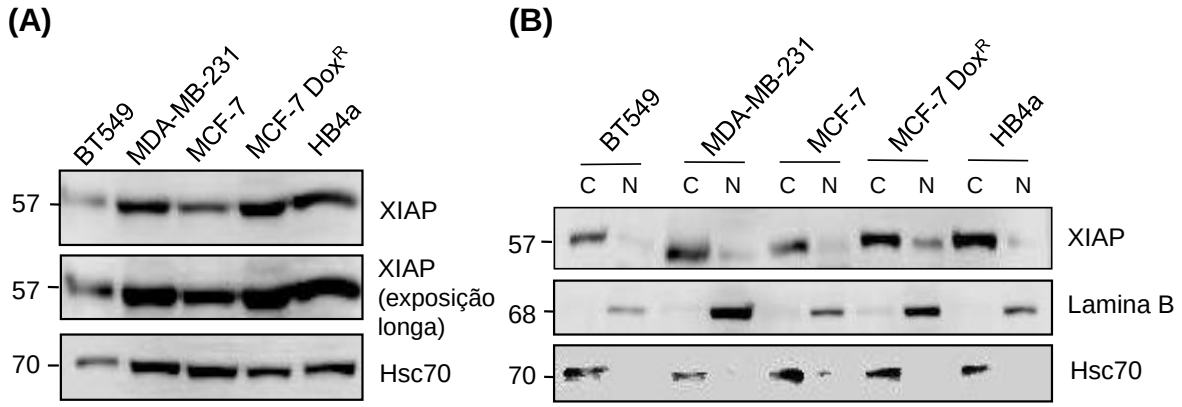


Figura 5.1: Expressão e localização subcelular de XIAP em um painel de linhagens celulares. As linhagens celulares tiveram suas proteínas extraídas a partir de frações totais (A) ou núcleo-citoplasmáticas (B) e avaliadas quanto à expressão de XIAP por Western blotting. A extração de proteínas totais foi realizada através do tampão de extração Invitrogen® e o fracionamento nuclear e citoplasmático, a partir do kit NE-PER (Thermoscientific). A lamina B foi usada como constitutivo nuclear, enquanto a Hsc70, como constitutivo citoplasmático. C: Citoplasma; N: Núcleo.

5.2 As células MCF-7 Dox^R são resistentes à diminuição da viabilidade celular e redução da capacidade de formação de colônias induzidas pela dox

Para validar o nosso modelo de resistência, nós selecionamos algumas linhagens celulares e avaliamos possíveis alterações na viabilidade celular induzidas pela dox. Para tal, foram utilizadas as células MDA-MB-231 e MCF-7 que apresentaram apenas a expressão citoplasmática de XIAP, além das células resistentes a dox, MCF-7 Dox^R, que além da presença de XIAP no citoplasma, também apresentaram XIAP nuclear. As alterações na viabilidade celular foram avaliadas mediante a exposição a diferentes concentrações de dox nos tempos de 24, 48 e 72 h. A Figura 5.2 mostra que a dox diminuiu a viabilidade celular de forma significativa nas células MDA-MB-231 e MCF-7, já em 24 h de exposição ao quimioterápico. As células MCF-7 apresentaram diminuição da viabilidade celular de maneira tempo dependente, enquanto que as células MDA-MB-231, de maneira tempo e dose dependente. Já as células MCF-7 Dox^R apresentaram máximo de diminuição de viabilidade celular de cerca de 20%, confirmando seu fenótipo de resistência a dox. Comparando as linhagens no mesmo gráfico (Figura 5.3), pode-se observar que as células MCF-7 foram as mais sensíveis a dox, enquanto as células MDA-MB-231 apresentaram um perfil intermediário de resistência entre as células MCF-7 e MCF-7 Dox^R. Apenas na concentração mais alta testada, as células MDA-MB-231 foram mais sensíveis à diminuição de viabilidade celular do que a linhagem celular MCF-7.

Além disso, foi avaliada a capacidade da dox em inibir a formação de colônias nas células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^R. A Figura 4.4 mostra que a dox reduziu a capacidade de formação de colônias nas células MDA-MB-231 e MCF-7, de forma estatisticamente significativa. Porém, as células MCF-7 Dox^R foram resistentes à inibição na formação de colônias (Figura 5.4). Em conjunto com o resultado da inibição de viabilidade celular, esse dado mostra que as células MCF-7 e MDA-MB-231 são sensíveis ao tratamento com a dox, enquanto a linhagem celular MCF-7 Dox^R não tem a sua viabilidade afetada, validando o nosso modelo de resistência ao quimioterápico.

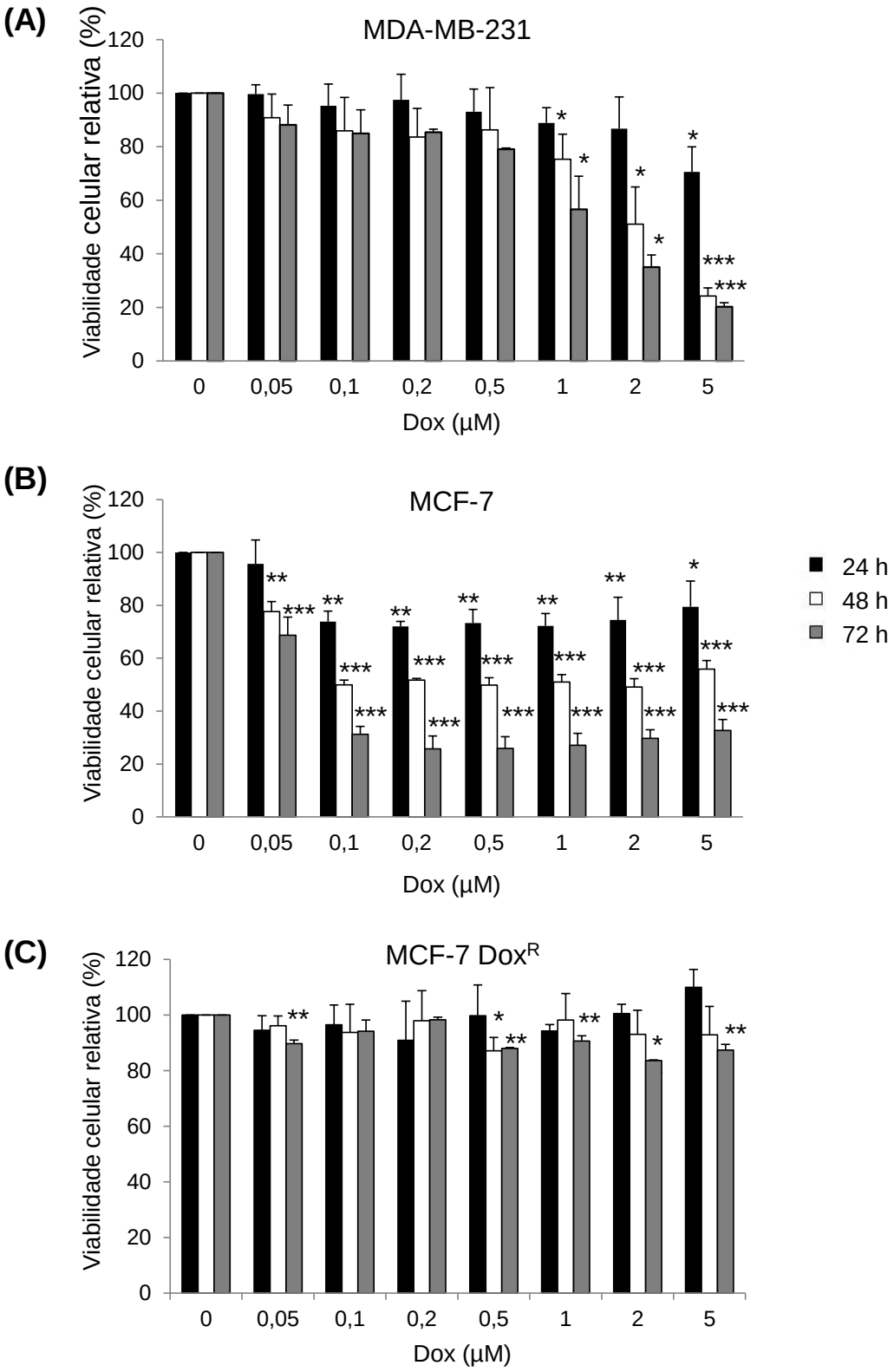


Figura 5.2: Alterações na viabilidade celular induzidas pela doxorrubicina (dox) nas células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^R. As células MDA-MB-231 (A), MCF-7 (B) e MCF-7 Dox^R (C) foram colocadas em placas de 96 poços e deixadas aderir por 24 h. Posteriormente, as células foram expostas à dox em concentrações crescentes por 24, 48 e 72 h. As linhagens celulares foram comparadas com o seu controle de células não tratadas. O gráfico corresponde às médias e desvio padrão de três experimentos independentes. (Teste *t student*: *p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001; considerado estatisticamente significativo).

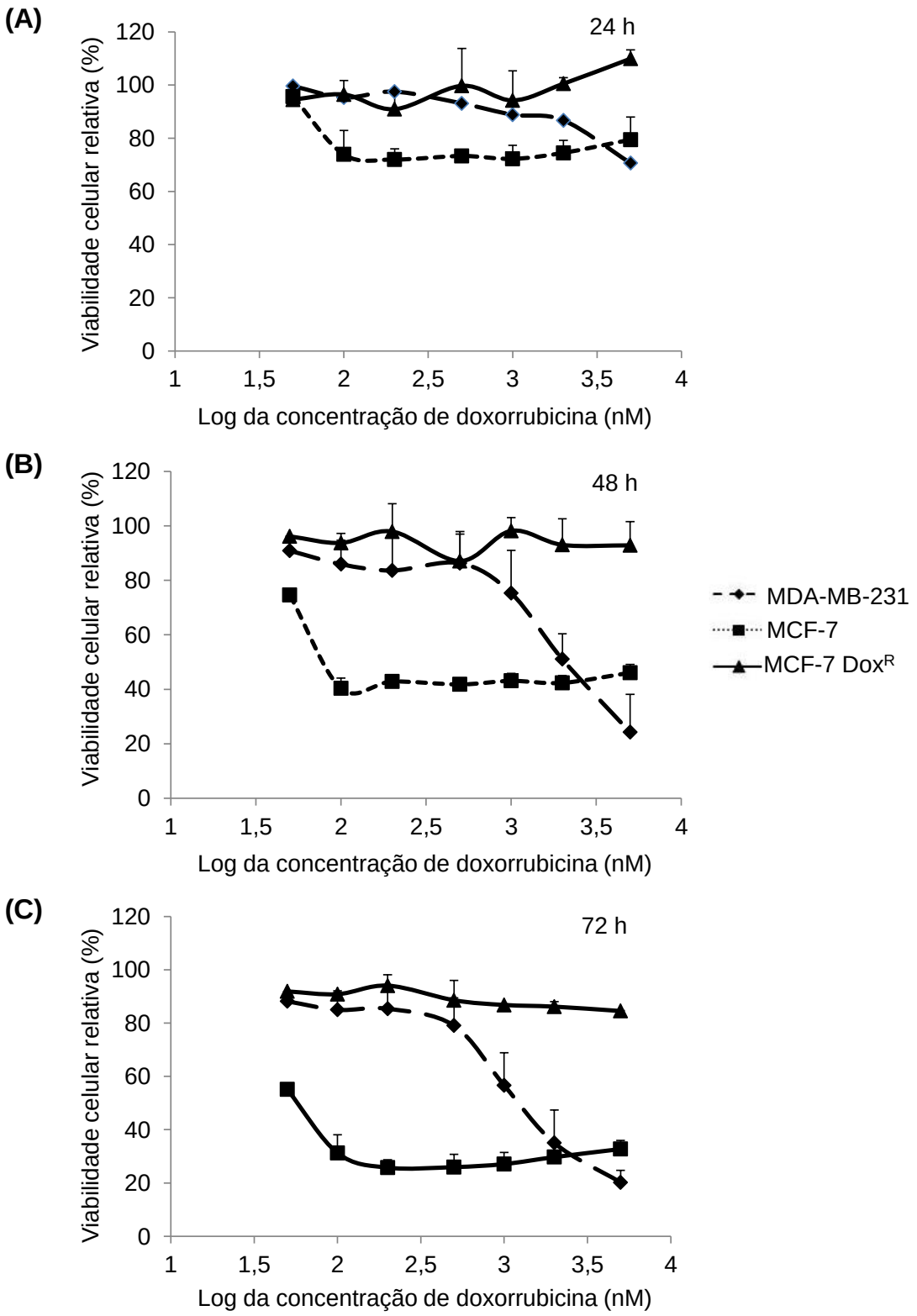


Figura 5.3: Comparação do perfil de sensibilidade à doxorrubicina (dox) das linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^R. As células foram colocadas em placas de 96 poços e deixadas aderir por 24 h. Posteriormente, as células foram expostas à dox em concentrações crescentes por 24 (A), 48 (B) e 72 h (C). As linhagens celulares foram comparadas com ao seu controle de células não tratadas. O gráfico corresponde às médias e desvio padrão de três experimentos independentes.

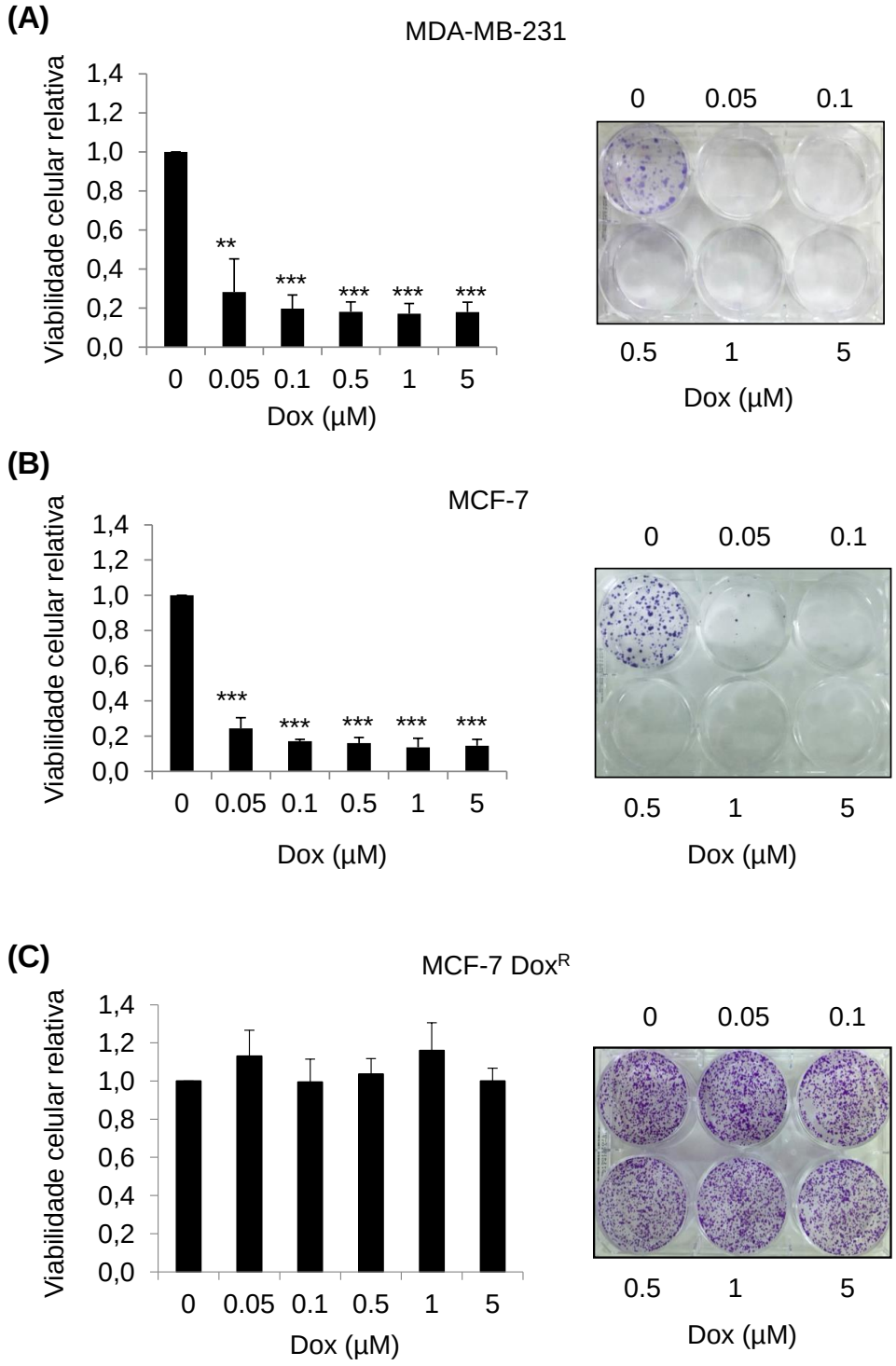


Figura 5.4: Alterações induzidas pela doxorrubicina (dox) no padrão de formação de colônias nas células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^R. As células MDA-MB-231 (A), MCF-7 (B) e MCF-7 Dox^R (C) foram colocadas em placas de seis poços e deixadas aderir por 24 h. Posteriormente, foi adicionada a dox em diferentes concentrações. Depois de 48 h de exposição ao quimioterápico, foi adicionado meio sem droga e as células foram deixadas crescer por cerca de 14 dias, e então, coradas com cristal violeta. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes. (Teste *t student*: $^{**}p<0.001$; $^{***}p<0.0001$; considerado estatisticamente significativo).

5.3 O tratamento com a dox não modula a localização subcelular de XIAP nas linhagens celulares estudadas

Sabe-se que XIAP pode translocar para o núcleo mediante o estímulo apoptótico induzido por agentes quimioterápicos no câncer (NOWAK *et al.*, 2004). Para avaliar se o tratamento com a dox modularia a localização subcelular de XIAP, as linhagens celulares foram expostas à droga e foi realizado o fracionamento subcelular seguido de Western blotting. As células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^R foram tratadas com 1µM de dox por 6 e 24 h. Confirmando dados prévios, XIAP só foi encontrada na fração nuclear nas células MCF-7 Dox^R (Figura 5.5). Além disso, não foi possível observar alterações na localização subcelular de XIAP mediante o tratamento com a dox em nenhum dos tempos avaliados. De forma interessante, houve um aumento da fração citoplasmática de XIAP nas células MDA-MB-231, principalmente em 24 h de exposição ao quimioterápico, sugerindo um papel favorável de XIAP citoplasmática à resposta ao quimioterápico. Esses resultados sugerem que a indução do fenótipo de resistência ou sensibilidade à dox não envolve a modulação da localização subcelular de XIAP.

5.4 A expressão nuclear de XIAP também é encontrada nas células resistentes ao paclitaxel, MCF-7 Tax^R

A fim de investigar se o efeito observado nas células MCF-7 Dox^R se estendia a células resistentes a outros quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama, avaliamos a localização subcelular de XIAP nas células MCF-7 Tax^R, resistentes ao paclitaxel Essas células são resistentes à inibição de formação de colônias induzida pelo paclitaxel, quando comparadas com as células MCF-7 (Figura 5.6). Assim como observado nas células MCF-7 Dox^R, a expressão nuclear de XIAP foi encontrada nas células resistentes ao paclitaxel (Figura 4.7A) e o tratamento com o quimioterápico não modulou a localização subcelular de XIAP (Figura 4.7B). De forma interessante, as células MCF-7 apresentaram um aumento na expressão de XIAP na fração citoplasmática assim como observado com as células MDA-MB-231 tratadas com dox, principalmente depois de 24 h de tratamento com o quimioterápico. Em conjunto, esses resultados apontam para um possível papel da expressão de XIAP nuclear na resistência, não apenas à dox, mas também ao paclitaxel e sugerem que esse possa ser um mecanismo de resistência independente do mecanismo de ação do agente quimioterápico.

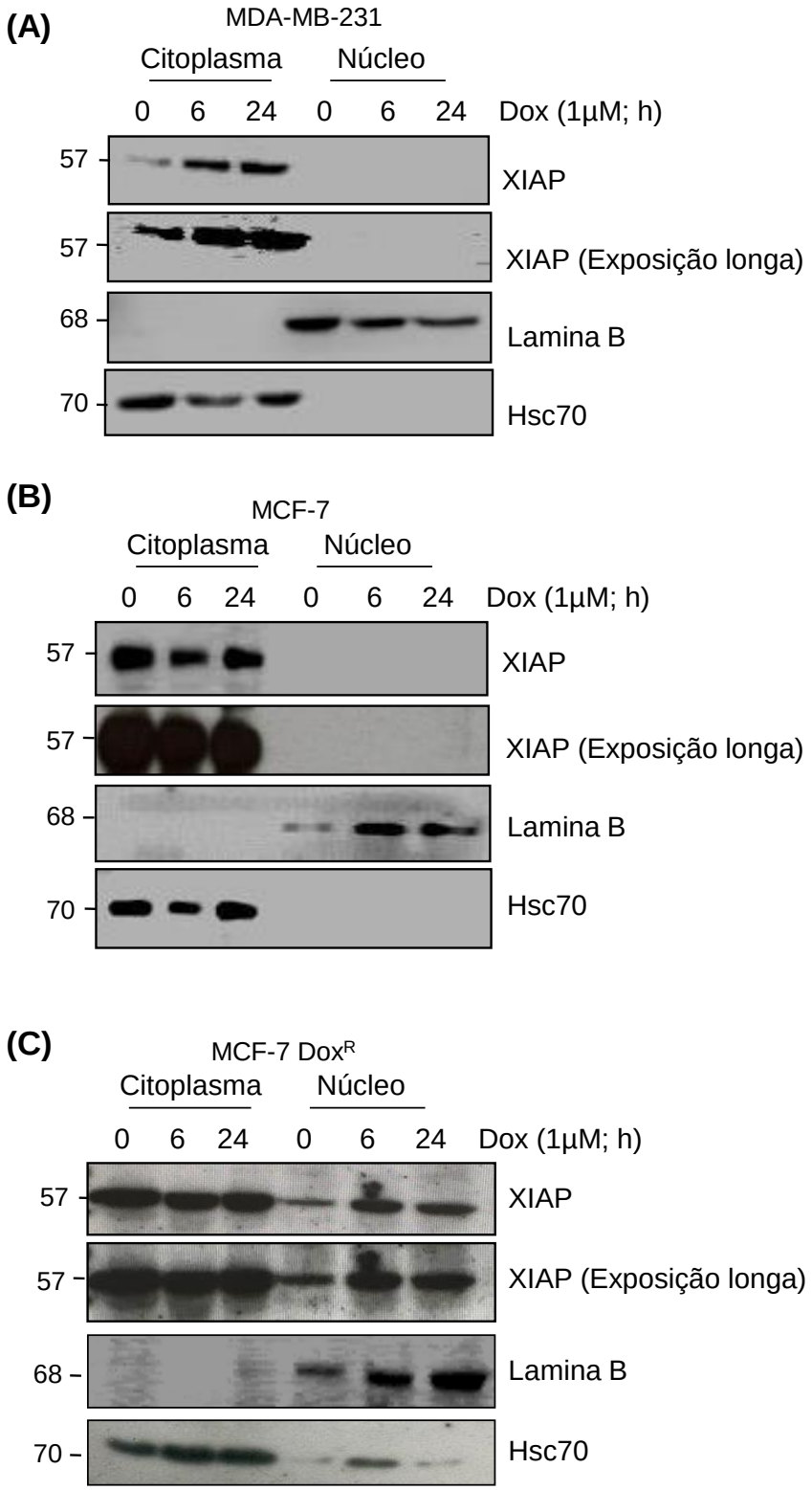


Figura 5.5: Localização subcelular de XIAP nas células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^R após o tratamento com a doxorrubicina (dox). As células MDA-MB-231 (A), MCF-7 (B) e MCF-7 Dox^R. (C) foram deixadas aderir por 24 h em garrafas grandes e então, foram submetidas ao tratamento com a dox a 1µM por 6 e 24 h. Posteriormente, as proteínas nucleares e citoplasmáticas foram isoladas pelo kit NE-PER (Thermoscientific) e tiveram a expressão de XIAP analisada por Western blotting. A lamina B foi utilizada como constitutivo nuclear, enquanto que a Hsc70, como constitutivo citoplasmático.

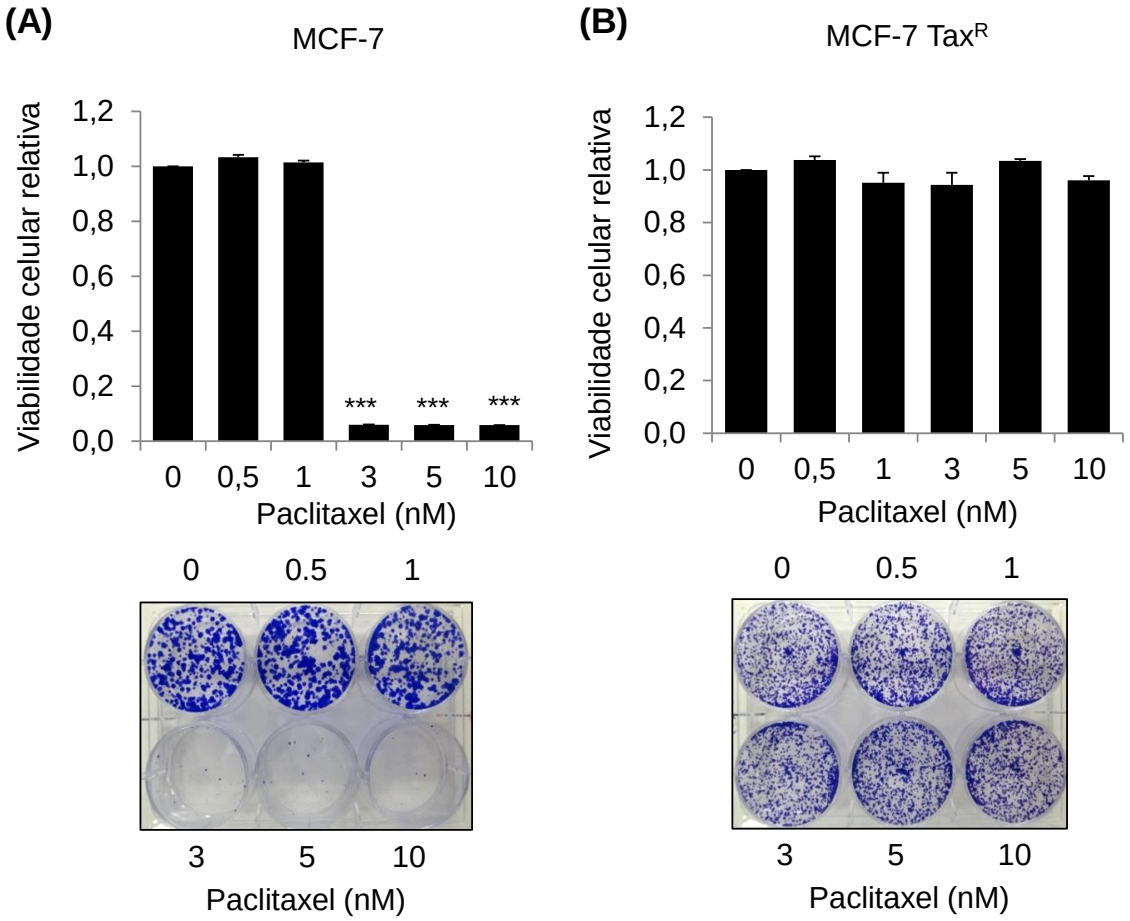


Figura 5.6: Perfil de sensibilidade de células MCF-7 e MCF-7 Tax^R ao paclitaxel. As células MCF-7 (A) e MCF-7 Tax^R (B) foram deixadas aderir em placas de seis poços por 24 h. Posteriormente, diferentes concentrações de paclitaxel foram adicionadas. Depois de 48 h de exposição ao quimioterápico, a droga foi retirada e as células foram deixadas crescer por cerca de 14 dias, e então, coradas com cristal violeta. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes (Teste *t student*: ***$p<0.0001$; considerado estatisticamente significativo).

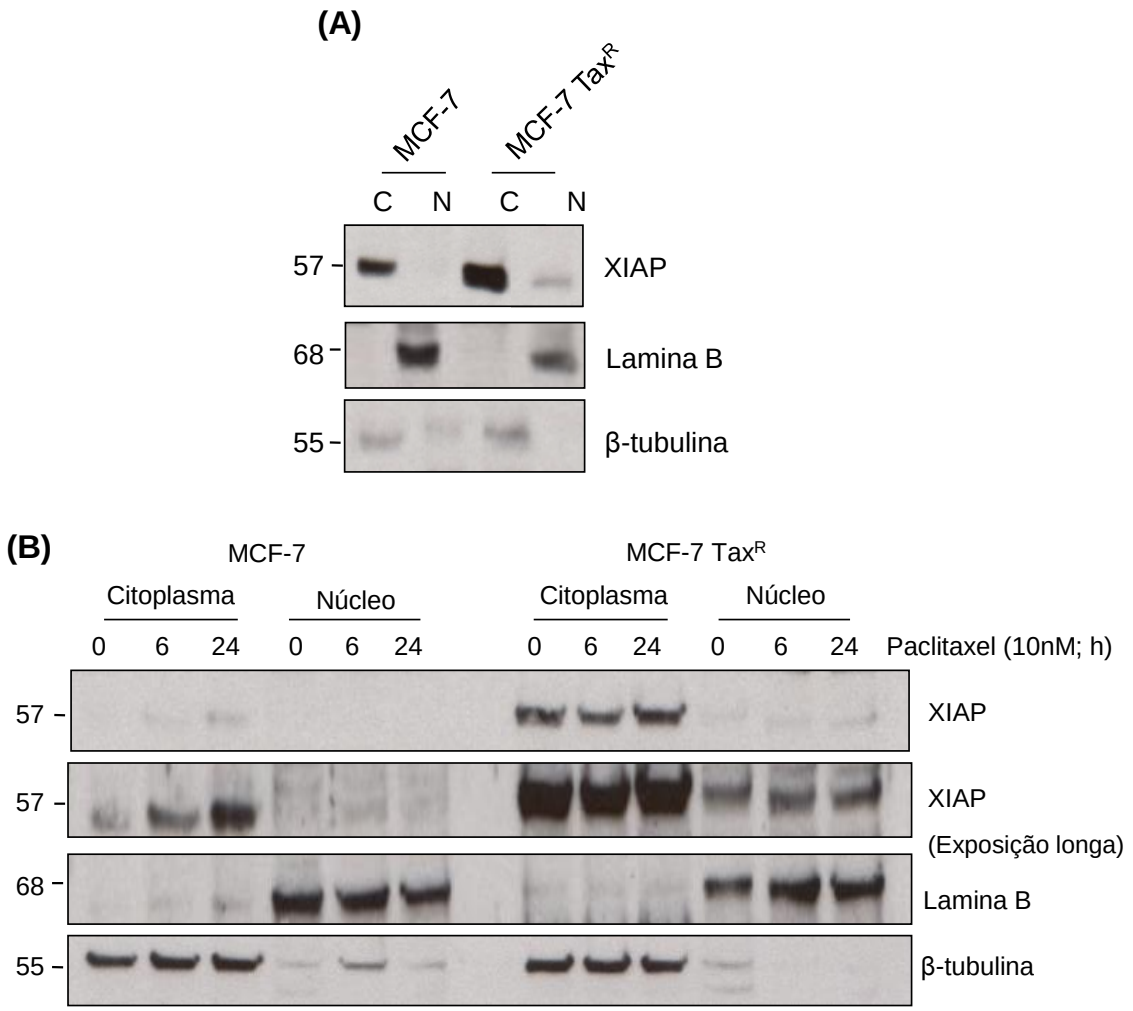


Figura 5.7: Localização subcelular de XIAP nas células MCF-7 e MCF-7 Tax^{R} após o tratamento com o paclitaxel. (A) As células MCF-7 e MCF-7 Tax^{R} tiveram as suas frações citoplasmática e nuclear separadas pelo kit NE-PER (Thermoscientific), previamente à avaliação da expressão de XIAP por Western blotting. (B) A expressão de XIAP nuclear e citoplasmática foi avaliada após o tratamento das células MCF-7 e MCF-7 Tax^{R} com 10 nM de paclitaxel durante 0, 6 e 24 h. As frações foram isoladas através do kit NE-PER e a expressão de XIAP foi examinada por Western blotting. A lamina B foi utilizada como constitutivo nuclear, enquanto a β-tubulina, como constitutivo citoplasmático. C: Citoplasma; N: Núcleo.

5.5 As células superexpressando os vetores plasmidiais XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ apresentam expressão nuclear de XIAP

O próximo passo do estudo foi validar um modelo onde pudéssemos analisar o efeito da expressão induzida de XIAP no núcleo na resistência às drogas e no fenótipo de proliferação celular. Dessa forma, as células MCF-7 foram transfectadas com o vetor vazio (pEBB), XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$, XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ e a localização de XIAP após a indução da superexpressão de diferentes formas de XIAP foi avaliada. O vetor XIAP$^{wild\ type}$ codifica a proteína em sua forma selvagem, enquanto os vetores XIAP^{H467A}

e XIAP$^{\Delta RING}$ codificam a proteína com a perda da função ubiquitina E3 ligase e com a deleção do domínio RING, respectivamente. Os plasmídeos XIAP $^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP $^{NLS\ C\text{-}term}$, gerados por clonagem molecular, codificam uma proteína com um NLS na porção N e C-terminal, respectivamente. Por análise de predição de NLS, não foi possível identificar NLS clássicos e não-clássicos na sequência da XIAP, o que motivou o planejamento de vetores contendo esses sinais para indução do seu importe nuclear. Como observado na Figura 5.8A, as células MCF-7 transfectadas com todos os variantes de XIAP utilizados apresentaram aumento na expressão de XIAP quando comparadas com as células transfectadas com o vetor vazio, confirmando a eficiência da superexpressão.

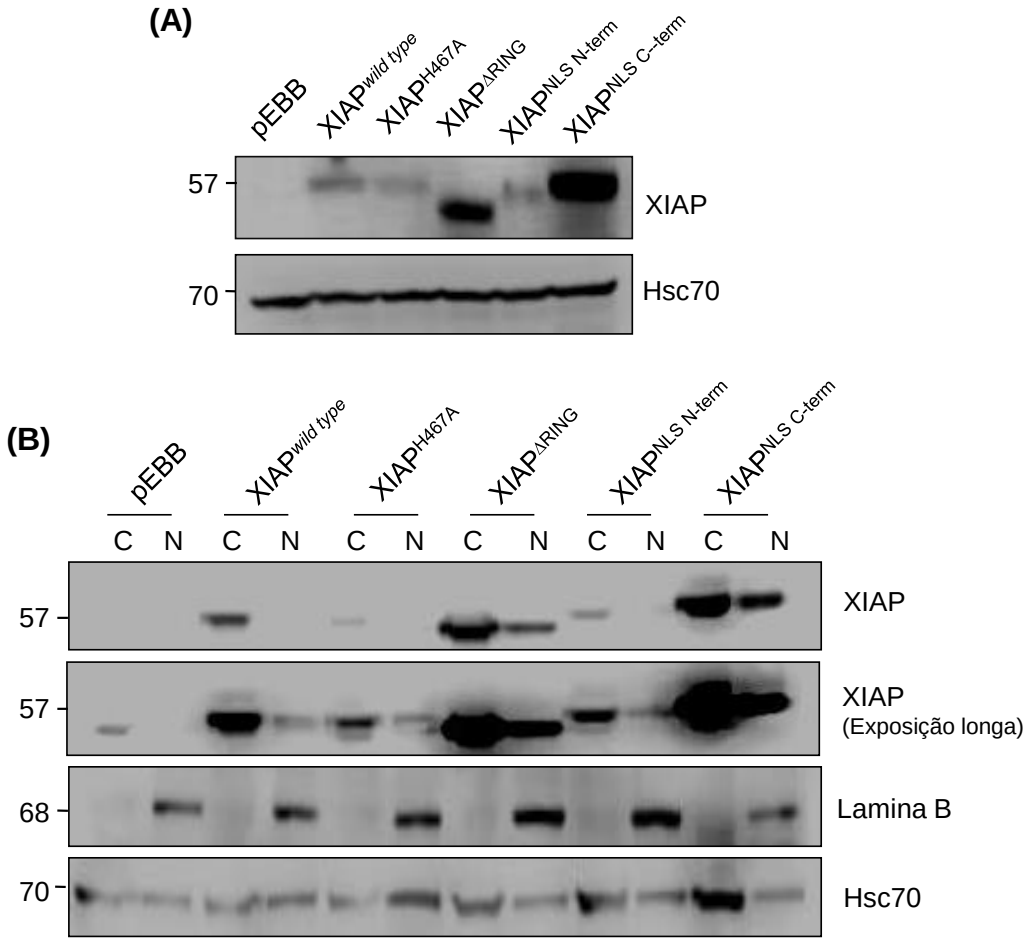


Figura 5.8: Expressão e localização subcelular de XIAP em células MCF-7 superexpressando os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$, XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de petri (10cm) por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$, XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, utilizando a Lipofectamina 2000. Posteriormente, extratos proteicos totais (A) e fracionados através do kit NE-PER (Thermoscientific) (B) foram avaliados para a expressão de XIAP por Western blotting. A lamina B foi utilizada como controle constitutivo nuclear, enquanto a Hsc70, como constitutivo citoplasmático. C: Citoplasma; N: Núcleo.

Em relação à localização subcelular, apenas as células transfectadas com os mutantes $XIAP^{\Delta RING}$ e $XIAP^{NLS\ C\text{-}term}$ apresentaram a expressão de XIAP na fração nuclear, além da superexpressão citoplasmática (Figura 5.8B), mostrando que a transfecção com esses vetores resulta na expressão de XIAP em diferentes compartimentos subcelulares.

Apesar de a transfecção com todos os vetores plasmidiais aumentar a expressão de XIAP, foi possível observar níveis distintos de expressão entre eles. Esse padrão de expressão poderia ser resultado de eficiências de transfecção diferentes entre os vetores ou de modificações pós-traducionais, culminando com diferentes perfis de estabilidade de XIAP. Para testar essas hipóteses, nós manipulamos os níveis de DNA dos vetores plasmidiais menos expressos ($XIAP^{wid\ type}$, $XIAP^{H467A}$ e $XIAP^{NLS\ N\text{-}term}$), aumentando em 50% a quantidade de plasmídeo utilizada. Após a transfecção das células MCF-7 apenas com os vetores $XIAP^{wid\ type}$, $XIAP^{H467A}$ e $XIAP^{NLS\ N\text{-}term}$ com 50% a mais de DNA, não foi verificado o aumento na expressão de XIAP (Figura 5.9A), sugerindo que os níveis menores de XIAP observados após a transfecção com esses vetores não são oriundos de uma menor internalização de DNA nas células MCF-7. Posteriormente, nós questionamos se a ausência de expressão de XIAP no núcleo de células transfectadas com o vetor $XIAP^{NLS\ N\text{-}term}$ seria um resultado de uma indução de superexpressão pouco eficiente. Para isso, nós aumentamos a quantidade de DNA desse vetor e comparamos com a transfecção com o vetor $XIAP^{NLS\ C\text{-}term}$, cuja presença de XIAP no núcleo se mostrou clara. Porém, não foram observadas alterações na localização de XIAP, tampouco aumento na expressão citoplasmática em nenhuma das condições testadas (Figura 5.9B), indicando que não houve uma maior expressão de XIAP com o aumento da quantidade de plasmídeo e que a inserção da sequência NLS na porção N-terminal de XIAP não foi capaz de direcionar tal proteína para o núcleo. O conjunto dos nossos dados sugere que a mudança na expressão e localização de XIAP encontrada nos vetores não é devido à eficiência de transfecção diferencial entre os vetores, mas sim a possíveis modificações pós-traducionais sofridas pelas diferentes formas mutantes de XIAP que podem alterar a sua estabilidade e, consequentemente, o padrão de expressão das bandas após a transfecção. Por não induzir a expressão de XIAP no núcleo, o vetor $XIAP^{NLS\ N\text{-}term}$ não pode ser utilizado como ferramenta para esse estudo e foi excluído dos próximos experimentos.

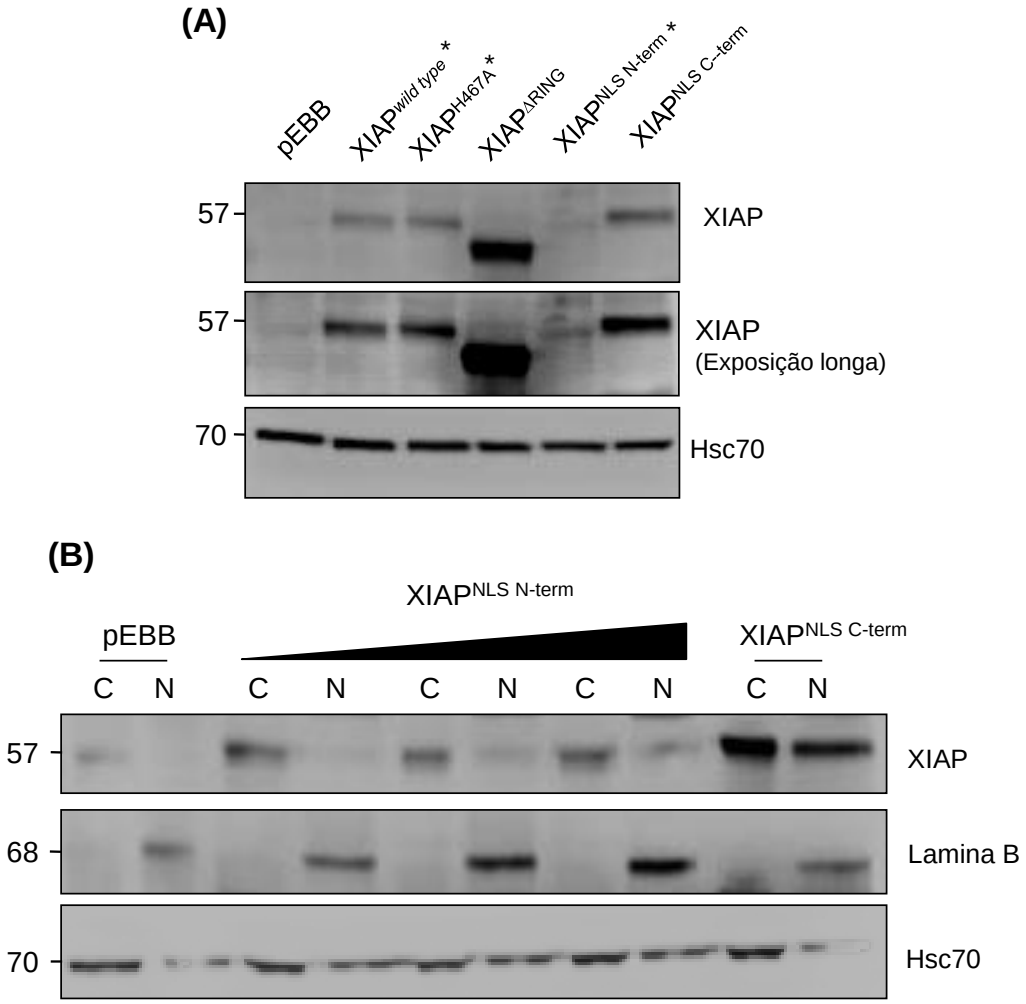


Figura 5.9: Eficiência de transfecção plasmidial através da manipulação dos níveis de DNA internalizado nas células MCF-7. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de 6 poços por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$, XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, utilizando a Lipofectamina 2000. (A) A concentração de DNA foi aumentada em 50% para os vetores XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A} e XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ (identificados por um asterisco*), e posteriormente as células foram lisadas. A expressão de XIAP foi avaliada por Western blotting. (B) As células MCF-7 foram transfectadas com concentrações crescentes de DNA do vetor XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$, submetidas ao fracionamento subcelular (kit NE-PER - Thermoscientific) e, posteriormente, avaliadas quanto à expressão de XIAP por Western blotting. A lamina B foi utilizada como controle constitutivo nuclear, enquanto a Hsc70, como constitutivo citoplasmático. C: Citoplasma; N: Núcleo.

5.6 A indução da superexpressão dos vetores XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ aumenta a capacidade proliferativa das células MCF-7

Para investigar o efeito da superexpressão de XIAP na capacidade proliferativa das células transfectadas com os vetores plasmidiais, as células MCF-7 foram contadas, através da exclusão por azul de tripan e avaliadas quanto à capacidade de formação de colônias. Os vetores XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ apresentaram aumento no crescimento celular em 24 h após a transfecção comparados tanto com o vetor vazio (pEBB) quanto com o XIAP$^{wild\ type}$ (Figura 5.10A). Corroborando esses dados, as células transfectadas com o vetor XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ apresentaram um aumento estatisticamente significativo na formação de colônias, quando comparado com o vetor vazio e XIAP$^{wild\ type}$. As células transfectadas com o vetor XIAP$^{\Delta RING}$ apresentaram aumento na formação de colônias em comparação com o vetor vazio, porém quando comparadas com o vetor XIAP$^{wild\ type}$, houve apenas um discreto aumento na formação de colônias, que não atingiu significância estatística (Figura 5.10B). A diferença de resultados obtida com as células superexpressando os vetores XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ sugere que a XIAP precise estar na sua forma completa para exercer plenamente a sua função no núcleo. As células transfectadas com o vetor XIAP^{H467A}, onde a XIAP perde sua função ubiquitina E3 ligase, mostraram diminuição do crescimento celular e na formação de colônias, quando comparadas com o padrão de proliferação e formação de colônias das células transfectadas com XIAP$^{wild\ type}$ (Figura 5.10B). Posteriormente, as células superexpressando XIAP foram acompanhadas ao longo de três dias e avaliadas quanto à viabilidade celular. De forma consistente, observamos que a taxa de crescimento das células transfectadas com os vetores XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ se mostrou bastante superior às transfectadas com os outros vetores, onde apenas a expressão citoplasmática é encontrada (Figura 5.11). Novamente, o efeito observado com o vetor XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ foi mais pronunciado do que com o vetor XIAP$^{\Delta RING}$. Conjuntamente, esses dados mostram que a expressão nuclear de XIAP está associada ao aumento da capacidade proliferativa de células de câncer de mama.

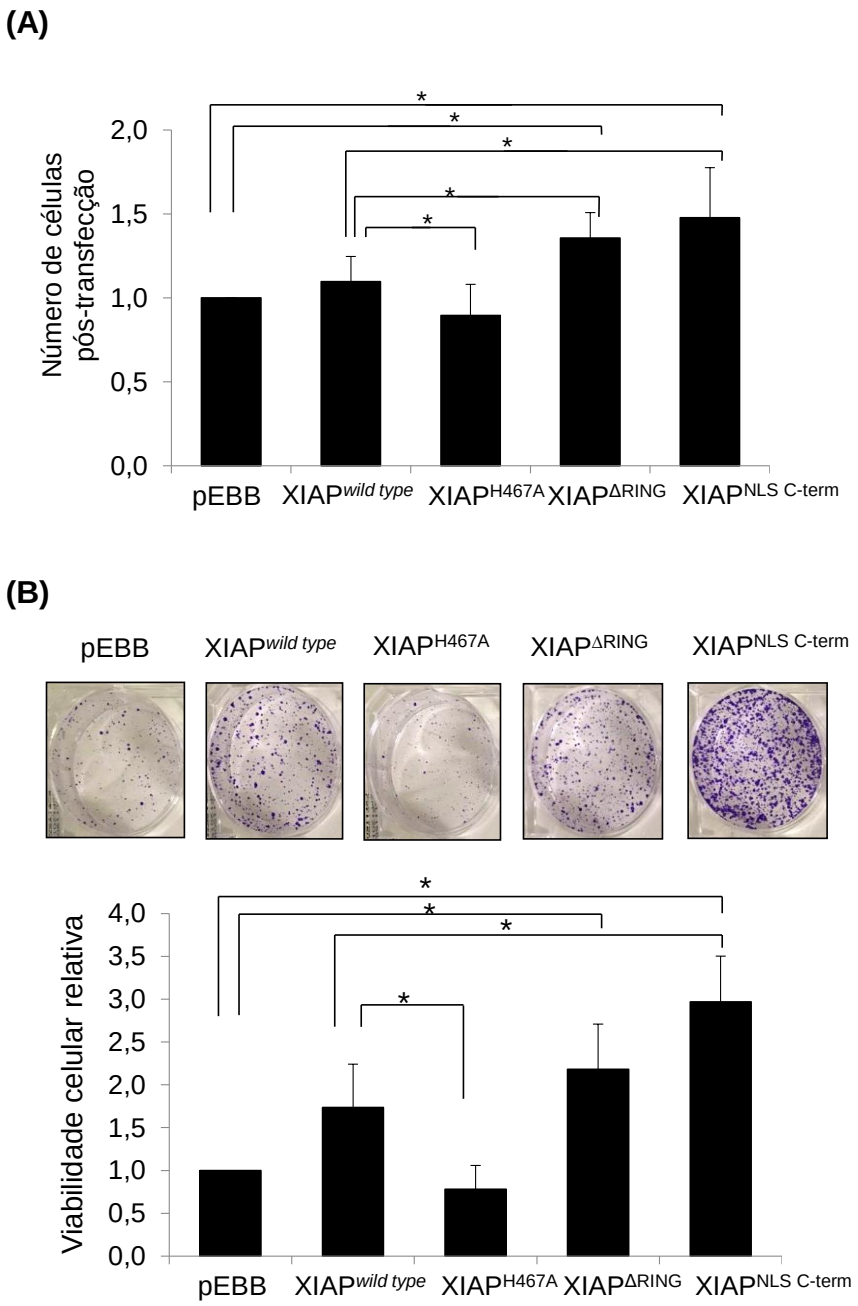


Figura 5.10: Efeito da indução da superexpressão de XIAP e seus mutantes no padrão de crescimento de células de câncer de mama. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de petri (10cm) ou, alternativamente, em placa de 6 poços por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os plasmídeos pEBB, $XIAP^{wild\ type}$, $XIAP^{H467A}$, $XIAP^{\Delta RING}$ e $XIAP^{NLS\ C\text{-}term}$, utilizando a Lipofectamina 2000. (A) As células transfectadas foram contadas através da exclusão por azul de tripan 24 h após a transfecção. O número total de células transfectadas com o vetor vazio (pEBB) obtido em cada experimento foi normalizado para o valor de 1. O gráfico corresponde às médias e desvio padrão de cinco experimentos independentes (Teste *t student*: $*p<0.05$; considerado estatisticamente significativo). (B) Após 24 h de transfecção, as células MCF-7 foram replaqueadas em placas de 6 poços e deixadas aderir por 24 h. As células foram deixadas crescer por cerca de 14 dias, e então, coradas com cristal violeta. O gráfico corresponde à média e desvio padrão de quatro experimentos independentes (Teste t student: $*p<0.05$; considerado estatisticamente significativo).

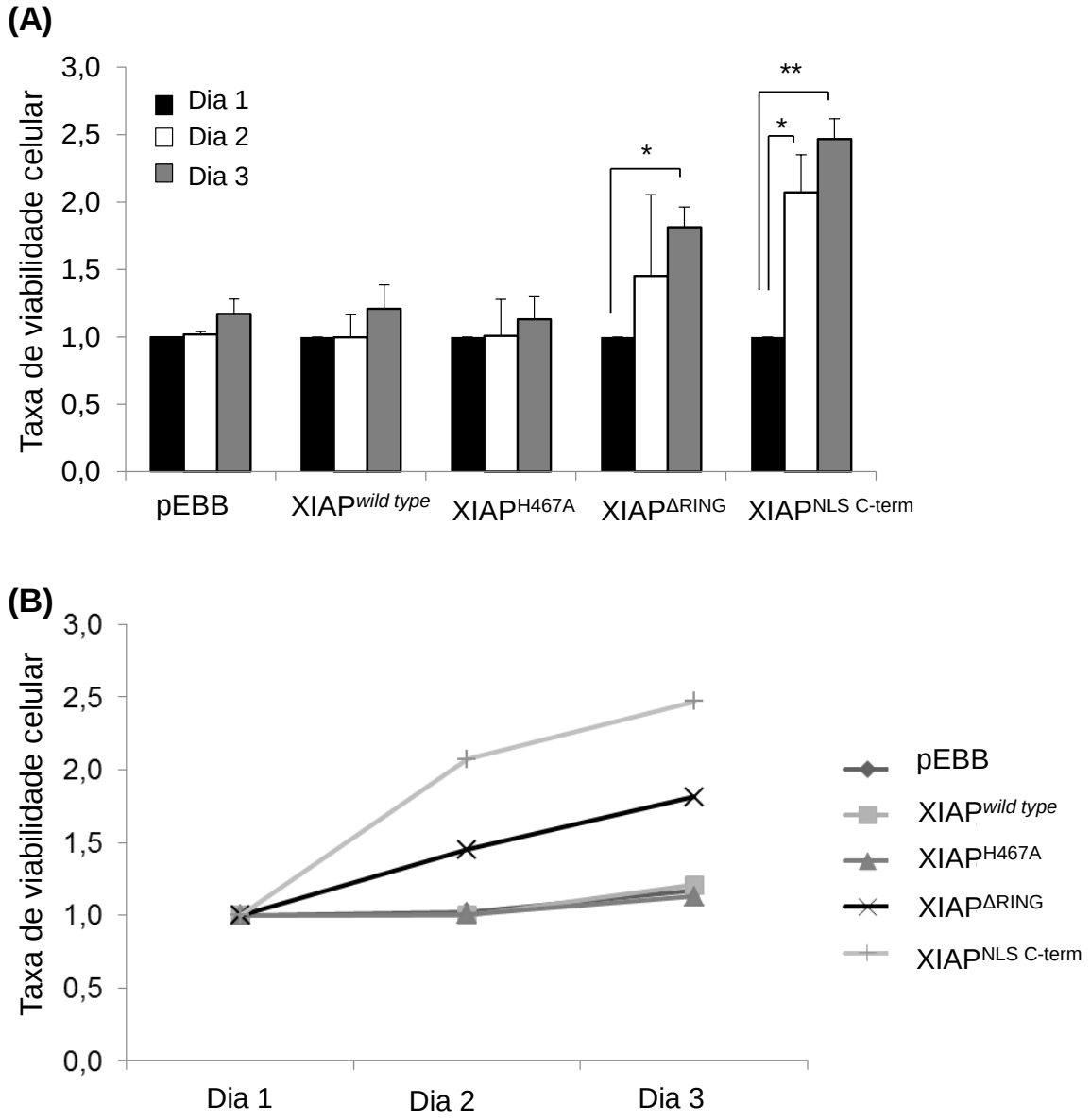


Figura 5.11: Taxa de viabilidade celular das células MCF-7 após a indução da superexpressão de XIAP e seus mutantes. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de petri (10 cm) por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, utilizando a Lipofectamina 2000. No dia seguinte, as células foram replaqueadas em placas de 96 poços e deixadas aderir por 24 h. (A) O padrão de crescimento celular foi avaliado no primeiro, segundo e terceiro dias pós-plaqueamento através do ensaio de MTT e a taxa de viabilidade celular das células transfectadas com os diferentes vetores foi calculada a partir da normalização da densidade ótica do primeiro dia (dia 1) para 1. Os gráficos correspondem às médias e desvio padrão de três experimentos independentes (Teste *t student*: $*p<0.05$; $**p<0.001$; considerado estatisticamente significativo). (B) Comparação do perfil de crescimento das células MCF-7 transfectadas com a XIAP e seus mutantes, excluindo-se o desvio padrão para melhor visualização do padrão de viabilidade celular observado em cada vetor.

5.7 A indução da superexpressão dos vetores XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ confere resistência ao tratamento com a dox

A fim de avaliar os efeitos da superexpressão de XIAP nuclear na resistência ao tratamento, as células MCF-7 foram transfectadas utilizando os plasmídeos pEBB, XIAP$^{wild\ type}$ e XIAP^{H467A}, usados como controle negativo de expressão nuclear, e, XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ positivos para localização nuclear. De forma interessante, a indução da superexpressão dos mutantes XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, onde a localização de XIAP é observada no núcleo, preveniu a diminuição de viabilidade celular induzida pela dox em 24 h de tratamento, de forma estatisticamente significativa, comparada com o vetor vazio e o XIAP$^{wild\ type}$ (Figura 5.12A). O fenótipo de resistência promovido pela expressão de XIAP no núcleo não foi prolongado nos tempos de 48 e 72 h (Figura 5.12B e C). Adicionalmente, foi avaliado se o tratamento com a dox inibiria a formação de colônias nas células transfectadas com XIAP e seus mutantes. Nossos resultados mostram que, diferentemente dos achados referentes à viabilidade celular, houve a inibição na formação de colônias induzida pela dox nas células superexpressando todos os vetores plasmidiais (Figura 5.13).

Os resultados diferentes obtidos no ensaio clonogênico e de MTT, que correspondem a análises de longa e curta duração, respectivamente, da viabilidade celular sugerem que a expressão de XIAP pode estar sendo perdida progressivamente após a transfecção. Por se tratar de uma transfecção transiente, o próximo passo foi avaliar se a superexpressão de XIAP seria mantida por até 96 h pós transfecção, tempo equivalente ao fim das 48 h do tratamento com a dox (remoção da droga) nos ensaios clonogênico e de MTT, como mostrado na figura 5.3. Como mostrado na Figura 5.14**,** após 96 h de transfecção, a superexpressão de XIAP foi perdida. Esse dado explica o fato de as células transfectadas com os mutantes apresentarem o mesmo perfil de sensibilidade em 48 e 72h de tratamento com a dox pelo ensaio de MTT, bem como o perfil semelhante de inibição de colônias induzida pela dox. Esse achado sugere que, no nosso modelo experimental de indução transiente da superexpressão de XIAP, é necessária a realização de ensaios de viabilidade ou morte celular de curta duração.

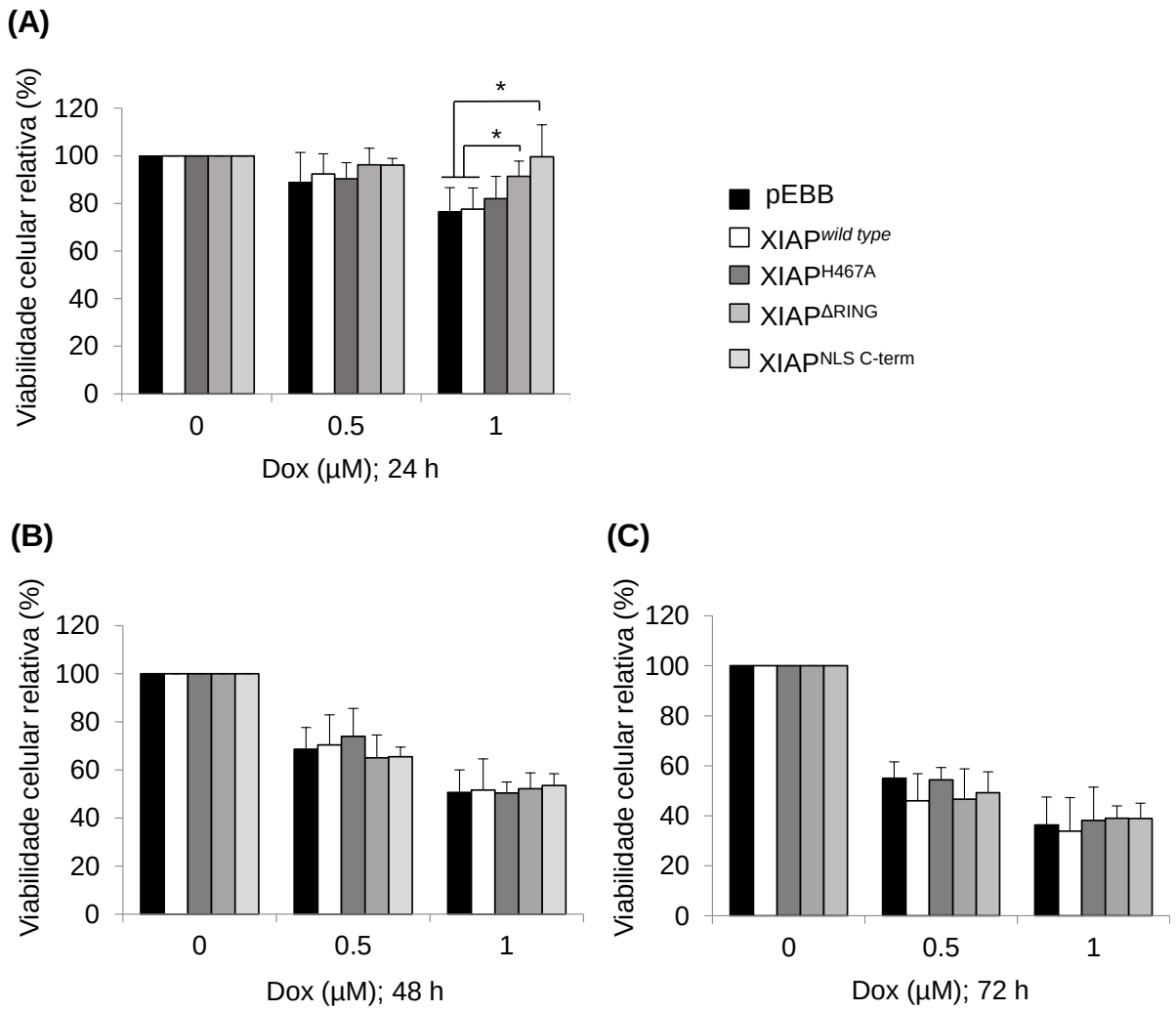
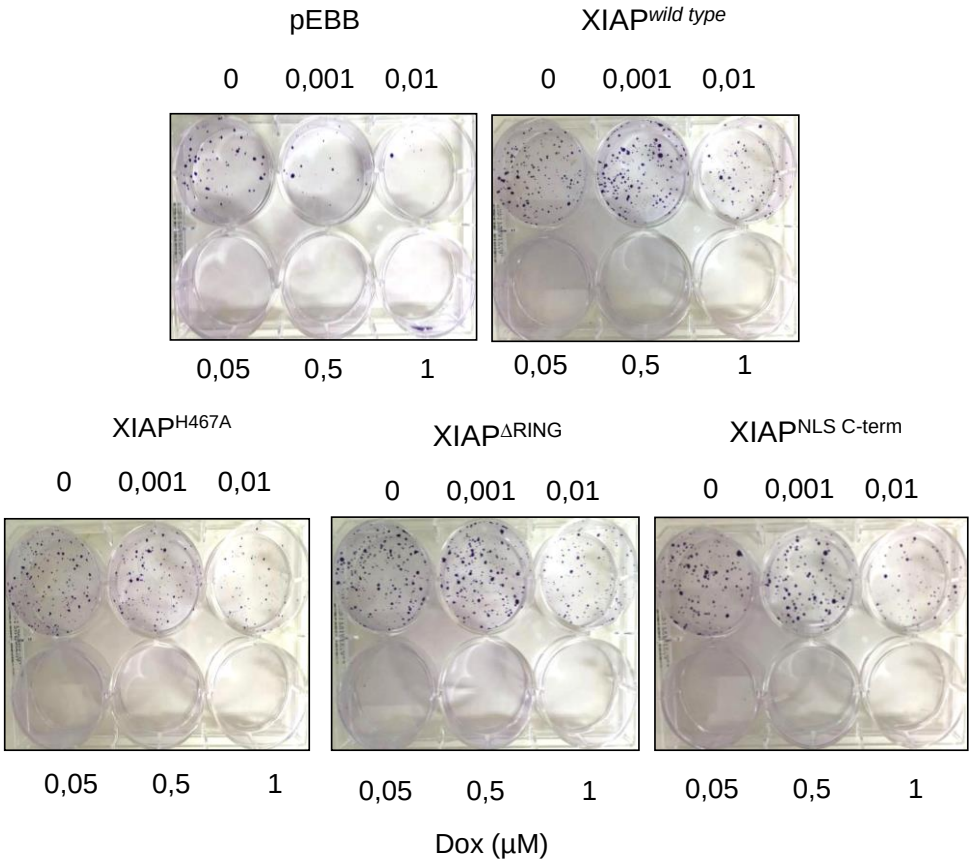


Figura 5.12: Alterações na viabilidade celular induzidas pela doxorrubicina (dox) em células MCF-7 transfectadas com os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de petri (10cm^2) por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os plasmídeos pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, utilizando a Lipofectamina 2000. No dia seguinte, as células MCF-7 foram replaqueadas em placas de 96 poços e deixadas aderir por 24 h. Posteriormente, as células foram expostas a 0,5 e 1 µM de dox por 24 (A), 48 (B) e 72 h (C). Para cada concentração de dox, as linhagens celulares transfectadas com os diferentes plasmídeos codificando a XIAP foram comparadas com as células transfectadas com a forma selvagem de XIAP e com o vetor vazio pEBB. O gráfico corresponde às médias e desvio padrão de três experimentos independentes (Teste *t student*: $*p<0.05$; considerado estatisticamente significativo).



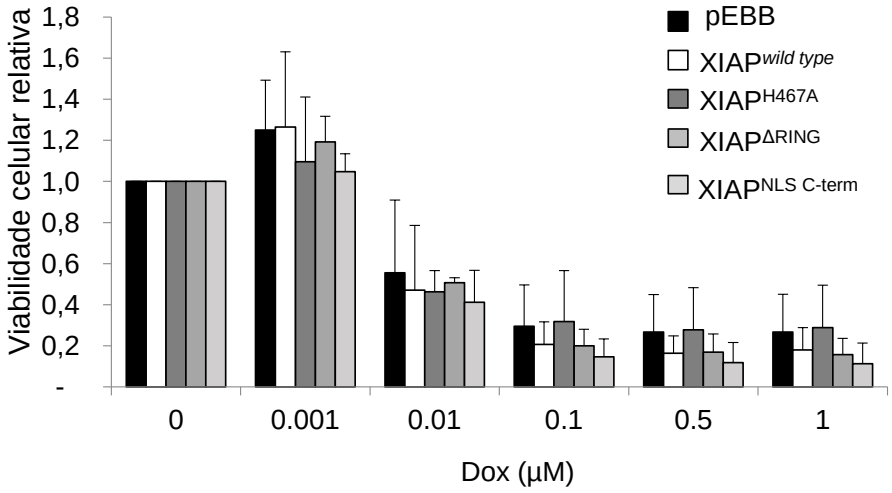


Figura 5.13: Alterações induzidas pela doxorrubicina (dox) no padrão de formação de colônias nas células MCF-7 superexpressando os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de petri (10cm) por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os plasmídeos pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, utilizando a Lipofectamina 2000. No dia seguinte, as células MCF-7 foram replaqueadas em placas de 6 poços e deixadas aderir por 24 h. Posteriormente, foi adicionada à dox em diferentes concentrações. Depois de 48 h de exposição ao quimioterápico, a droga foi retirada e as células foram deixadas crescer por cerca de 14 dias, e então, coradas com cristal violeta. Os gráficos são representativos de quatro experimentos independentes.

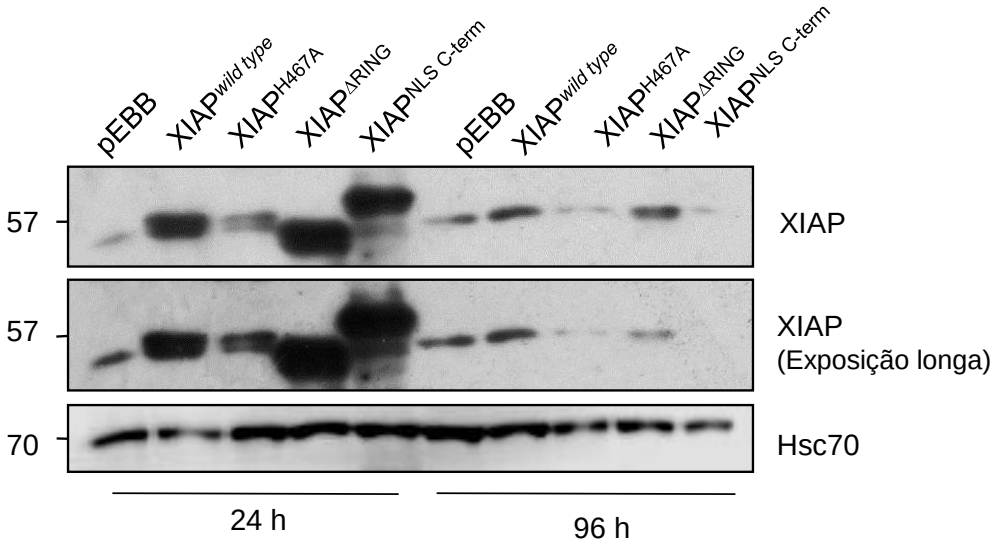


Figura 5.14: Expressão de XIAP em células MCF-7 superexpressando os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ 24 e 96 h após a transfecção. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de petri (10cm) por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os vetores pEBB, XIAP$^{wild\ type}$, XIAP^{H467A}, XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, utilizando a Lipofectamina 2000. Posteriormente, extratos proteicos totais foram preparados e avaliados para a expressão de XIAP por Western blotting em 24 e 96 h após a transfecção.

5.8 A expressão de XIAP nuclear identifica uma população com pior prognóstico dentre pacientes com câncer de mama negativo para receptores hormonais

A expressão de XIAP foi avaliada por imunohistoquímica em nossa coorte de pacientes com câncer de mama para um estudo anterior (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015). Para o presente estudo, a expressão de XIAP foi reanalisada com enfoque na associação entre a localização subcelular de XIAP e a sobrevida global das pacientes. Dentre um total de 145 pacientes com estádio IIIa, foi possível a análise dos níveis de XIAP em 138 casos, devido a material tumoral insuficiente ou com qualidade insatisfatória. A expressão de XIAP foi encontrada em 108 pacientes (78,3%), sendo que a localização subcelular se mostrou somente citoplasmática, somente nuclear ou nuclear e citoplasmática. Setenta e seis pacientes tiveram expressão citoplasmática, 18 expressão nuclear e 14 apresentaram XIAP tanto no núcleo, quanto no citoplasma. Dessa forma, as pacientes foram acompanhadas por 10 anos e a expressão e localização de XIAP foram correlacionadas com os dados de sobrevida global. Quando analisamos a expressão de XIAP nas 138 pacientes, observamos que não houve impacto da expressão de XIAP citoplasmática, nuclear ou em ambos os compartimentos na sobrevida global em 10 anos (Figura 5.15A).

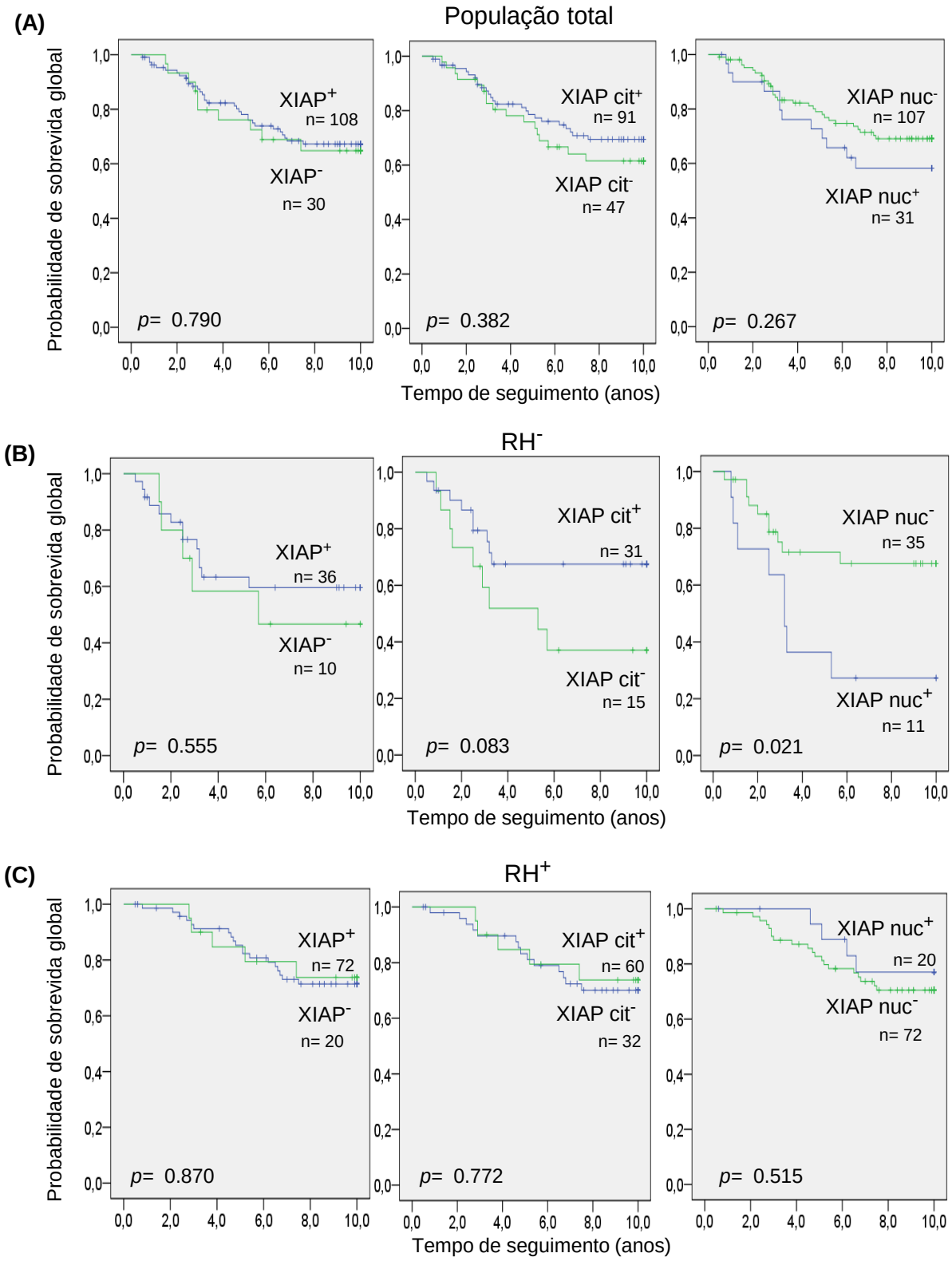


Figura 5.15: Diferenças na sobrevida global de pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama agrupadas de acordo com a expressão total, citoplasmática ou nuclear de XIAP na população total e nos subgrupos positivo e negativo para receptores hormonais (RH). As curvas de Kaplan-Meier, na população total (A), e nos subgrupos RH positivo (B) e negativo (C) foram comparadas pelo teste *log-rank*, onde o valor de $p<0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. O valor de n equivale ao número de pacientes analisadas para cada curva. Cit: Citoplasmática; Nuc: Nuclear.

Considerando que o câncer de mama é uma doença altamente heterogênea, analisamos o papel da expressão de XIAP em diferentes grupos de pacientes, de acordo com a idade, tamanho e grau do tumor, comprometimento linfonodal, invasão vascular e expressão dos receptores hormonais e de Her2. Não encontramos nenhuma associação entre a expressão e a localização de XIAP e a sobrevida global em 10 anos em nenhum dos grupos (dados não mostrados), com exceção da estratificação feita para pacientes positivas ou negativas para RH. Quando estratificamos as pacientes em subgrupos RH positivo e negativo, foi possível observar que as pacientes RH negativas que possuem XIAP nuclear (n=11) apresentaram sobrevida global reduzida de forma estatisticamente significativa (Figura 5.15B). Além disso, observamos que as pacientes que apresentaram XIAP citoplasmática (n=31), em comparação com as que não possuem (n=15), apresentaram uma tendência de sobrevida maior. Esses achados não foram confirmados nas pacientes positivas para RH, onde não encontramos diferenças significativas entre as curvas de sobrevida (Figura 5.15C).

Posteriormente, avaliamos separadamente a expressão exclusivamente citoplasmática ou nuclear de XIAP, excluindo as pacientes que apresentaram marcação simultânea de XIAP nuclear e citoplasmática. Corroborando os nossos achados prévios, observamos que na população total e nas pacientes RH positivas, não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de XIAP exclusivamente nuclear ou citoplasmática (Figura 5.16). Nas pacientes pertencentes ao subgrupo RH negativo, a presença de XIAP no núcleo, por si só, conferiu menor sobrevida global (n=5, sendo que quatro vieram a óbito), sugerindo que a presença da XIAP no núcleo, independentemente da sua expressão concomitante no citoplasma, leva a um prognóstico desfavorável nesse subgrupo específico. O conjunto desses dados aponta para um papel oncogênico para XIAP nuclear, diferentemente de XIAP citoplasmática, sugerindo que a XIAP desempenha papéis distintos no câncer de mama dependentes de sua localização subcelular.

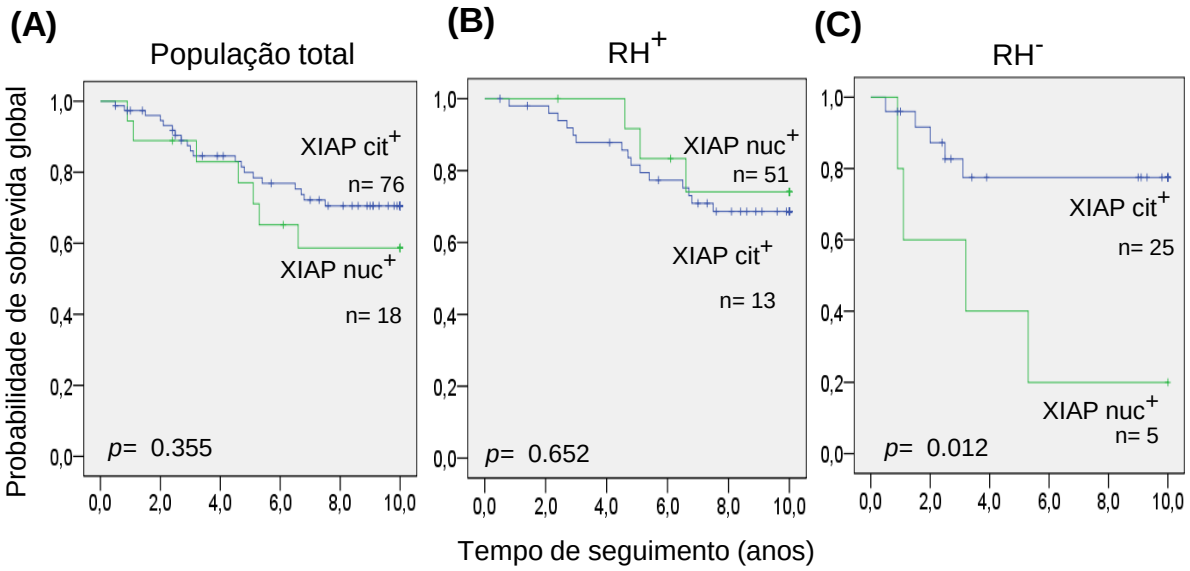


Figura 5.16: Diferenças na sobrevida global de pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama agrupadas de acordo com a presença de XIAP apenas na fração citoplasmática ou nuclear na população total e nos subgrupos positivo e negativo para receptores hormonais (RH). As curvas de Kaplan-Meier, na população total (A), e nos subgrupos RH positivo (B) e negativo (C) foram comparadas pelo teste *log-rank*, onde o valor de $p<0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. O valor de n equivale ao número de pacientes analisadas para cada curva. Cit: Citoplasmática; Nuc: Nuclear.

O próximo passo foi estratificar as pacientes em relação à positividade ou não de RH e à localização subcelular de XIAP. A Figura 5.17A mostra que as pacientes negativas para os receptores hormonais que não apresentam XIAP nuclear se agrupam quanto à sobrevida global de forma semelhante às pacientes classificadas como positivas para RH, cujo prognóstico é conhecidamente melhor. Quando separamos as pacientes RH positivas quanto à presença ou ausência de XIAP nuclear, fica mais claro o impacto da expressão da XIAP nuclear na sobrevida global de pacientes negativas para RH (Figura 5.17B). O conjunto dessas evidências indica que a presença de XIAP nuclear nas pacientes negativas para receptores hormonais leva a uma sobrevida global reduzida, podendo ser usada como potencial biomarcador de prognóstico no câncer de mama.

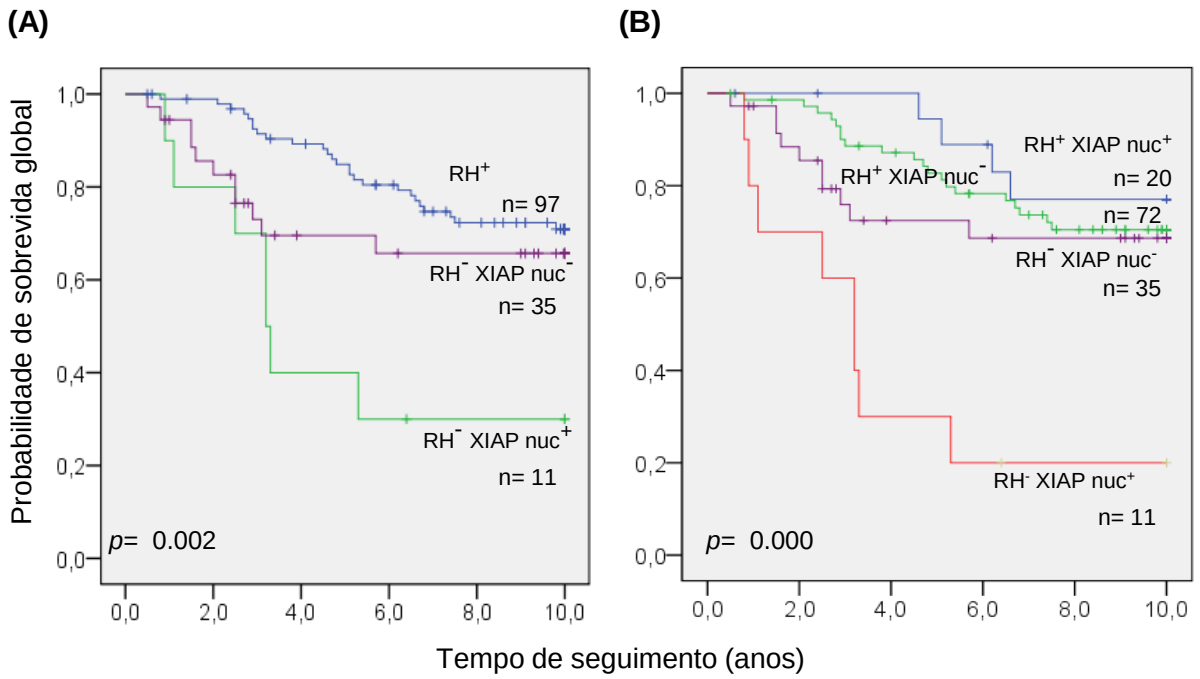


Figura 5.17: Diferenças na sobrevida global de pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama estratificadas de acordo com a positividade de receptores hormonais (RH) e localização de XIAP. (A) Subgrupos RH positivo e RH negativo com presença e ausência de expressão de XIAP nuclear. (B) Subgrupo RH positivo e negativo com presença ou ausência de expressão de XIAP nuclear. As curvas de Kaplan-Meier foram comparadas pelo teste *log-rank*, onde o valor de $p<0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. O valor de n equivale ao número de pacientes analisadas para cada curva. Nuc: Nuclear.

5.9 A expressão de XIAP citoplasmática e nuclear foi associada com fatores clínico-biológicos das pacientes com câncer de mama

Nosso próximo passo foi analisar a associação entre a localização subcelular de XIAP e parâmetros clinico-biológicos das pacientes positivas e negativas para receptores hormonais. Nas pacientes positivas para receptores hormonais, a presença de XIAP total e citoplasmática foi associada com a idade igual ou superior a 50 anos (Tabela 5.1). Além disso, a localização citoplasmática de XIAP foi associada com baixo grau tumoral. Os demais fatores investigados como tamanho do tumor, comprometimento nodal, invasão vascular e *status* de Her2 não foram estatisticamente associados à expressão de XIAP. É importante ressaltar que a idade superior a 50 anos e o baixo grau do tumor são características conhecidamente associadas a um prognóstico favorável em pacientes com câncer de mama (BUITRAGO *et al.*, 2011), apontando para um papel não-oncogênico de XIAP quando presente no citoplasma. Nenhuma associação entre a expressão nuclear de XIAP e parâmetros clinico-biológicos foi encontrada nas pacientes RH positivas.

Tabela 5.1: Expressão de XIAP nas pacientes pertencentes ao subgrupo positivo para receptores hormonais de acordo com os parâmetros clinico-biológicos

	Pacientes positivos para receptores hormonais								
Características	**XIAP total**			**XIAP citoplasmática**			**XIAP nuclear**		
			p			*p*			*p*
Idade	+	-	0.021*	+	-	0.027*	+	-	0.801
≥ 50	44	6		38	12		10	40	
< 50	28	14		22	20		10	32	
Tamanho			0.940			0.343			0.351
T1	14	3		13	8		6	11	
T2	43	11		11	16		10	44	
T3	10	2		7	4		3	9	
Grau tumoral			0.087			0.045*			0.548
Baixo (I/II)	48	10		42	16		10	48	
Alto (III)	16	9		12	13		6	19	
Comprometimento nodal			0.681			0.415			0.333
1 - 3	15	3		9	5		2	16	
4 - 9	12	1		38	2		3	10	
≥ 10	11	1		8	5		4	8	
Invasão vascular			1.000			1.000			0.152
Sim	29	8		24	13		7	30	
Não	21	6		17	10		10	17	
Her2			0.582			0.159			1.000
Sim	5	0		5	0		1	4	
Não	67	20		55	32		19	68	

$p<0.05$; estatisticamente significativo

Nas pacientes negativas para RH, a expressão citoplasmática de XIAP não pode ser associada a nenhum parâmetro clinico-biológico (Tabela 5.2). A localização nuclear de XIAP foi associada com o tamanho do tumor, mas com nenhum outro parâmetro clínico-biológico foi possível obter associação estatisticamente significativa. O conjunto desses dados sugere que a XIAP nuclear confere um prognóstico desfavorável a pacientes negativas para RH, independentemente de sua associação com outros fatores de prognóstico.

Tabela 5.2: Expressão de XIAP nas pacientes pertencentes ao subgrupo negativo para receptores hormonais de acordo com os parâmetros clinico-biológicos

	Pacientes negativos para receptores hormonais								
Características	**XIAP total**			**XIAP citoplasmática**			**XIAP nuclear**		
			p			*p*			*p*
Idade	+	-	0.476	+	-	1.000	+	-	0.732
≥ 50	19	7		17	9		7	19	
< 50	17	3		14	6		4	16	
Tamanho			0.086			0.543			0.016*
T1	8	1		5	2		5	4	
T2	14	8		3	10		2	20	
T3	7	0		2	1		3	4	
Grau tumoral			0.284			1.000			0.062
Baixo (I/II)	17	3		13	7		7	13	
Alto (III)	15	7		15	7		2	20	
Comprometimento nodal			0.725			0.218			0.786
1 - 3	5	2		7	2		2	5	
4 - 9	5	2		12	4		3	4	
≥ 10	2	2		6	2		1	3	
Invasão vascular			0.651			0.245			0.390
Sim	11	4		8	7		5	10	
Não	13	2		12	3		2	13	
Her2			0.284			0.243			0.658
Sim	7	1		7	1		1	7	
Não	29	9		24	14		10	28	

$p<0.05$; estatisticamente significativo

6. Discussão

O câncer de mama é um dos tipos tumorais mais frequentemente diagnosticados entre mulheres no Brasil e no mundo, com exceção dos tumores de pele não melanoma, além de apresentar elevadas taxas de mortalidade. Quando diagnosticado em fases iniciais, essa neoplasia é considerada de bom prognóstico, porém, no Brasil, o diagnóstico ainda é feito tardiamente, comprometendo a eficiência do tratamento e diminuindo as chances de cura (Ministério da Saúde, Estimativas 2016, Incidência de Câncer no Brasil, 2016). Apesar das melhorias no tratamento, com a implementação da hormonioterapia, utilizando o tamoxifeno e inibidores de aromatase em pacientes positivas para RH (FITZGIBBONS *et al.*, 2000), e da terapia-alvo, com o uso do trastuzumabe em pacientes superexpressando Her2 (WOLFF *et al.*, 2007), existe um grupo de pacientes que não possui terapia específica por não apresentar o RH, tampouco o Her2. Portanto, essas pacientes são tratadas apenas com a terapia convencional, baseada na utilização de antraciclinas e taxanos (TANG *et al.*, 2016). Diversos mecanismos de quimiorresistência já foram descritos no câncer. Um mecanismo de resistência abordado nesse trabalho foi a superexpressão das IAPs, mas especificamente, da XIAP (SHI *et. al*, 2007). A expressão da XIAP pode ser detectada em altos níveis em diversos tumores (RAMP *et al.*, 2004; MURIS *et al.*, 2005), incluindo o câncer de mama (PANDEY *et al.*, 2016), e está associada a um prognóstico desfavorável (AIRD *et al.*, 2010), além de resistência à quimioterapia e à radioterapia (AMANTANA *et al*., 2004; FLANAGAN *et al.*, 2015). Já foi visto que a XIAP pode ser encontrada em diferentes compartimentos celulares. A localização subcelular de XIAP é predominantemente citoplasmática tanto em tecidos não neoplásicos quanto em tecidos oriundos de tumores (VISCHIONI *et al.*, 2006). Nas neoplasias, o padrão de distribuição subcelular de XIAP pode variar, onde é encontrado no núcleo, no citoplasma ou em ambos os compartimentos celulares. Porém, na maior parte dos tumores estudados, a expressão de XIAP se encontra principalmente no citoplasma (LIU *et al.*, 2001; McELENY *et al*., 2002; SILVA *et al* 2006; FACCION *et al*., 2012; NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015).

No câncer de mama, foi feito um dos primeiros relatos de que a marcação de XIAP nuclear poderia ser uma ferramenta prognóstica importante, associada a um desfecho desfavorável para as pacientes (ZHANG *et al.*, 2011). Dessa forma, nos questionamos qual seria o papel da XIAP nuclear na contribuição para um fenótipo mais agressivo nessa neoplasia. Inicialmente, investigamos se as linhagens celulares de câncer de mama apresentariam a expressão de XIAP nuclear. Nossos dados mostram que todas as linhagens

celulares testadas apresentam expressão de XIAP, apesar de níveis diferentes quando comparando entre elas. Quanto à localização subcelular de XIAP, detectamos a sua expressão no citoplasma de todas as linhagens. Entretanto, nos nossos modelos de células resistentes ao paclitaxel e a dox, também observamos a expressão de XIAP na fração nuclear de forma mais abundante que as demais linhagens celulares estudadas. Esse dado nos sugere que a expressão nuclear de XIAP pode estar associada com a resistência ao tratamento com quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação. De forma consistente, constatamos que as células que não apresentam XIAP nuclear, tiveram diminuição na viabilidade celular e na formação de colônias, se mostrando sensíveis ao tratamento com os quimioterápicos. Dados publicados apontam que as células MDA-MB-231 e MCF-7 apresentam características de agressividade, invasividade e expressão proteica distintas (GARTEL *et al.*, 2003; NAGAJARA *et al.*, 2006; HOLLIDAY & SPEIRS, 2011). Independentemente dessas características distintas, ambas as células responderam ao tratamento a dox, corroborando dados já encontrados pelo nosso grupo (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2013) e sugerindo que os compostos sensibilizam células derivadas de diferentes subtipos moleculares.

O próximo passo foi verificar se a localização subcelular de XIAP poderia ser alterada mediante o tratamento com quimioterápicos. Observamos que o tratamento com a dox ou com o paclitaxel não modulou a localização de XIAP nas células quimiorresistentes derivadas de câncer de mama estudadas, cuja expressão se manteve no núcleo. De forma interessante, observamos que as linhagens celulares sensíveis ao tratamento com os quimioterápicos apresentaram aumento na expressão de XIAP na fração citoplasmática, sugerindo que a XIAP citoplasmática pode estar envolvida na sensibilidade observada nessas linhagens celulares. Um estudo mostrou que, mediante o tratamento de células derivadas de linfomas com uma variedade de drogas que induzem a apoptose, como a dox, daunorrubicina, taxol e vincristina, a XIAP é translocada para o núcleo (NOWAK *et al.*, 2004). Corroborando esses achados, SIEGELIN *et al.* (2005) e RUSSEL *et al.* (2008) mostraram que, a XIAP é translocada para o núcleo, mediante isquemia cerebral, e as células são encaminhadas para a apoptose. Esses estudos atribuíram a mudança de localização ao afastamento do seu papel inibitório de caspases e, consequentemente, do controle da apoptose. Em conjunto, esses dados sugerem que a XIAP pode desempenhar diferentes papéis dependendo de sua localização subcelular, em um processo dinâmico que pode ser regulado por diferentes estímulos.

A fim de avaliar o papel de XIAP nuclear na proliferação celular e reversão da sensibilidade observada nas células derivadas de câncer de mama sensíveis ao tratamento com a dox, transfectamos as células com diferentes vetores codificando a XIAP. Utilizamos como

ferramenta para indução da expressão nuclear, o vetor XIAP$^{\Delta RING}$, onde observamos a expressão de XIAP sem o domínio RING devido à inserção de um *stop codon* no resíduo 448 da proteína. Essa alteração faz com que a parte referente ao domínio RING não seja traduzida. Também utilizamos o vetor XIAP^{H467A}, que possui uma mutação pontual, com a troca dos aminoácidos histidina por alanina no resíduo 467 da proteína. Essa mutação faz com que a XIAP perca sua função de ubiquitina E3 ligase, sem perder o domínio RING (LEWIS *et al.*, 2004) e, assim, esse vetor é um controle experimental importante. Apesar de não haver estudos acerca da localização subcelular de XIAP utilizando esses vetores em células de câncer de mama, um estudo recente mostrou que XIAP$^{\Delta RING}$ pode ser detectada não apenas na fração citoplasmática, mas também no núcleo, enquanto o vetor XIAP^{H467A} é encontrado principalmente na fração citoplasmática de células derivadas de câncer de cólon (CAO *et al.*, 2014). Esses dados mostram que a localização subcelular de XIAP é modulada independentemente de seu papel de ubiquitina E3 ligase. Além disso, para avaliar a importância de XIAP estar na sua forma completa no núcleo, dois vetores foram construídos a partir da inserção de um NLS na porção N e C-terminal do vetor *wild type* de XIAP, chamados de XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, respectivamente. Assim como observado no estudo de CAO *et al.* (2014), nas células superexpressando o vetor XIAP$^{\Delta RING}$, foi detectada a expressão nuclear de XIAP, enquanto as células superexpressando o vetor XIAP^{H467A}, só foi possível detectar a expressão citoplasmática. Ainda não é conhecido o motivo pelo qual a ausência do domínio RING resulta na expressão da XIAP no núcleo. Possivelmente, o domínio RING interage com alguma molécula no citoplasma ou mesmo com outros domínios da XIAP, mascarando sítios de interação com importinas. Nos vetores construídos pelo nosso grupo, observamos que apenas as células transfectadas com o vetor XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ apresentaram expressão nuclear de XIAP. Uma vez que a proteína é traduzida nas células transfectadas com o vetor XIAP$^{NLS\ N\text{-}term}$, a nossa hipótese é que a expressão de XIAP não foi detectada no núcleo porque o NLS na porção N-terminal pode ter sido escondido por mudanças conformacionais. Apesar de todos os vetores utilizados induzirem a superexpressão de XIAP em relação às células transfectadas com o vetor vazio, quando os vetores são comparados entre si, detectamos diferença na expressão de XIAP. Mesmo após testes para verificar a eficiência da transfecção, notamos que os níveis de expressão de XIAP permaneceram diferentes entre os vetores, o que sugere que as mutações geradas na XIAP impactem na forma como a proteína é regulada pós-traducionalmente e, principalmente, na sua estabilidade.

Apesar de pouco se conhecer sobre os mecanismos de regulação da localização de XIAP, alguns mecanismos de regulação da sua expressão já foram descritos. Sabe-se que, uma vez no citoplasma, a XIAP pode ser regulada negativamente por SMAC/Diablo e HtrA2/Omi, que impedem a sua ligação às caspases e consequentemente, o seu papel na inibição da apoptose (SEONG *et al.,* 2004; GAO *et al.,* 2007). A XIAP também pode ser regulada negativamente por outra proteína liberada da mitocôndria após estímulos apoptóticos, chamada ARTS (*Apoptosis-Related Protein In The TGF-β Signaling Pathway*) que pode se ligar e reduzir os seus níveis protéicos (GARRISON *et al.,* 2011). Um estudo demonstrou que a tradução de XIAP pode ser inibida pela eIF2α (*eukaryotic translation initiation factor 2*), sendo encaminhada para degradação via ATF4 (*activating transcription factor 4*), ambas proteínas envolvidas na resposta ao estresse de retículo endoplasmático, o que sugere uma regulação negativa da expressão de XIAP (HIRAMATSU *et al,* 2014). Outro mecanismo importante de regulação da XIAP é a função de ubiquitina E3 ligase exercida por ela própria, via domínio RING, onde os altos níveis de expressão encontrados nas células superexpressando o vetor $XIAP^{\Delta RING}$ podem ser devido a perda de sua autorregulação mediada por esse domínio. Apesar de SHIN *et al.* (2003) demonstrarem que XIAP é ubiquitinada principalmente em resíduos de lisina encontrados fora do domínio RING, um outro estudo utilizando um modelo murino, mostrou que altos níveis de XIAP sem a presença do domínio RING podem ser detectados (SCHILE *et al.,* 2008), além de a proteína se apresentar mais resistente à ubiquitinação (YANG *et al.,* 2000) e mais estável após estímulos apoptóticos (SCHILE *et al.,* 2008). As células pode se autorregular por ubiquitinação (YANG *et al.,* 2000). Por conta disso, as células superexpressando o vetor $XIAP^{H467A}$ apresentaram níveis mais baixos de expressão de XIAP quando comparadas com o vetor $XIAP^{\Delta RING}$, mesmo ambos codificando proteínas mutadas sem a função de ubiquitina E3 ligase. Isso sugere que, para que a autorregulação de XIAP aconteça, sejam necessárias mutações em outros sítios responsáveis pela função ubiquitina E3 ligase. Deve ser levado em consideração que, apesar de perder sua função de ubiquitina E3 ligase, a XIAP não perde o domínio RING completamente após a transfecção com o vetor $XIAP^{H467A}$, apontando para a importância de sítios de regulação para outras proteínas presentes nesse domínio da proteína. Outro ponto importante é que um estudo mostrou que Smac3, isoforma de SMAC/Diablo, pode desencadear a degradação de XIAP de maneira dependente de RING, mostrando o papel importante desse domínio na regulação de XIAP mediada por outras proteínas (FU *et al.,* 2003). Dessa forma, se torna de extrema relevância avaliar o impacto da expressão nuclear de XIAP apresentando o domínio RING em sua estrutura. Nossos dados mostram que as células

superexpressando o vetor XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$ apresentam maiores níveis de expressão de XIAP, o que pode ser explicado pela perda da regulação citoplasmática, uma vez que uma parcela da expressão de XIAP é encontrada no núcleo. Também pode ser sugerida uma possível mudança conformacional na estrutura da proteína após a inserção de um NLS próximo ao RING, escondendo sítios importantes de regulação que poderiam estar presentes no domínio RING. Esses dados sugerem que, uma vez no núcleo, é possível que XIAP não se autorregule e não sofra regulação por outras proteínas, uma vez que seus principais antagonistas estão presentes no citoplasma das células. Como consequência, a regulação por ubiquitinação de XIAP é reduzida e a sua estabilidade aumenta, resultando em maior expressão proteica.

Após a validação do nosso modelo experimental, avaliamos se a capacidade proliferativa das células seria alterada, mediante a indução da expressão de XIAP nuclear. De forma interessante, vimos que as células transfectadas com os vetores onde é encontrada a expressão nuclear de XIAP, XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, apresentaram uma taxa de crescimento maior tanto em comparação ao vetor vazio quanto as células superexpressando XIAP *wild type*, sugerindo que a expressão nuclear de XIAP está envolvida no maior potencial proliferativo. Corroborando esses dados, CAO *et al*. (2014) mostraram que células de câncer de cólon superexpressando o vetor XIAP$^{\Delta RING}$ apresentaram um maior crescimento independente de ancoragem e taxa proliferativa. Esses efeitos foram associados à indução do fator de transcrição E2F1, levando a ativação da ciclina E, e a progressão do ciclo celular. Apesar de não ter sido avaliada a localização subcelular de XIAP, um estudo recente mostrou que a transfecção com o vetor XIAP$^{\Delta RING}$ suprime a expressão do miR-200a, promovendo a ativação de EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal) e levando a maiores níveis de proliferação celular em células derivadas de câncer de bexiga (HUANG *et al.*, 2017). O fator de transcrição NFκB também poderia interagir com XIAP e estar associado com a indução de proliferação celular encontrada nas células transfectadas com os vetores XIAP$^{\Delta RING}$ e XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, uma vez que estudos mostram que existe ativação da via de NFκB por domínios específicos de XIAP, como o BIR1 e UBA (LU, et al., 2007; GYRD-HANSEN *et al.*, 2008). É interessante ressaltar que as células superexpressando o vetor XIAP$^{NLS\ C\text{-}term}$, apresentaram níveis maiores de proliferação em comparação as células superexpressando o vetor XIAP$^{\Delta RING}$, sugerindo que a presença da XIAP em sua estrutura completa no núcleo seja importante para que esta desempenhe seu papel na proliferação celular de forma plena. De forma consistente, detectamos que as células transfectadas com o vetor XIAP^{H467}, mutação pontual que resulta na perda da função de ubiquitina E3 ligase, apresentaram diminuição nas taxas de proliferação celular comparadas com as células transfectadas com XIAP$^{wild\ type}$. CAO

et al. (2012) mostraram que as células deletadas para XIAP podem ter seu crescimento independente de ancoragem e crescimento celular restaurado quando XIAP em sua forma selvagem é superexpressa nas células HTC116 (células derivadas de câncer de cólon), o que não é observado quando as células são transfectadas com o vetor $XIAP^{H467A}$. Em conjunto, esses dados sugerem que a presença da XIAP no núcleo está associada a um fenótipo mais proliferativo em células de câncer de mama. Ainda será necessário estudar os mecanismos que levam a esse fenótipo, bem como possíveis parceiros para XIAP nesse contexto.

A expressão de XIAP está associada com a quimiorresistência em diversos modelos tumorais, como carcinoma de ovário (MIYAMOTO *et al.*, 2014), pâncreas (LI *et al.*, 2006), pulmão (HOFFMAN *et al.* 2002), renal (RAMP *et al.*, 2004) e mama (AIRD *et al.*, 2008). Esses estudos mostraram que o silenciamento de XIAP tornou as células mais sensíveis ao tratamento, indicando o seu envolvimento na resistência aos quimioterápicos. Porém, outros estudos mostram que elevados níveis de XIAP, por si só, não conferem resistência aos quimioterápicos, sendo importante levar em consideração outros fatores como o status dos moduladores de XIAP, como SMAC (SEEGER *et al.*, 2010). Além disso, um trabalho do nosso grupo revelou que o silenciamento de XIAP não tornou as células MDA-MB-231 e MCF-7, mais sensíveis ao tratamento com a dox, e que esse quimioterápico induz efeitos citotóxicos independentemente da expressão de XIAP (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2013). Uma vez que esse estudo não levou em consideração a localização subcelular de XIAP, avaliamos se isso teria um papel no fenótipo de resistência ao tratamento com a dox. De forma interessante, vimos que as células transfectadas com os vetores $XIAP^{\Delta RING}$ e $XIAP^{NLS\ C\text{-}term}$, onde foi possível detectar a presença nuclear de XIAP e aumento na proliferação celular, se tornaram mais resistentes ao tratamento com a dox por 24 h. Assim como nos ensaios de proliferação celular, notamos que as células transfectadas com o vetor $XIAP^{NLS\ C\text{-}term}$ apresentaram uma menor diminuição na viabilidade celular induzida pela dox comparadas com o vetor $XIAP^{\Delta RING}$. Esse dado reforça a importância da XIAP em sua estrutura completa no núcleo para desempenhar seu papel oncogênico não apenas na proliferação celular, como também no perfil de resistência após o tratamento com a dox. O efeito da superexpressão da XIAP no núcleo na contribuição para a resistência não foi confirmado em 48 e 72 h de tratamento com a dox, pelo ensaio de MTT, nem pelo ensaio clonogênico. Por se tratar de uma transfecção transiente, observamos que a expressão de XIAP foi perdida progressivamente ao longo dos dias de transfecção. Portanto, para avaliar melhor o papel na quimiorresistência e na proliferação celular exercido pela XIAP nuclear, é necessária a realização de ensaios de curta duração, como a detecção da população em sub-G0 e a

avaliação de possíveis mudanças no ciclo celular, por citometria de fluxo. Alternativamente, esses experimentos podem ser realizados com linhagens superexpressando os mutantes de XIAP de forma estável após a seleção de clones com ampicilina, antibiótico cujas células transfectadas com os plasmídeos em questão apresentam resistência. Em conjunto, esses dados mostram que a avaliação adicional da localização subcelular de XIAP parece ser importante, visto que o papel da expressão de XIAP, por si só, não é consistentemente implicado com o fenótipo de resistência e/ou proliferação celular nas linhagens celulares de câncer de mama.

A fim de avaliar e confirmar o papel de XIAP nuclear como marcador no prognóstico em pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama, o subtipo mais comum no Brasil e no mundo, nós reanalisamos os dados referentes à expressão de XIAP da nossa coorte de pacientes realizados para um estudo anterior (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015), porém agora com o enfoque na sua localização subcelular. A XIAP é encontrada, predominantemente, no citoplasma tanto nas células tumorais quanto em células não neoplásicas (VISCHIONI *et al*., 2006). Na coorte utilizada para essas análises, detectamos expressão positiva para XIAP em, aproximadamente 80% das amostras de pacientes avaliadas. Corroborando nossos dados, ZHANG *et al.* (2011) detectaram expressão de XIAP em cerca de 83%, assim como HINNIS *et al.* (2007) que encontraram expressão de XIAP em torno de 90% nas amostras de pacientes com câncer de mama. Além disso, estudos publicados anteriormente indicam que a expressão de XIAP é encontrada em diversos tipos tumorais, como câncer renal, onde sua expressão foi detectada em 95% das amostras de pacientes e considerada como fator de prognóstico independente, porém sem estratificar quanto à localização subcelular de XIAP (RAMP *et al.*, 2004). Também foi observada positividade para expressão de XIAP em amostras de pacientes com leucemia mielóide aguda (TAMM *et al.*, 2000) e câncer de mama (PANDEY *et al.*, 2016) em um percentual de pacientes similar ao encontrado no nosso estudo. Na nossa coorte de pacientes, a expressão e localização subcelular de XIAP não foi associada a alterações no prognóstico e sobrevida, exceto quando as pacientes foram separadas nos subgrupos positivos e negativos para RH. A localização subcelular de XIAP foi detectada no citoplasma e/ou núcleo, corroborando dados encontrados por ZHANG *et al.* (2011). Nesse estudo, foi demonstrado que a expressão nuclear de XIAP foi identificada como marcador independente de prognóstico nas pacientes com câncer de mama, relacionando sua expressão nuclear com a sobrevida global reduzida. No nosso estudo anterior (NESTAL DE MORAES *et al.*, 2015), corroborando dados já estabelecidos pela literatura, as pacientes negativas para receptores hormonais apresentaram sobrevida global

reduzida, e consequentemente, pior prognóstico (ABREU & KOIFMAN *et al.*, 2002; BUITRAGO *et al.*, 2011). Os nossos dados apontam para um papel oncogênico exercido por XIAP quando esta se localiza no núcleo nas pacientes negativas para RH. Observamos, nesse subgrupo específico, que a presença de XIAP nuclear reduziu a sobrevida global das pacientes. Esses achados foram diferentes nas pacientes da população total e nas pacientes positivas para RH, onde não houve mudança na sobrevida global de acordo com a expressão e/ou localização de XIAP. Portanto, com nosso atual estudo, identificamos um grupo de pior prognóstico, dentro de um subgrupo de pacientes negativas para RH, onde o desfecho clínico já é desfavorável. O próximo passo foi associar a localização subcelular de XIAP com parâmetros clinico-biológicos nos subgrupos negativo e positivo para RH. Na nossa coorte de pacientes positivas para RH, a expressão total e citoplasmática de XIAP foi associada com características consideradas de bom prognóstico, como idade maior que 50 anos e baixo grau tumoral (ABREU & KOIFMAN *et al.*, 2002; BUITRAGO *et al.*, 2011), corroborando a tendência a um melhor prognóstico observada. Nossos dados contrastam os do estudo publicado por ZHANG *et al*. (2011) onde não houve associação de XIAP citoplasmática com nenhum parâmetro clinico-biológico. Ao contrário do que observamos, XU *et al.* (2014) demonstraram que há associação da expressão de XIAP citoplasmática com pacientes negativas para p53 e com o status de Her2, associando-a com fatores de prognóstico adverso no câncer de mama. É importante que seja levado em consideração que diferentemente do nosso estudo, ZHANG *et al.* (2011) e XU *et al.* (2014) utilizaram amostras de pacientes de câncer de mama pertencentes a grupos não estratificados. Possivelmente, não encontramos associação, porque o nosso estudo foi conduzido com amostras de pacientes de um grupo específico, estádio IIIa, enquanto os trabalhos citados não especificaram o grupo de pacientes, sendo provável que tenham utilizado amostras mais heterogêneas. Nas pacientes negativas para RH, a expressão de XIAP não foi associada a nenhum parâmetro clinico-biológico investigado, exceto a localização nuclear de XIAP que foi associada com o tamanho do tumor. Em conjunto, nossos dados reforçam a ideia de que a XIAP pode desempenhar diferentes papéis dependentes de sua localização subcelular, estando a presença citoplasmática associada com parâmetros de bom prognóstico e uma maior sobrevida, enquanto a expressão nuclear é associada a uma menor sobrevida global nas pacientes com câncer de mama. Para validação e confirmação dos nossos dados, é necessário que essas análises sejam feitas numa coorte maior de pacientes.

Os mecanismos responsáveis pela translocação de XIAP do citoplasma para o núcleo ainda não são conhecidos. Um mecanismo bem descrito de transporte nuclear é o mediado por

NLS clássicos ou não clássicos, que estão presentes em algumas proteínas que são endereçadas para o núcleo. Porém, utilizando ferramentas de predição de NLS, observamos que a XIAP não apresenta NLS clássico tampouco o não clássico na sua estrutura. Uma forma descrita de sequestro nuclear de XIAP foi demonstrado por LISTON *et al.* (2001). Esse estudo mostrou que a proteína XAF1 pode interagir diretamente com XIAP e levá-la para o núcleo. Porém, XAF1 é uma proteína proapoptótica e supressora tumoral, cujo promotor se encontra hipermetilado no câncer (VICTORIA-ACOSTA *et al.*, 2015). Portanto, sua expressão é silenciada em tumores, indicando que possivelmente XAF1 não é responsável por translocar XIAP nas células resistentes de câncer de mama. Outro estudo demonstrou que a proteína Vgl-4 também está envolvida na translocação citoplasma-núcleo da XIAP (JIN *et al.* 2011). Esse mecanismo foi considerado favorável à indução de apoptose, uma vez que a XIAP, quando localizada no núcleo, se encontra afastada de sua função antiapoptótica. Porém, dados do presente estudo e já publicados (ZHANG *et al.*, 2011; CAO *et al.*, 2014) mostram que a XIAP nuclear parece desempenhar um papel oncogênico, levando as células à proliferação e à resistência a drogas utilizadas no tratamento do câncer de mama. Além de não estar elucidado o mecanismo de transporte de XIAP para o núcleo, também pouco se sabe acerca dos possíveis parceiros de XIAP quando localizada no núcleo. CAO *et al.* (2014) mostrou que uma vez no núcleo, a XIAP pode interagir diretamente com o fator de transcrição, E2F1, conduzindo a maior expressão de ciclina E e, consequentemente, à proliferação celular. Portanto, E2F1 pode ser um possível parceiro de XIAP nuclear.

Em conclusão, demonstramos que a XIAP pode ser encontrada em diferentes compartimentos subcelulares em linhagens celulares e amostras de pacientes com câncer de mama, desempenhando papéis distintos dependentes da sua localização. De forma notável, a presença de XIAP no núcleo foi associada à proliferação celular e à resistência às drogas *in vitro*, bem como a um prognóstico adverso em pacientes, sugerindo o seu papel na contribuição de um fenótipo mais agressivo nessa neoplasia (Figura 6.1). Nossos achados não somente auxiliam uma melhor compreensão dos mecanismos de quimiorresistência, como também geram conhecimento para a estratificação de pacientes de câncer de mama com desfechos clínicos distintos.

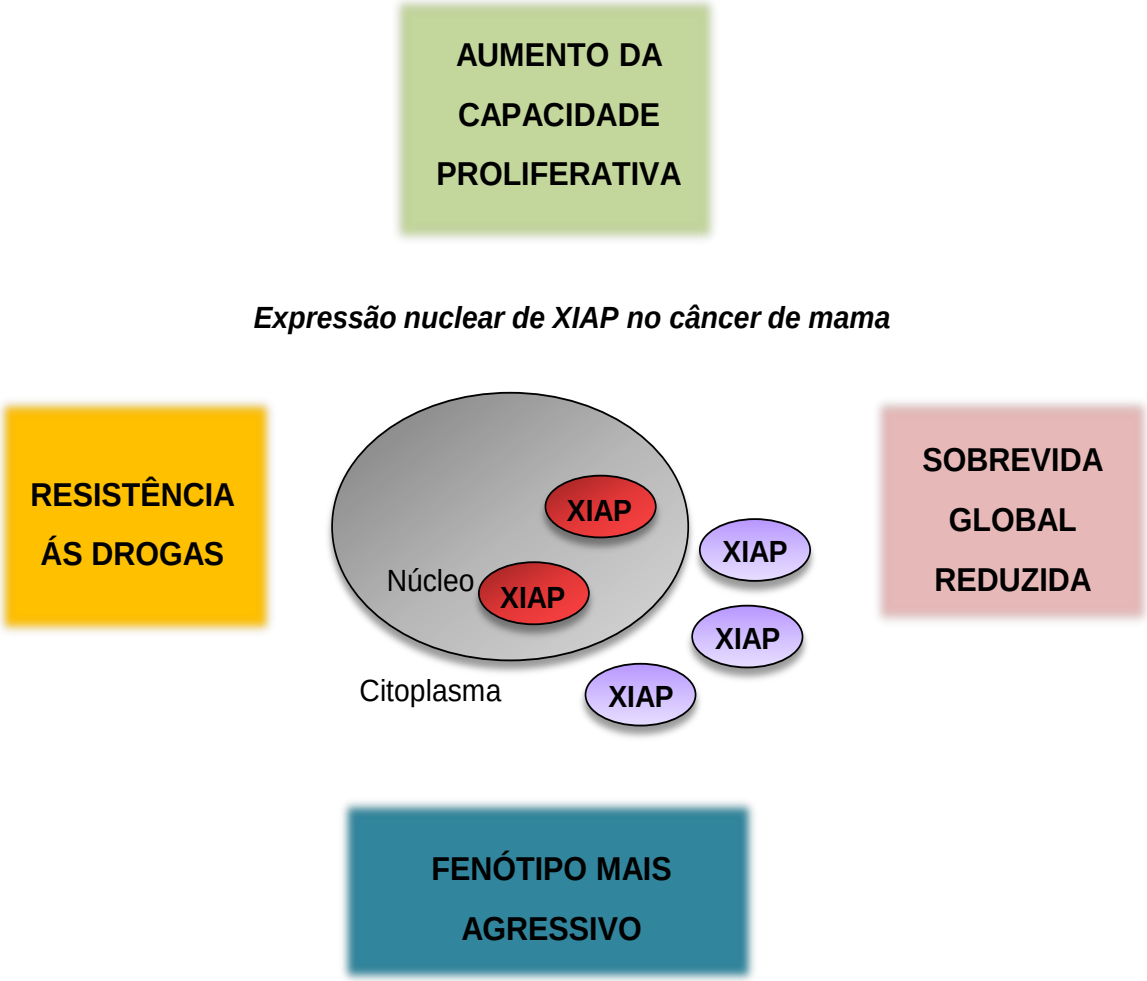


Figura 6.1: Figura esquemática da associação entre a localização nuclear de XIAP e um fenótipo mais agressivo no câncer de mama. A expressão de XIAP pode ser encontrada em diferentes compartimentos subcelulares em linhagens celulares e amostras de pacientes. A expressão de XIAP no núcleo está associada a um fenótipo de resistência às drogas e a um aumento da capacidade proliferativa *in vitro*. Adicionalmente, a presença de XIAP no núcleo confere um prognóstico desfavorável a pacientes com câncer de mama, apontando para um papel oncogênico da XIAP nessa neoplasia.

7. Conclusões

- A expressão de XIAP pode ser encontrada em diferentes compartimentos subcelulares, sendo mais detectada no núcleo nas células resistentes à dox e ao paclitaxel, sugerindo uma possível associação da presença nuclear de XIAP e a quimiorresistência independentemente do mecanismo de ação do quimioterápico;

- O tratamento com os quimioterápicos não modula a localização subcelular de XIAP, porém observa-se a indução da expressão da XIAP na fração citoplasmática em células quimiossensíveis;

- A superexpressão dos vetores $XIAP^{\Delta RING}$ e $XIAP^{NLS\ C\text{-}term}$ induz a expressão de XIAP no núcleo e contribui para o aumento da capacidade proliferativa de células de câncer de mama;

- A superexpressão da XIAP nuclear promove a resistência ao tratamento com a dox em células de câncer de mama;

- A expressão nuclear de XIAP está associada a uma sobrevida global reduzida em pacientes negativas para RH, enquanto as pacientes que apresentam XIAP citoplasmática possuem uma tendência de melhor prognóstico;

- A expressão nuclear e citoplasmática de XIAP foram associadas diferencialmente às características clinico-biológicas das pacientes com câncer de mama.

8. Perspectivas:

- Avaliar o efeito da indução da superexpressão de XIAP e seus mutantes na resistência a morte celular induzida pela dox através de ensaios de viabilidade celular de curta duração, como o ensaio de morte celular (Sub-G0) e modulação de caspases;

- Investigar os mecanismos envolvidos com o aumento da capacidade proliferativa de células superexpressando XIAP no núcleo, tais como as alterações no perfil de fases do ciclo celular e a indução da expressão de E2F1 e de ciclinas envolvidas na progressão do ciclo celular;

- Confirmar os dados de proliferação celular por ensaios mais específicos, como a coloração por cristal violeta e marcação com bromodeoxiuridina (BrdU);

- Analisar o papel da localização nuclear de XIAP na resistência à dox através da indução da superexpressão de XIAP nuclear em linhagens celulares de câncer de mama triplo negativas (em andamento);

- Confirmar os dados referentes à localização subcelular de XIAP por microscopia confocal;

- Sequenciar o gene da XIAP (*BIRC4*) nas linhagens celulares sensíveis e resistentes a drogas, a fim de avaliar possíveis mutações e diferenças entre as linhagens (em andamento);

- Investigar a localização subcelular de XIAP em outros modelos de células resistentes e parentais sensíveis a drogas;

- Validar os dados encontrados referentes ao papel da marcação de XIAP nuclear no prognóstico em uma coorte maior de pacientes com câncer de mama.

9. Referências

ABREU E & KOIFMAN S. **Fatores prognósticos no câncer da mama feminina.** Revista Brasileira de Cancerologia, 2002, 48(1): 113-31.

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

AIRD KM, GHANAYEM RB, PEPLINSKI S, *et al*. **X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits apoptosis in inflammatory breast cancer cells with acquired resistance to an ErbB1/2 tyrosine kinase inhibitor.** Mol Cancer Ther. 2010 May;9(5):1432-42.

AMANTANA A, LONDON CA, IVERSEN PL, *et al*. **X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells**. Mol Cancer Ther. 2004 Jun;3(6):699-707.

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

ATCHLEY D P, ALBARRACIN C T, LOPEZ A *et al.* **Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer.** J Clin Oncol, Sep 2008(26):4282-8.

BAULER L D, DUCKETT C S, O'RIORDAN D. **XIAP Regulates Cytosol-Specific Innate Immunity to Listeria Infection.** PLoS Pathogens, Aug 2008 4(8): 1 -12.

BUDHIDARMO R & DAY C L. **The ubiquitin-associated domain of cellular inhibitor of apoptosis proteins facilitates ubiquitylation.** J Biol Chem, Sep 289(37): 25721-36.

BUITRAGO F, UEMURA G, SENA M C F. **Fatores prognósticos em câncer de mama.** Com. Ciências Saúde, 2011 1:S69-S82.

BURSTEIN E, GANESH L, DICK R D *et al.* **A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1.** The EMBO Journal 2004 23: 244–254.

CAO Z, LI X, LI J, LUO W, *et al*. **X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) lacking RING domain localizes to the nuclear and promotes cancer cell anchorage-independent growth by targeting the E2F1/Cyclin E axis**. Oncotarget. 2014 Aug 30;5(16):7126-37.

CAO Z, ZHANG R, LI J, HUANG H *et al.* **X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Regulation of Cyclin D1 Protein Expression and Cancer Cell Anchoragein dependent growth via Its E3 Ligase-mediated Protein Phosphatase 2A/c-Jun Axis.** The Journal of Biological Chemistry, 2012, 288(28): 20238–20247

CHEUNG H H, PLENCHETTE S, KERN C J *et al.* **The RING Domain of cIAP1 Mediates the Degradation of RING-bearing Inhibitor of Apoptosis Proteins by Distinct Pathways**. Molecular Biology of the Cell, July 2008 19: 2729–2740.

CINGOLANI G, BEDNENKO J, GILLESPIE M T, *et al*. **Molecular Basis for the Recognition of a Nonclassical Nuclear Localization Signal by Importin β.** Molecular Cell, Dec 2002 10: 1345–1353.

CONTE D, LISTON P, WONG J W, *et al*. **Thymocyte-targeted overexpression of xiap transgene disrupts T lymphoid apoptosis and maturation.** PNAS, April 2001 98 (9) 5049–5054.

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

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

DAI X, LI Y, BAI Z, *et al*. **Molecular portraits revealing the heterogeneity of breast tumor subtypes defined using immunohistochemistry markers**. Nature Scientific Reports. 2015 Set 5:14499: 1-10.

DANG C V & LEE W M F. **Identification of the Human *c-myc* Protein Nuclear Translocation Signal.** Mollecular and Cellular Biology, Oct 1988 4048-4054.

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

FERNANDEZ S V, BINGHAM C, FITIPALDI P *et al.* ***TP53* mutations detected in circulating tumor cells present in the blood of metastatic triple negative breast cancer patients**. Breast Cancer Research 2014, 16:445.

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

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

FLANAGAN L, KEHOE J, FAY J *et al.* **High levels of X-linked Inhibitor-of-Apoptosis Protein (XIAP) are indicative of radio chemotherapy resistance in rectal cancer**. Radiat Oncol, Jun 2015 10: 131.

FONTES M R M, THE T, KOBE B. **Structural Basis of Recognition of Monopartite and Bipartite Nuclear Localization Sequences by Mammalian Importin-a.** J. Mol. Biol. 2000 (297) 1183-1194.

FORD D, EASTON D F, STRATTON A *et al.* **Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families**. The American Journal of Human Genetics, 1998 62(3):676-689.

FREITAS N & CUNHA C. **Mechanisms and signals for the Nuclear Importo f Proteins.** Current Genomics, 2009 (10) 550-557.

FU J, JIN Y, AREND L J. **Smac3, a Novel Smac/DIABLO Splicing Variant, Attenuates the Stability and Apoptosis-inhibiting Activity of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein.** The Journal of BiologicAL Chemistry, 2003, 278(52): 52660-52672.

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

FULDA, S. **Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in haematological malignancies: molecular mechanisms and therapeutic opportunities**. Leukemia (2014) 28, 1414–1422.

GAO Z, TIAN Y, WANG J *et al.* **A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo**. J Biol Chem, Oct 2007 282(42): 30718-27.

GARRISON J B, CORREA R G, GERLIC M *et al.* **ARTS and Siah Collaborate in a Pathway for XIAP Degradation.** Mol Cell. 2011 January 7; 41(1): 107–116.

GARTEL, A. L.; FELICIANO, C.; TYNER, A. L. **A new method for determining the status of p53 in tumor cell lines of different origin.** Oncol Res. 2003;13(6-10):405-8.

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

GYARD-HANSEN M, DARDING M, MIASARI M *et al.* **IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis**. Nat Cell Biol, 2008 10(11): 1309-17.

HANAHAN D. & WEINBERG R.A. **The hallmarks of cancer**. Cell. 2011 pp 646-672.

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

HIRAMATSU N, MESSAH C, HAN J *et al.* **Translational and posttranslational regulation of XIAP by eIF2α and ATF4 promotes ER stress–induced cell death during the unfolded protein response.** Molecular Biology of the Cell, 2014, (25): 1411-1420.

HODEL M R, CORBETT A H, HODEL A E. **Dissection of a Nuclear Localization Signal.** The Journal of Biological Chemistry, 2001 276(2) 1317- 1325.

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

HOLLIDAY, D., L. & SPEIRS V. **Choosing the right cell line for breast cancer research**. Breast Cancer Research 2011, 13:215.

HUANG C, ZENG X, JIANG G *et al*. **XIAP BIR domain suppresses miR-200a expression and subsequently promotes EGFR protein translation and anchorageindependent growth of bladder cancer cell.** Journal of Hematology & Oncology, 2017 10:6 7-13.

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

JAKEL S & GORLICH D. **Importin β, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells.** The EMBO Journal, 1998 17 (15): 4491–4502.

JIN HS, PARK HS, SHIN JH, *et al*. **A novel inhibitor of apoptosis protein (IAP)-interacting protein, Vestigial-like (Vgl)-4, counteracts apoptosis-inhibitory function of IAPs by nuclear sequestration**. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Sep 2;412(3):454-9.

JOVANOVIC J, RONNEBERG A, TOST J, *et al*. **The epigenetics of breast cancer.** Molecular Oncology 2010 Abril: 4: 242-254.

KAFFMAN A & O'SHEA E K. **Regulation of nuclear localization: A key to a door.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1999. 15:291–339.

KALDERON D, ROBERTS B L, RICHARDSON W D, *et al*. **A Short Amino Acid Sequence Able to Specify Nuclear Location.** Cell, Dec 1984 39:499-509.

KEIZER H G, PINEDO H M, SCHUURHUIS G J, *et al*. **Doxorrubicin (Adriamycin): A critical review of free raqdical-dependent mechanisms of citotoxicity.** Pharmac. Ther. 1990 47: 219-231.

KENICER J. SPEARS M. LYTTLE, N. *et al*. **Molecular characterisation of isogenic taxane resistant cell lines identify novel drivers of drug resistance.**. BMC Cancer 2014, 14:76.

KLEINBERG L, FLORENES VA, NESLAND JM, *et al*. **Survivin, a member of the inhibitors of apoptosis family, is down-regulated in breast carcinoma effusions**. Am J Clin Pathol. 2007 Sep;128(3):389-97.

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

KOCAB A J & DUCKETT C S. **Inhibitor of apoptosis proteins as intracellular signaling intermediates.** FEBS J, Jan 2016 283(2): 221-31.

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

LANGE A, MILLS R E, LANGE C J, *et al.* **Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin α**. Journal of Biological Chemistry, 2007 282(8): 5101-5105.

LANGLANDS F E, HORGAN K, DODWEL D D *et al.* **Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation.** Br J Radiol, Mar 2013 86(1023):20120601.

LEWIS J, BURSTEIN E, REFFEY S B *e al.* **Uncoupling of the Signaling and Caspase-inhibitory Properties of X-linked Inhibitor of Apoptosis.** The Journal of Biological Chemistry, 279(10): 9023–9029.

LI J, FENG Q, KIM JM, SCHNEIDERMAN D, *et al*. **Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins**. Endocrinology. 2001 Jan;142(1):370-80.

LISTON P, FONG WG, KELLY NL, *et al*. **Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity.** Nat Cell Biol. 2001 Feb;3(2):128-33.

LISTON P, ROY N, TAMAI K, *et al*. **Suppression** of **apoptosis** in **mammalian cells** by **NAIP** and a **related family** of **IAP genes**. Nature. 1996 Jan 25;379(6563):349-53.

LIU SS, TSANG BK, CHEUNG AN, *et al*. **Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma**. Eur. J Cancer 2001; 37: 1104-10.

LOIBL S & GIANNI L. **HER2-positive breast cancer.** Series: Breast cancer 2.Dec 2016.

LOPEZ J, JOHN S W, TENEV T *et al.* **CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration**. Mol Cell, Jun 2011 42(5):569-83.

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

LU, M. LIN, S. C. HUANG, Y. *et al.* **XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization**. Mol Cell 2007 26:689-702.

LUQUE-CABAL M, GARCIA TEIJIDO P, FERNANDEZ-PEREZ Y *et al.* **Mechanisms Behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It.** Clin Med Insights Oncol, 2016 10:21-30.

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

MAINE G N, MAO X, KOMARCH C M, *et al*. **COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase**. The EMBO Journal, 2007 26: 436–447.

MAINE G N, MAO X, MULLER P A, *et al.* **COMMD1 expression is controlled by critical residues that determine XIAP binding.** Biochem. J. 2009 417, 601–609.

MALHOTRA G K, ZHAO X, BAND H *et al,* **Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers.** Cancer Biology & Therapy, 2014 10(10): 955-960.

McELENY K R, WATSON W G, COFFEY R N T *et al.* **Inhibitors of Apoptosis Proteins in Prostate Cancer Cell Lines.** The Prostate, 2002 51:133-140.

McGROGAN B T, GILMARTIN B, CARNEY D N, *et al***. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer**. Biochim Biophys Acta. 2008, 1785(2): 96-132.

McILWAIN D R, BERGER T, MAK TW. **Caspase functions in cell death and disease.** Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013 5(4):008656.

MEDINA P J & GOODIN S. **Lapatinib: A Dual Inhibitor of Human Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases.** Clinical Therapeutics, 2008 30(8): 1427-1447.

MEHROTRA, S. LANGUINO, L. R. RASKETT C. M. *et al*. **IAP regulation of metastasis**. Cancer Cell. 2010 19; 17(1): 53.

MILLER T W, PEREZ-TORREZ M, NARASANNA A *et al.* **Loss of Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10 engages ErbB3 and insulin-like growth factor-I receptor signaling to promote antiestrogen resistance in breast cancer**. Cancer Res, May 2009 69(10)4192-201.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro**, INCA, 2016.

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

MIYAMOTO M, TAKANO M, IWAYA I *et al.* **X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis as a key factor for chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary.** British Journal of Cancer 2014 110, 2881–2886.

MORIZANE Y, HONDA R, FUKAMI K *et al.* **X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO.** J Biochem, 2005 137(2): 125-32.

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

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

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

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

NESTAL DE MORAES G, BELLA L, ZONA S, *et al*. **Insights into a Critical Role of the FOXO3a-FOXM1 Axis in DNA Damage Response and Genotoxic Drug Resistance**. Curr Drug Targets. 2016, 17(2):164-77.

NESTAL DE MORAES G, DELBUE D, SILVA K L *et al.* **FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance.** Cellular Signalling, 2015 27: 2496–2505.

NESTAL DE MORAES, G. VASCONCELOS, F. DELBUE, D.; *et al*. **Doxorubicin induces cell death in breast cancer cells regardless of Survivin and XIAP expression levels**. European Journal of Cell Biology 2013 (92): 247– 256.

NOWAK D, BOEHRER S, BRIEGER A, *et al*. **Upon drug-induced apoptosis in lymphoma cells X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) translocates from the cytosol to the nucleus.** Leuk Lymphoma. 2004 Jul;45(7):1429-36.

OBEROI-KHANUJA T K, MURALI A, RAJALINGAM K. **IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration**. Cell Death Dis, Sep 2013 4:784.

OBEXER, P. & AUSSERLECHNER M. J. **X-linked inhibitor of apoptosis protein – a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy.** www.frontiersin.org. July 2014 Volume 4 Article 197.

ONITILO A A, ENGEL J M, GREENLEE R T *et al.* **Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival**. Clin Med Res, Jun 2009 7(1-2)4-13.

PANDEY M, JHA K, KUMAR M, *et al*. **Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) correlates with the lymph node and receptor status in breast cancer and reduces survival.** Surgical Oncology International. Sep 2016.

PARTON M, KRAJEWSKI S, SMITH I, *et al.* **Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy**. Clin Cancer Res. 2002 Jul;8(7):2100-8.

RAKHA E A & GREEN A R. **Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know**. Pathology, Feb 2017.49(2):111-119.

RAMP U, KRIEG T, CALISKAN E *et al.* **XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas.** Human Pathology, 2004 35(8):.1022-1028.

ROBBINS J, DILWORTH S M, LASKEY R A, *et al* **.Two Interdependent Basic Domains in Nucleoplasmin Nuclear Targeting Sequence: Identification of a Class of Bipartite Nuclear Targeting Sequence.** Cell, Feb 1991 64:615-623.

RUSSELL JC, WHITING H, SZUFLITA N, *et al*. **Nuclear translocation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) determines cell fate after hypoxia ischemia in neonatal brain**. J Neurochem. 2008 Aug;106(3):1357-70.

SABA R, ALSAYD A, ZACNY J P *et al.* **The Role of Forkhead Box Protein M1 in Breast Cancer Progression and Resistance to Therapy**. Int J Breast Cancer, 2016:9768183.

SANNA M G, CORREIA JDS, DUCREY O *et al.* **IAP Suppression of Apoptosis Involves Distinct Mechanisms: the TAK1/JNK1 Signaling Cascade and Caspase Inhibition**. Molecular and Cellular Biology, 2002 22(6): 1754-1766.

SCHILE A J, GARCÍA-FERNÁNDEZ M, STELLER H. **Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity.** Genes & Development, 2008, 22:2256-2266.

SCHMIDT, M. **Chemotherapy in Early Breast Cancer: When, How and Which one?** Breast Care 2014;9:154–160.

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

SEEGER J M, BRINKIMANN K, YAZDANPANAH B *et al.* **Elevated XIAP expression alone does not confer chemoresistance.** British Journal of Cancer (2010) 102, 1717 – 1723

SEONG Y M, CHOI J Y, PARK H J *et al.* **Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP**. J Biol Chem, Sep 2004 279(36):.37588-96.

SHALLI K, BROWN I,HEYS S D, SCHOFIELD A C. **Alterations of β-tubulina isotypes in breast cancer cells**. The FASEB Journal. 2005 Jun 9; 1-15.

SHAMAS-DIN A, KALE J, LEBER B *et al.* **Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins**. Cold Spring Harb Perspect Biol, April 2013 5(4):008714.

SHRIKHANDE SV, KLEEF J, KAYED H, *et al*. **Silencing of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) decreases gemcitabine resistance of pancreatic cancer cells.** Anticancer Res. 2006 Sep-Oct;26(5A):3265-73.

SIEGELIN M, TOUZANI O, TOUTAIN J, *et al*. **Induction and redistribution of XAF1, a new antagonist of XIAP in the rat brain after transient focal ischemia**. Neurobiol Dis. 2005 Nov;20(2):509-18.

SILVA K L, VASCONCELLOS FC, CASTRO ED, *et al*. **Apoptotic effect of fludarabine is independent of expression of IAPs in B-cell chronic lymphocytic leukemia**. Apoptosis. 2006 Feb;11(2):277-85.

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

SMITH K L & ISAACS C. **BRCA mutation testing in determining breast cancer therapy**. Cancer J, Nov-Dec 2011 17(6):492-9.

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

TACAR O, SRIOMORNSAK P, DASS C R. **Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems**. Pharm Pharmacol, 2013 65(2): 157-70.

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

TANG Y, WANG Y, KIANI M F *et al.* **Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer.** Clin Breast Cancer, Oct 2016 16(5):335-343.

THORN C F, OSHIRO C, MARSH S *et al.* **Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects.** Pharmacogenet Genomics, 2011 21 (7) 440-446.

TSE M K, HUI S K, YANG Y *et al.* **Structural analysis of the UBA domain of X-linked inhibitor of apoptosis protein reveals different surfaces for ubiquitin-binding and self-association.** PLoS One, 2011 6(12):28511.

VICTORIA-ACOSTA G, VAZQUEZ-SANTILLAN, JIMENEZ-HERNANDEZ L *et al.* **Epigenetic silencing of the XAF1 gene is mediated by the loss of CTCF binding.** Nature Scientific Reports, 2015 (5): 1-14.

VISCHIONI B. VAN DER VALK P. INGA, S. W. S. *et al*. **Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues**. Human Pathology (2006) 37, 78 – 86.

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

WRIGHT C W & DUCKETT C S. **Reawakening the cellular death program in neoplasias through the therapeuics blockade of IAP function.** J Clin Invest. 2005;115(10):2673-2678.

XU Y, LIU Q, D J *et al.* **Tissue microarray analysis of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) expression in breast cancer patients.** Med Oncol 2014 31:764.

YANG Y, FANG S, JENSEN J P, *et al*. **Ubiquitin Protein Ligase Activity of lAPs and Their Degradation in Proteasomes in Response to Apoptotic Stimuli**. May 2000, 288: 874-876.

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

ANEXO I

Trabalho científico publicado relacionado à dissertação de mestrado:

NESTAL DE MORAES G, DELBUE D, SILVA K L *et al.* **FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance.** Cellular Signalling, 2015 27: 2496–2505.

Cell Signal. 2015 Dec;27(12):2496-505. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.09.013. Epub 2015 Sep 25.

FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance.

Nestal de Moraes G[1], Delbue D[2], Silva KL[3], Robaina MC[2], Khongkow P[4], Gomes AR[4], Zona S[4], Crocamo S[5], Mencalha AL[6], Magalhães LM[7], Lam EW[4], Maia RC[8].

Author information

Abstract

Drug resistance is a major hurdle for successful treatment of breast cancer, the leading cause of deaths in women throughout the world. The FOXM1 transcription factor is a potent oncogene that transcriptionally regulates a wide range of target genes involved in DNA repair, metastasis, cell invasion, and migration. However, little is known about the role of FOXM1 in cell survival and the gene targets involved. Here, we show that FOXM1-overexpressing breast cancer cells display an apoptosis-resistant phenotype, which associates with the upregulation of expression of XIAP and Survivin antiapoptotic genes. Conversely, FOXM1 knockdown results in XIAP and Survivin downregulation as well as decreased binding of FOXM1 to the promoter regions of XIAP and Survivin. Consistently, FOXM1, XIAP, and Survivin expression levels were higher in taxane and anthracycline-resistant cell lines when compared to their sensitive counterparts and could not be downregulated in response to drug treatment. In agreement with our in vitro findings, we found that FOXM1 expression is significantly associated with Survivin and XIAP expression in samples from patients with IIIa stage breast invasive ductal carcinoma. Importantly, patients co-expressing FOXM1, Survivin, and nuclear XIAP had significantly worst overall survival, further confirming the physiological relevance of the regulation of Survivin and XIAP by FOXM1. Together, these findings suggest that the overexpression of FOXM1, XIAP, and Survivin contributes to the development of drug-resistance and is associated with poor clinical outcome in breast cancer patients.

Copyright © 2015. Published by Elsevier Inc.

ANEXO II

Trabalho científico publicado não relacionado à dissertação de mestrado:

LEMOS L G, NESTAL DE MORAES, DELBUE D *et al.* **11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpan, LQB-223, a novel compound with potent antineoplastic activity toward breast cancer cells with different phenotypes.** J Cancer Res Clin Oncol 2016 142(10): 2219-30

J Cancer Res Clin Oncol. 2016 Oct;142(10):2119-30. doi: 10.1007/s00432-016-2212-6. Epub 2016 Aug 12.

11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpan, LQB-223, a novel compound with potent antineoplastic activity toward breast cancer cells with different phenotypes.

Lemos LG[1,2], Nestal de Moraes G[1], Delbue D[1,2], Vasconcelos Fda C[1], Bernardo PS[1,2], Lam EW[3], Buarque CD[4], Costa PR[5], Maia RC[6].

Author information

Abstract

Multidrug resistance is the major obstacle for successful treatment of breast cancer, prompting the investigation of novel anticancer compounds.

PURPOSE: In this study, we tested whether LQB-223, an 11a-N-Tosyl-5-deoxi-pterocarpan newly synthesized compound, could be effective toward breast cancer cells.

METHODS: Human breast cell lines MCF-7, MDA-MB-231, HB4a and MCF-7 Dox(R) were used as models for this study. Cell culture, MTT and clonogenic assay, flow cytometry and Western blotting were performed.

RESULTS: The LQB-223 decreased cell viability, inhibited colony formation and induced an expressive G2/M arrest in breast cancer cells. There was an induction in p53 and p21(Cip1) protein levels following treatment of wild-type p53 MCF-7 cells, which was not observed in the mutant p53 MDA-MB-231 cell line, providing evidence that the compound might act to modulate the cell cycle regardless of p53 status. In addition, LQB-223 resulted in decreased procaspase levels and increased annexin V staining, suggesting that the apoptotic cascade is also triggered. Importantly, LQB-223 treatment was shown to be less cytotoxic to non-neoplastic breast cells than docetaxel and doxorubicin. Strikingly, exposure of doxorubicin-resistant MCF-7-Dox(R) cells to LQB-223 resulted in suppression of cell viability and proliferation in levels comparable to MCF-7. Of note, MCF-7-Dox(R) cells have an elevated expression of the P-glycoprotein efflux pump when compared to MCF-7.

CONCLUSION: Together, these results show that LQB-223 mediates cytotoxic effects in sensitive and resistant breast cancer cells, while presenting low toxicity to non-neoplastic cells. The new compound might represent a potential strategy to induce toxicity in breast cancer cells, especially chemoresistant cells.

NESTAL DE MORAES G, KHONGKOW P, GONG C, *et al.* **Forkhead box K2 modulates epirubicin and paclitaxel sensitivity through FOXO3a in breast cancer.** Oncogenesis, 2015 4:1-12

Oncogenesis. 2015 Sep 7;4:e167. doi: 10.1038/oncsis.2015.26.

Forkhead box K2 modulates epirubicin and paclitaxel sensitivity through FOXO3a in breast cancer.

Nestal de Moraes G[1,2], Khongkow P[1], Gong C[1,3], Yao S[1], Gomes AR[1], Ji Z[4], Kandola N[1], Delbue D[1,2], Man EP[3], Khoo US[3], Sharrocks AD[4], Lam EW[1].

Author information

Abstract

The forkhead transcription factor FOXK2 has recently been implicated in cancer cell proliferation and survival, but a role in cancer chemotherapeutic drug resistance has hitherto not been explored. Here we demonstrate that FOXK2 has a central role in mediating the cytotoxic drug response in breast cancer. Clonogenic and cell viability assays showed that enhanced FOXK2 expression sensitizes MCF-7 breast cancer cells to paclitaxel or epirubicin treatment, whereas FOXK2 depletion by small interfering RNAs (siRNAs) confers drug resistance. Our data also showed that the activation of the tumour suppressor FOXO3a by paclitaxel and epirubicin is mediated through the induction of FOXK2, as depletion of FOXK2 by siRNA limits the induction of FOXO3a by these drugs in MCF-7 cells. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis showed that in response to drug treatment, FOXK2 accumulates and binds to the proximal FOXO3a promoter region in MCF-7 cells. Furthermore, we also uncovered that FOXK2 is deregulated and, therefore, can express at high levels in the nucleus of both the paclitaxel and epirubicin drug-resistant MCF-7 cells. Our results showed that ectopically overexpressed FOXK2 accumulates in the nuclei of drug-resistant MCF-7 cells but failed to be recruited to target genes, including FOXO3a. Crucially, we found that FOXO3a is required for the anti-proliferative and epirubicin-induced cytotoxic function of FOXK2 in MCF-7 cells by sulphorhodamine and clonogenic assays. The physiological importance of the regulation of FOXO3a by FOXK2 is further confirmed by the significant correlations between FOXO3a and FOXK2 expression in breast carcinoma patient samples. Further survival analysis also reveals that high nuclear FOXK2 expression significantly associates with poorer clinical outcome, particularly in patients who have received conventional chemotherapy, consistent with our finding that FOXK2 is deregulated in drug-resistant cells. In summary, our results suggest that paclitaxel and epirubicin target the FOXK2 to modulate their cytotoxicity and deregulated FOXK2 confers drug resistance.