FERNANDA DE OLIVEIRA SERACHI

ANÁLISE DO EFEITO DAS CICLOOXIGENASES NA EXPRESSÃO E
ATIVIDADE DE PROTEÍNAS DE RESISTENCIA A MÚLTIPLAS DROGAS
(MDR E MRPs) EM GLIOMA HUMANO

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

São Paulo
2012

FERNANDA DE OLIVEIRA SERACHI

ANÁLISE DO EFEITO DAS CICLOOXIGENASES NA EXPRESSÃO E
ATIVIDADE DE PROTEÍNAS DE RESISTENCIA A MÚLTIPLAS DROGAS
(MDR E MRPs) EM GLIOMA HUMANO

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia
Celular e Tecidual.

Orientador: Profa. Dra. Alison
Colquhoun

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Serachi, Fernanda de Oliveira.

Análise do efeito das ciclooxigenases na expressão e atividade de proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR e MRPs) em glioma humano / Fernanda de Oliveira Serachi. – São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Alison Colquhoun.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Análise da via dos eicosanoides no metabolismo da célula tumoral.

Versão do título para o inglês: Analysis of the effect of cyclooxygenase on the expression and activity of multiple drug resistance proteins (MDRP) in human glioma.

1. Pg-P 2. MDR 3. Glioma 4. Ciclooxigenase 5. Câncer 6. MRPs
I. Colquhoun, Prof. Dr. Alison II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0198/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernanda de Oliveira Serachi.

Título da Dissertação: Análise do efeito das ciclooxigenases na expressão e
 atividade de proteínas de resistência a múltiplas drogas
 (MDR e MRPs) em glioma humano.

Orientador(a): Prof. Dr. Alison Colquhoun.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2413 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8488
e-mail: cep@icb.usp.br

Comitê de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 424/10 referente ao projeto intitulado: *"Análise do efeito das ciclooxigenases na expressão e atividade das proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDRs e MRPs) em glioma humano"* sob a responsabilidade de Fernanda de Oliveira Serachi, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 25 de outubro de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

“Peça a Deus que abençoe os seus planos e eles darão certo”
Pv. 16:3

Dedico este trabalho aos meus pais, que estiveram sempre ao meu lado, nos momentos bons ou ruins, me incentivando com seu carinho e amor incondicional. Aos meus familiares e amigos pela torcida. Sem vocês meu sonho não seria possível.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Eu poderia passar horas agradecendo uma pessoa mais que especial, que não só colaborou com este trabalho, mas fez com que tudo isso se tornasse possível, serei eternamente grata a minha orientadora Profa. Alison Colquhoun, por ter sido muito mais que uma professora, ou orientadora profissional, mas por ter compartilhado comigo tantos anos de trabalho, alegrias, conquistas e realizações profissionais e pessoais. Por ter me aceitado e mais do que isso ter acreditado que eu seria capaz, mesmo quando eu mesma era capaz de duvidar. Agradeço sua paciência (muita!), amizade, conselhos, conversas e por tudo isso te admiro demais. Meu muito Obrigada Chefa, por tudo!! Um agradecimento também muito especial Professor Bauer (Tio Bauer) pelas conversas, conselhos, sempre amoroso e solicito a nos ajudar!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me manter firme, disposta, saudável e motivada mesmo diante das dificuldades que encontrei no meio do caminho.

Agradeço meus amigos de laboratório: Marcel, Juliano, Andrew, Felipe, Pollyana, Fabio, Tati, Matthew e Mercedes, por fazerem parte da minha vida diária, dividir comigo momentos bons e ruins, muitas alegrias e conversas, sempre dispostos a ajudar. Agradeço especialmente a minha amiga e irmã Renata Gomes, por ter me ajudado em tantos momentos, na vida profissional ou pessoal. Com esses amigos passei bons anos da minha vida e sinceramente espero que a nossa amizade perdure! A todos meu muito obrigada!

Agradeço a minha técnica de laboratório e amiga Marley, por estar sempre nos ajudando e por ser a pessoa especial e única que ela é. E a técnica Emilia por estar sempre presente no nosso dia a dia.

Ao Professor Emer Suavinho Ferro, pela oportunidade de participar do PAE, pela grande amizade, tornando o trabalho mais leve e mais agradável. Professor, obrigada por tudo!!

A todos os Professores do Departamento de Biologia Celular e Tecidual, pela participação na minha formação como pesquisadora.

As meninas da secretária, sempre solícitas e dispostas a ajudar, Celi, Regina, Ana e Elo.

As meninas da biblioteca pela ajuda indispensável.

Aos meus familiares que torceram por mim e acreditaram que tudo isso seria possível, aos meus avós Vicentina e Paulo, a minha avó Lourdes (in memoriam), minhas tias Sonia, Ivete e Selma, a vocês minha gratidão pelo apoio, torcida e amor.

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo torcendo e me incentivando, pessoas que são muito especiais para mim: Luanda, Alcione, Thiago e tantos outros que seria difícil citar todos.

Enfim todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta com o desenvolvimento deste trabalho, e mais do que isso fizeram parte da minha história. A todos vocês meu muito obrigada!!!

RESUMO

Serachi FO. Análise do efeito das ciclooxygenases na expressão e atividade de proteínas de resistência a múltiplas drogas em glioma humano. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

O glioblastoma multiforme, tumor de alta malignidade é conhecido por ser um câncer de difícil cura devido sua resistência ao tratamento de quimioterapia. Neste contexto sabe-se a existência de um gene responsável pelo fenótipo de resistência (MDR) e produção de proteínas associadas à resistência a uma grande variedade de drogas (MRPs). As proteínas de resistência a múltiplas drogas funcionam como bombas de efluxo, capazes de retirar das células compostos citotóxicos, deixando o tratamento quimioterápico sem o efeito esperado. Atualmente a suposta relação entre as ciclooxygenases e as proteínas de resistência a múltiplas drogas tem sido estudada em alguns tipos de câncer e na maioria deles observa-se uma relação positiva no sentido da COX poder participar da super-expressão de proteínas de resistência, fazendo com que as células fiquem ainda mais resistentes ao tratamento. O objetivo do projeto é analisar o possível efeito das COX 1 e 2 na expressão e atividade de MDRs e MRPs.

Palavras-chave: COXs. Pg-P. MDR. MRPs. Glioblastoma. Câncer.

ABSTRACT

Serachi OF. Analysis of the effect of cyclooxygenase on the expression and activity of Multiple Drug Resistance Proteins (MDRP) in human glioma. [Masters thesis (Cell and Developmental Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Introduction: Glioblastoma multiforme, a highly malignant tumor is difficult to cure because of its resistance to chemotherapy treatment. It is well known that the mechanism that leads to multidrug resistance (MDR) involves the increased expression of members of the ATP binding cassette (ABC) transporter superfamily, many of which transport chemotherapeutic compounds from cells. Multidrug resistance proteins can act as efflux pumps allowing the cells to eliminate cytotoxic compounds and therefore reducing the effects of the chemotherapy treatment. The possible relationship between cyclooxygenase and MDRPs has been studied in several cancers and in most cases, there is a positive relationship between them. The role of cyclooxygenases (COX) has been extensively studied, especially COX-2, which is expressed in many human cancers. Recently, studies have been conducted to identify whether the presence of COXs has some involvement over the expression of MDRPs. A positive correlation between COXs and MDRPs has been identified in certain cancers. This work aims to evaluate the possible relationship between COX1 and 2 and the expression and activity of MDRs and MRPs in gliomas.

Key words: MDR. MRPs. P-gp. Cyclooxygenase. COX-1. COX-2. Glioblastoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Mecanismo de ação de proteínas de resistência a múltiplas drogas	24
Figura 2- Possível modelo da relação entre ciclooxygenases e proteínas de resistência a múltiplas drogas.....	28
Figura 3- Expressão de RNAm de COX-1 (A) e COX-2 (B) em várias linhagens de glioma humano.....	39
Figura 4- Expressão de RNAm de Proteínas de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR1 e MRPs 1-6) nas linhagens U138MG (A) e 251MG(B).....	40
Figura 5- Curva de crescimento da linhagem U138MG.....	41
Figura 6- Curva de crescimento da linhagem U251MG.....	41
Figura 7- Curva de concentração de inibidor de COX-2 (NS-398) na linhagem U138MG	43
Figura 8- Curva de concentração de inibidor de COX-2 (NS-398) na linhagem U251MG.....	44
Figura 9- Curva de concentração de inibidor de COX-1 (SC-560) na linhagem U138MG.....	45
Figura 10- Curva de concentração de inibidor de COX-1 (SC-560) na linhagem U251MG.....	46
Figura 11- Curva de dose resposta de vincristina.....	48
Figura 12- Curva de dose resposta de vincristina.....	49
Figura 13- Padronização de concentração para futura análise no fluorímetro.....	50
Figura 14- Teste de temperatura MRP3 – U251MG.....	52
Figura 15 - Teste de ciclo MRP1 – U138MG.....	53
Figura 16 - Teste de ciclo MRP1 – U138MG.....	53
Figura 16- Curva padrão de diferentes concentrações de cDNA em duplicata	52
Figura 17- Curva padrão de diferentes concentrações de cDNA em duplicata gene usado como controle interno, linhagem U251MG.....	55
Figura 18- Corrida em gel de agarose do experimento acima. Gene controle 18S, linhagem U251.....	56
Figura 19- Curva de dissociação do primer.....	56
Figura 20- PCR convencional – inibidor de COX 1 – U138MG.....	59
Figura 21- PCR convencional - inibidor de COX 1 - U251MG.....	60
Figura 22- PCR convencional - inibidor de COX-2.....	61

Figura 23- PCR convencional - inibidor de COX 2 – U251MG.....	62
Figura 24- PCR Real-time -U138MG – SC-560 (inibidor de COX-1).....	64
Figura 25- PCR Real-time –U251MG – SC-560 (inibidor de COX-1).....	64
Figura 26- PCR Real-time - U251MG – NS-398 (inibidor de COX-2).....	65
Figura 27- Ensaio de Atividade com Rodamina	66
Figura 28- Ensaio de Atividade CFDA (MRP1).....	69
Figura 29- Imunofluorescência – Ciclooxygenases	71
Figura 30- Western Blot - Ciclooxygenases.....	72
Figura 31- Western Blot - U138MG – SC 560 (inibidor de Cox-1).....	73
Figura 32- Western Blot - U251MG – SC 560 (inibidor de Cox-1)).....	73
Figura 33- Western Blot – U138MG – NS 398 (inibidor de Cox-2).....	74
Figura 34- Western Blot – U251MG – NS 398 (inibidor de Cox-2).....	74
Figura 35- Ensaio de Resistência – Vincristina.....	78
Figura 36- Esquema dos resultados.....	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Sequência dos primers utilizados para quantificação da expressão gênica – PCR Convencional	34
Quadro 2- Sequência dos primers utilizados para quantificação da expressão gênica em real time	35
Quadro 3- Temperaturas escolhidas para anelamento dos primers – PCR Convencional	52
Quadro 4- Padronização das concentrações dos primers para PCR-Tempo Real.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo dos resultados com inibidor de COX-1, linhagem U138MG.....	75
Tabela 2- Resumo dos resultados com inibidor de COX-1, linhagem U251MG.....	75
Tabela 3- Resumo dos resultados com inibidor de COX-2, linhagem U138MG.....	76
Tabela 4- Resumo dos resultados com inibidor de COX-2, linhagem U251MG.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido araquidônico

AINEs – Antiinflamatórios não esteroidais

AS – Antisense (*primer*)

Bad – Proteína antagonista da Bcl-2 (proteína pró-apoptótica)

Bcl-2 – Célula de linfoma – 2 (proteína anti-apoptótica)

°C – Graus Celsius

cDNA – DNA complementar

cm - centímetros

CO₂- Gás carbônico

COX- Ciclooxygenase

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DEPC – Dietilpirocarbonato

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxibonucléico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

GAPDH -Gliceraldeído fosfato desidrogenase

GBM – Glioblastoma Multiforme

INCA – Instituto Nacional do Câncer

KDa – Kilodalton (unidade de medida do peso molecular das proteínas)

M – Molar

mM – Milimolar

mRNA – RNA mensageiro

μM – Micromolar

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de bases (produto da amplificação do PCR)

PBS – Tampão Salino Fosfato

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PGs – Prostaglandinas

PGE2 – Prostaglandina E2

PGG2 – Prostaglandina G2

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por Minuto

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa

SFB – Soro fetal bovino

TBS - Tampão tris salino.

Pg-P - Glicoproteína - P

MRP - Proteína associadas a resistência a múltiplas drogas

MDR - Resistência a Múltiplas drogas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 ABC Transportadores	21
1.2 Proteínas de Resistência a Múltiplas Drogas	23
1.3 Glioma x Resistência a múltiplas drogas	24
1.4 Ciclooxygenases.....	25
1.5 Possível relação entre Ciclooxygenase e MDRPs.....	26
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivos gerais.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Cultura de células.....	30
3.2 Curva de crescimento	30
3.3 Curva de dose.....	30
3.4 Inibidores de atividade de Ciclooxygenases.....	31
3.5 Extração do RNA total.....	31
3.6 Preparação do DNA complementar.....	32
3.7 PCR Convencional	32
3.8 PCR semiquantitativo – Primers	33
3.9 PCR -Tempo Real	34
3.10 Padronização da concentração de primer para PCR-Tempo Real.....	35
3.11 Ensaio de Atividade	36
3.12 Ensaio de Resistência – Vincristina	36
3.13 Western Blot	37
3.14 Análise dos Dados	38
3.15 Padronização dos experimentos	38
<i>3.15.1 Escolha das linhagens celulares.....</i>	<i>38</i>
<i>3.15.2 Expressão de MDRPs nas linhagens escolhidas.....</i>	<i>39</i>
3.16 Curva de Crescimento.....	40
3.17 Curva de dose do inibidores específicos COX-1 (SC-560) e COX-2 (NS-398).....	42
3.18 Tratamento com os inibidores de COX-1 (SC-560) e COX-2 (NS-398).....	47
3.19 Curva de dose - ensaio de Resistência – Vincristina.....	48
3.20 Ensaio de Atividade – Rodamina e CFDA	50
3.21 Padronização dos primers.....	51
<i>3.21.1 Padronização dos primers para PCR convencional.....</i>	<i>51</i>
3.22 Teste de ciclo.....	52
3.23 Padronização dos primers para PCR Tempo real.....	54

3.24 Imunofluorescência de Cxcs.....	57
4. RESULTADOS.....	58
4.1 PCR – Convencional.....	58
4.2 PCR REAL-TIME.....	63
4.3 Ensaio de atividade com Rodamina.....	66
4.4 Ensaio de atividade com CFDA.....	69
4.5 Imunofluorescência – Ciclooxigenases.....	71
4.6 Western Blot.....	72
4.7 Resumo dos Resultados.....	75
4.8 Ensaio de Resistencia – Vincristina.....	77
5 DISCUSSÃO.....	82
6 CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

O tecido nervoso é composto basicamente por dois tipos celulares, os neurônios, que conduzem o impulso nervoso através da despolarização da membrana plasmática, e a neuroglia (glia) que representa 90% das células cerebrais em humanos. (Bloom, Fawcett, 1994)

Durante um longo período acreditou-se que a glia (do grego “cola”) possuía a única função de sustentar os neurônios, hoje porém sabemos que as células da glia possuem funções extremamente importantes para o sistema nervoso central. A glia é composta por quatro tipos celulares distintos denominados: astrócitos (50%), oligodendrócitos (40%), células ependimárias (5%) e microglia (5%), desempenhando diferentes funções essenciais para o devido funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC), como: suporte estrutural, homeostasia do microambiente, nutrição dos neurônios, formação da bainha de mielina entre outras (Noctor et al., 2001).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças conhecidas atualmente, que têm em comum o crescimento desordenado das células, que invadem os tecidos e órgãos do organismo, podendo espalhar-se para outras regiões através do processo de metástase (Robbins, 1999). O câncer resulta do acúmulo de mutações genéticas e epigenéticas na célula de origem. Esses desequilíbrios podem ser causados por agentes tóxicos ambientais, que após sucessivas mutações se torna autônoma, sendo capaz de proliferar e migrar, formando o tecido tumoral (Stratton et al., 2009).

Os gliomas compreendem um grupo de tumores originados a partir das células da glia, são os tumores primários mais comuns do SNC representando 50 a 60% dos casos (Schwartzbaum et al., 2006). Esses tumores são caracterizados pelo rápido crescimento e pela invasão do parênquima cerebral e chamam a atenção por apresentarem um dos piores prognósticos, com uma sobrevida média de 12 meses (Kondo et al., 2004; Wong et al., 2007). Os sintomas clínicos mais comuns dos gliomas são cefaleia, náuseas, vômitos, resultante do aumento da pressão intracranial podendo os pacientes apresentar convulsões. Além disso podem apresentar distúrbios neurológicos como: perda sensorial ou motora, problemas de memória e disfunções mentais (Behin et al., 2003).

Esses tumores são classificados de acordo com sua morfologia e características clínicas em astrocitomas, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas, sendo os astrocitomas os mais frequentes.

A organização mundial de saúde (WHO - World Health Organization) classifica os astrocitomas de acordo com critérios histopatológicos, em ordem crescente de anaplasia em 4 graus de malignidade: astrocitomas pilocíticos (grau I), astrocitomas difusos (grau II), astrocitomas anaplásicos (grau III) e glioblastomas multiforme (grau IV) (Louis et al., 2007).

Glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor mais devastador e frequente em adultos, entre os gliomas astrocíticos. Esse tipo de tumor tem como características macroscópicas regiões de necrose e hemorragia. Microscopicamente apresentam pleomorfismo nuclear e celular e proliferação microvascular. Geneticamente, apresentam amplificações, mutações pontuais e deleção no cromossomo 10q (Holland, 2000; Minniti et al., 2009; Ohgaki, 2005).

Glioma é o termo utilizado para designar tumores (neoplasias) originários das células da glia. O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor astrocítico com maior grau de malignidade, correspondendo ao grau IV da atual classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS). Caracteriza-se pela presença de astrócitos neoplásicos pobremente diferenciados com áreas de proliferação vascular e/ou necrose (Alexandru et al., 2010).

O GBM é o tumor de ocorrência freqüente, constituindo cerca de 50-60% de todos os gliomas e representam de 12-15% dos tumores intracranianos em adultos. Têm maior incidência em homens em relação às mulheres numa proporção de 3:2, principalmente na faixa entre 45 e 70 anos. A região supratentorial é a mais acometida, tendo prevalência pelo hemisfério esquerdo, principalmente nos lobos frontal e temporal, podendo ainda acometer mais de um hemisfério cerebral. A história clínica da doença é geralmente curta, menos de 3 meses, em mais de 50% dos casos (Zhou, 2010).

Existem porém 2 subtipos de glioblastoma multiforme, os GBMs primários e os secundários, que geralmente afetam pacientes de diferentes faixas etárias e se diferenciam e se desenvolvem por diferentes mecanismos. O GBM primário representa quase 90% dos casos, acometem indivíduos geralmente acima dos

60 anos de idade, e possui o pior prognóstico devido ao seu rápido desenvolvimento sem evidências clínicas ou histológicas. Já os GBMs secundários originam-se da progressão de glioma de baixo grau, como astrocitoma difuso ou anaplásico, e geralmente acometem indivíduos mais jovens (Kleihues et al.,2007).

Atualmente o tratamento, de glioblastoma envolve cirurgia, radioterapia e quimioterapia, todas as quais são reconhecidas como medidas paliativas, o que significa que eles não fornecem uma cura. Mesmo com ressecção cirúrgica completa do tumor, combinado com o melhor tratamento disponível, a taxa de sobrevivência para glioblastoma continua muito baixa (Feng Jin, 2010).

Apesar dos contínuos avanços na cirurgia, quimioterapia e radioterapia, os resultados clínicos permanecem sombrios. A taxa de sobrevivência de GBM é por volta de 12 a 15 meses após o diagnóstico. Uma melhor compreensão da biologia do GBM é necessária a fim de se desenvolver novas terapias, uma vez que eles são resistentes a quimio e radioterapia, contêm genes de resistência a múltiplas drogas e genes transportadores de drogas (Guo et al., 2009).

1.1 ABC Transportadores

O uso de agentes quimioterápicos é fundamental para o êxito no tratamento de diversos tipos tumorais. Contudo, muitas neoplasias não respondem a quimioterapia, e outras inicialmente responsivas, tornam-se resistentes após uma longa exposição ao mesmo tratamento.

A falha de quimioterapia pode ocorrer através de efluxo aumentado do agente quimioterápico, que conduz à redução dos níveis intracelulares de tais xenobióticos e consequente insensibilidade ou resistência ao tratamento administrado. A principal causa bem estabelecida de resistência a drogas, envolve o aumento da expressão dos membros da superfamília ABC transportadores (ATP Binding Cassete)(Goldie, Coldman., 1979).

Durante o século XX, com o programa do sequenciamento do Genoma Humano, levou a descoberta de um grande número de transportadores, cuja as proteínas estão presentes em todos os organismos vivos. Atualmente os transportadores ABC são a maior família de proteínas transmembranas, com sete subfamílias que são designados A a G, com similaridades de sequência e

homologia estrutural, e são responsáveis pela extrusão de uma grande variedade de xenobióticos (incluindo medicamentos), lipídios e metabólitos. Todas as proteínas porém possuem em comum a realização de um transporte ativo e um sítio de ligação para ATP (Fletcher et al., 2010).

Os membros da família ABC são predominantemente expressos em células do sistema nervoso central, bem como no sistema hematopoiética, e é principalmente conhecida por suas funções em transporte lipídico e homeostase (Fletcher et al., 2010) .

A atividade desses transportadores ABC tem sido muito estudada nos últimos anos, uma vez que os membros dessa família de proteínas transportadoras representam uma estratégia básica de defesa das células contra os efeitos citotóxicos de agentes xenobióticos. Esse mecanismo ocorre em células normais, tumorais e em células procariotas (Lage, 2003).

Os padrões que levam a expressão dessas proteínas podem ser subdivididos basicamente em quatro categorias: A primeira é caracterizada pela expressão intrínseca dos transportadores, já que derivam de uma célula que expressam tais transportadores em sua fisiologia normal. Isso pode ocorrer em órgãos como glândulas adrenais e principalmente nos rins. (Bergman et al., 1996).

A segunda categoria, caracteriza-se por apresentar expressão ocasional desses transportadores, e ocorre geralmente em diversos tipos de leucemia, e neoplasias mamárias. Esse é o caso mais frequente, de tumores inicialmente sensíveis a quimioterapia, que mais tarde se tornam resistentes. A terceira classe envolve tumores com sensibilidade relativa, ou seja, são sensíveis a alguns tratamentos e se mostram resistentes a outros, incluem-se melanomas, tumores na tiroide, timo, ovário e próstata .

A quarta classe representa os tumores que expressam proteínas de resistência após o tratamento, e isso está diretamente relacionado a um mau prognóstico, progressão da doença e previsível ineficácia da quimioterapia administrada (Ginn,1996).

1.2 Proteínas de Resistência a Múltiplas Drogas

O tratamento de aproximadamente 50% dos cânceres humanos depende do uso de quimioterapia. Em muitos casos, a eficácia da quimioterapia é limitada pelo fenômeno conhecido como resistência a múltiplas drogas (proteínas de resustênência a múltiplas drogas) (Kievit, 2011).

No ano de 1976, pesquisadores associaram um gene que seria responsável em tornar células tumorais em células extremamente resistentes a diversos tipos de medicamentos. Desde então a atenção dos pesquisadores se voltaram para uma extensa família de proteínas transportadoras que são capazes de diminuir os níveis de concentração citoplasmático de diversas drogas administradas, favorecendo assim a resistência celular. Esse fenômeno é conhecido atualmente como resistência a múltiplas drogas (MDR) (Leschziner et al., 2007).

Resistência a múltiplas drogas (MDR), é o mecanismo de defesa da própria célula e é normalmente definida como a capacidade de uma célula mostrar resistência a uma grande variedade de compostos tóxicos.

O mecanismo melhor estudado de MDR é o que envolve a superexpressão de uma bomba de efluxo de múltiplas drogas dependente de energia, conhecida como proteínas de resistência a múltiplas drogas as quais pertence à super família de transportadores ABC que atualmente passam dos 48 genes e as funções fisiológicas de alguns deles estão se tornando evidentes.

As proteínas superexpressas em tumores são as chamadas MRPs (proteínas associadas a resistência a múltiplas drogas), que bombeiam através de canais na membrana componentes tóxicos de volta para o meio extracelular, forçando as toxinas para fora da célula como uma verdadeira bomba, diminuindo o acúmulo intracelular (Nagengast et al., 2010).

Figura 1 - Mecanismo de ação de proteínas de resistência a múltiplas drogas.

Fonte: Modificado de Fletcher et al. (2010)

1.3 Glioma x Resistência a múltiplas drogas

Quimioterapia de tumores de cérebro continua sendo um grande desafio, pois possuem mecanismos que impedem os efeitos esperados das drogas como: baixo transporte de droga através da barreira hemato-encefálica (BBB), a resistência a múltiplas drogas (MDR), e baixa penetração no tecido tumoral (Vliet et al., 2011).

A glicoproteína - P (gpP), uma das proteínas associadas a resistência a múltiplas drogas, foi encontrada em 90% dos gliomas primários e 60% dos glioblastomas secundários. A glicoproteína - P (gpP) é uma proteína expressa na superfície celular. Codificada pelo gene *MDR1*, possui peso molecular de

170 KDa e está relacionada com a resistência a múltiplas drogas de alguns tipos de tumores, entre eles os gliomas (Agarwal et al., 2010).

Os medicamentos envolvidos neste tipo de tratamento são geralmente agressivos, porém sofrem devido a atividade integrada de diversos transportadores da família ABC, o que está diretamente relacionado com a variação na concentração intracelular desses fármacos. Os tumores cerebrais especialmente, contam ainda com transportadores da família ABC em uma região de proteção a qual envolve o cérebro denominada barreira hematoencefálica, que funcionará como um filtro, impedindo, ou diminuindo as concentrações das substâncias citotóxicas adentrarem ao sistema nervoso central.

Por se tratar de um tumor de difícil retirada (através de resecção cirúrgica), visando a qualidade de vida do paciente, novas abordagens em relação a produção de drogas mais eficazes tem sido extensivamente estudadas.

1.4 Ciclooxygenases

As enzimas ciclooxygenases existem em duas principais isoformas (com aproximadamente 60% de homologia) e difere na distribuição e expressão nos tecidos. Apesar de existirem exceções, a isoforma COX-1 é expressa constitutivamente em muitos tecidos enquanto que a expressão de COX-2 é raramente detectável na maioria dos tecidos, sendo expressa nas células inflamatórias em condições patológicas e nas células tumorais, induzidas por citocinas, fatores de crescimento e oncogênese (Smith et al., 2000).

As ciclooxygenases 1 e 2 são responsáveis pela síntese das prostaglandinas E (PGEs) a partir do ácido araquidônico. Inicialmente o ácido é liberado do estoque de fosfolípido de membrana pela ação da fosfolipase. O passo seguinte é a conversão do ácido araquidônico em PGH_2 pela prostaglandina sintase e, finalmente, em PGE_2 .

O papel das COXs tem sido amplamente estudado, em especial a isoforma COX-2, que é expressa na maioria dos cânceres humanos (Kalle, 2011), e está relacionada com a angiogênese, inflamação, regulação da invasão celular, mitose, produção de citocinas e fatores de crescimento (Shono et al., 2001).

Sabe-se que em condições normais a COX-2 está presente no cérebro e é encontrado principalmente no córtex, hipocampo, hipotálamo, astrócitos e principalmente em neurônios. Nos gliomas, a COX-2 está presente, mas células tumorais, nos vasos que nutrem o tumor e nas células dos vasos circundantes (Dohadwala et al., 2001).

O mecanismo de ação da carcinogênese pela COX-2 ainda não foi completamente esclarecido. Mas parece ser desencadeada pelo excesso de produção de PGE2 decorrente de uma super regulação da COX-2. Isto provocaria mutações por radicais livres formados pela biossíntese sustentada de prostaglandinas (Harris et al., 1999)

1.5 Possível relação entre Ciclooxygenase e MDRPs

Atualmente muitos estudos têm sido desenvolvidos para elucidar se a atividade de ciclooxygenases (produção de prostaglandinas) tem algum envolvimento com a expressão de proteínas de resistência a múltiplas drogas. Estudos mostraram uma correlação positiva entre elas, principalmente relacionando a COX-2 a tumores de maior agressividade e resistência a fármacos, aumentando assim a resistência celular e dificultando ainda mais o tratamento do tumor.

A recente descoberta de uma ligação entre ciclooxygenase-2 (COX-2) e expressão da glicoproteína-P apontam que a COX- 2 está envolvida no desenvolvimento do fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), e no aumento de proteínas associadas a resistência a múltiplas drogas (MRP1), que são proteínas super-expressas em pacientes com câncer (Kang et al., 2009).

A estreita associação entre MDR e COX-2 foi relatada no carcinoma hepatocelular humano e em ratos com câncer renal. Os resultados mostraram que a expressão de COX-2 aumentou a expressão de glicoproteína-P (Sorokin et al., 2004).

A forte correlação entre a expressão da COX-2 e MDR-1 também foi encontrado em amostras de tumor de pacientes com câncer de mama (Ratnasinghe et al., 2001).

A COX-2 é frequentemente super-expressa em câncer de pulmão apresentando também resistência a fármacos (Gore et al., 2004).

Além disso, tem sido sugerido que os inibidores da COX-2 sensibilizam as células às drogas quimioterápicas por um bloqueio funcional da glicoproteína-P. Todos estes estudos sugerem que a COX-2 module a expressão da glicoproteína-P e está envolvida no desenvolvimento do fenótipo MDR (Kang et al., 2009).

Em estudos feitos com ratos a COX-2 levou ao aumento da expressão e atividade da proteína de resistência a múltiplas drogas (MDR-1) (Miller et al., 2006).

Sabe-se na literatura que algumas proteínas de resistência a múltiplas drogas, são capazes de reconhecer prostaglandinas como substrato. As MRPs ao reconhecerem seus substratos aumentam sua atividade de efluxo, o que seria capaz de aumentar consequentemente a expressão dessas proteínas, gerando um feedback positivo, aumentando ainda mais a resistência dessa célula tumoral (Fletcher et al., 2010).

Em gliomas um único estudo foi achado na literatura, onde propõe uma possível relação entre a COX-1 e MRP1, onde não observaram resultados claros, desta maneira os pesquisadores questionaram que talvez a COX-2 estaria envolvida no aumento da expressão de proteínas de resistência (Roller et al., 1999).

Figura 2- Possível modelo de como estaria acontecendo a relação entre ciclooxygenases e proteínas de resistência a múltiplas drogas.

Fonte: Modificado de Fletcher et al. (2010)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Analisar o possível papel de COX-1 e 2 no controle da expressão e/ou atividade de MDR e MRPS em gliomas. Analisaremos os seguintes membros da família de ABC transporters:

☐ ABCC1	=	MRP1
☐ ABCC2	=	MRP2
☐ ABCC3	=	MRP3
☐ ABCC4	=	MRP4
☐ ABCC5	=	MRP5
☐ MDR1	=	Pg-P

2.2 Objetivos específicos

1-) Selecionar uma linhagem de célula de glioma humano que expresse diferentes níveis de ciclooxigenases 1 e 2.

2-) Medir o nível de expressão genica e proteica de MDRs e MRPs usando inibidores de COX-1 e COX-2.

3-) Medir a atividade de transporte dessas proteínas através de substrato fluorescente.

4-) Observar a expressão gênica de MDR1 e MRP2 em células resistentes expostas a vincristina,

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

As células da linhagem celular de glioma humano, linhagens: U251;T98G;U87MG;A172; U138MG foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico (penicilina - 50 U/ml / estreptomicina -50 µg/ml). Os frascos foram mantidos em estufas à 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de ar.

3.2 Curva de crescimento

As células foram plaqueadas em uma placa de 24 wells, contendo 4 diferentes concentrações celulares, sendo: 1×10^4 , 3×10^4 , 5×10^4 e 7×10^4 /well. A contagem das células foi feita após os períodos de 24, 48 e 72 horas. Para a contagem retirou-se o meio e adicionou-se solução de PBS (solução tampão de fosfato) contendo Tripsina 0,025%/EDTA 0,02% para soltar as células da placa.

As trocas de meio foram feitas diariamente. Para cada amostra e tempo diferente foram feitas 3 repetições deste procedimento. As células foram retiradas da placa e colocadas na Câmara de Neubauer para contagem. A concentração escolhida para a utilização no tratamento foi de 4×10^4 .

3.3 Curva de dose

Para testar a influência do tratamento sobre a cultura, analisaram-se os efeitos dos mesmos sobre o crescimento celular das linhagens U251MG e U138MG.

As células foram plaqueadas em uma placa de 24 wells, contendo 3 diferentes concentrações dos inibidores específicos: SC-560(COX-1) e NS-398 (COX-2), em cada poço foi colocada a concentração escolhida de 4×10^4 / ml de células + 500 µL de meio de cultura. Para o tratamento de ambos os inibidores as concentrações testadas foram: 50 µM, 100 µM e 150 µM, para cada concentração foi usada a mesma concentração no grupo controle

(DMSO). Após 12 horas das células terem sido semeadas (tempo para a fixação e estabelecimento das células) as células foram expostas a ambos tratamentos pelo período de 24 e 48 horas. Após esse período as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Após esse procedimento as células foram contadas na Câmara de Neubauer. A concentração escolhida para a utilização no tratamento foi de 50 μ M, pelo período de 48 horas. As células contadas foram comparadas com o grupo controle (DMSO). As trocas dos meios foram feitos diariamente.

3.4 Inibidores de atividade de Ciclooxygenases

As células foram mantidas em frascos de cultura (em triplicata - 3 frascos)_na concentração de células pré-estabelecida de 4×10^4 /ml e tratadas com a concentração de 50 μ M como relatado acima. Para controle foi usado a mesma concentração de células e a mesma concentração de DMSO. As células foram expostas a ambos inibidores pelo período de 48 horas. Após esse período as células foram tripsinizadas e o RNAm foi extraído com trizol (como protocolo abaixo).

3.5 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total, as células foram lisadas com 1ml de Trizol (Invitrogen) e deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período foi adicionadas 0,2 ml de Clorofórmio, e as amostras foram agitadas por inversão durante 15 segundos e deixadas à temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10600 rpm (rotações por minutos) durante 15 minutos a 4 °C. Em seguida, a fase superior aquosa foi retirada e colocada com 0,5ml Isopropanol para centrifugação a 10600 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O precipitado restante foi lavado por 2 vezes em 1 ml de Etanol 95% e centrifugado a 7500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Por fim, o precipitado foi ressuspensionado entre 20 μ l e 100 μ l de água DPC. A concentração de RNA foi determinada no espectrofotômetro pela absorbância 260 nm utilizando como valor padrão $A_{260 \text{ nm}} = 40 \mu\text{g/ml}$ de RNA. A pureza do RNA foi calculada pela relação A_{260}/A_{280} , e todos os RNAs utilizados

apresentaram pureza entre 1,8 e 2,0. O RNA purificado foi estocado e mantido no -80 °C

3.6 Preparação do DNA complementar

A metodologia básica de RT-PCR foi realizada a extração total do RNA com Trizol, clorofórmio e álcool isopropílico, com a pureza do RNA sendo confirmada pela razão de absorbância no espectrofotômetro A260nm/A280nm, entre 1,8 - 2,0. A transcrição reversa (RT) foi feita com MMLV-transcriptase reversa usando aproximadamente 1 µg de RNA de interesse.

O cDNA (DNA complementar) foi obtido através da técnica de RT-PCR utilizando MMLV – transcriptase reversa (Invitrogen). Para tal foram adicionados 1 µl Inibidor de RNA, 2 µl Randon Primer, 2 µl dNTP mix, 2 µl Dithiothreitol (DTT), 4 µl RTbuffer, 2 µl MMLV e aproximadamente 1 µg de cDNA de interesse. Para a amplificação do cDNA foi utilizado um termociclador com as seguintes temperaturas e tempos previamente determinados: 21 °C por 10', 42 °C por 50' e, 99 °C por 10'. A amplificação foi confirmada pela eletroforese em gel de 1% de agarose contendo brometo de etídio sendo o produto visualizado com um sistema de captura UV.

3.7 PCR Convencional

O método de PCR foi feito com Platinum *Taq* DNA polimerase e oligonucleotídeos sense e antisense de interesse, além de um gene controle que não modifica sua expressão nas condições do experimento, por exemplo, a Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), que produz um fragmento de 306 pares de bases (pb). O protocolo de PCR foi padronizado para cada gene de interesse, sendo que utilizamos 94 °C por 1' (para liberação da enzima *Taq* do seu anticorpo) para posterior entrada no ciclo: 94 °C por 1', 1' na temperatura de anelamento calculado para os oligos usados e 72 °C por 1'. Foram feitos 46 ciclos para determinar a faixa linear de produção do produto de amplificação confirmada pelo gel de agarose com amostras retiradas a cada dois ciclos. A análise semiquantitativa do produto foi feita usando o sistema de imagem IMAGE J.

Todos os dados obtidos estão apresentados como média $\pm$ erro padrão (SE). Os resultados foram submetidos a análises de variância seguida de t-teste não pareado para comparar a expressão gênica entre células tratadas e não tratadas. As diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$.

3.8 PCR semiquantitativo – Primers

Todos os primers utilizados foram desenhados com base em sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e com o auxílio do programa Primer 3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). A especificidade de cada primer foi verificada através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os primers foram sintetizados pela Invitrogen. Abaixo estão as sequências dos primers utilizados (Quadro 1).

Quadro 1 - Sequência dos primers utilizados para quantificação da expressão gênica.

GENE	No de acesso	Sequência (5'→ 3')	T(°C)	Ciclo
COX-1	Yasojima et al., 1999	R: CAGACGACCCGCCTCATCCTCAT F: GCCTCAACCCCATAGTCCACCAA	62	38
COX-2	NM_000963.2	R: ATGATCTACCCTCCTCAAGTCCCT F: TACTTTCTGTACTGCGGGTGAAC	62	38
MDR1	Albermann N. et al, 2005	R: TTTTCATGCTATAATGCGAC F: TCCAAGAACAGGACTGATGG	59,1	38
MRP1	NM_004996	R: AGGAGAGATCATCATCGATGG F: GCCTTCTGCACATTCATGG	61,8	38
MRP2	NM_000392	R: CTGCCTCTTCAGAATCTTAG F: CCCAAGTTGCAGGCTGGCC	62	38
MRP3	NM_003786	R: CCTGTATGTGGGTCAAAGTGCG F: CCCAGCCTCAGGGAAGTGTTG	69,1	38
MRP4	NM_005845	R: CCATTGAAGATCTTCCTGG F: GGTGTTCAATCTGTGTGC	59,1	38
MRP5	NM_005688	R: GGATAACTTCTCAGTGGG F: GAATGGCAATGCTCTAAAG	59,1	38

3.9 PCR -Tempo Real

Todos os primers utilizados para a reação de PCR- Tempo real foram desenhados com o auxílio do programa PrimerExpress (Applied Biosystems), GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e o programa Primer3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3www.cgi). A especificidade de cada primer foi verificada através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As principais características desses oligonucleotídeos são: temperatura de anelamento entre 58 e 60°C; amplificação de fragmentos cujo tamanho máximo não exceda 200 pares de bases (pb); não possuir capacidade de anelar entre si ou formarem estruturas secundárias e quantidade moderada de CG (40-60%). Os primers foram sintetizados pela Invitrogen. Abaixo estão as sequências dos primers utilizados (Quadro 2).

Quadro 2 - Sequência dos primers utilizados para quantificação da expressão gênica em tempo real.

GENE	No de acesso	Seqüência (5' → 3')
COX-1	NM_000962.2	R: AACCAAAGGGAAGAAGCAGTTG F: GTGCAAAGAAGGCAAACATGAG
COX-2	NM_000963.2	R: AATTGCTGGCAGGGTTGCT F: GGTCAATGGAAGCCTGTGATACT
MDR1	M14758	R: ACATCATCAAGTGGAGAGAAATCAT
MRP1	L05628	F: ATTTGGACTGTAAGTACTGACTGCCTTGC
MRP2	X96395	R: AACCAAACCCAGACAACCAAAACAT
MRP3	Y17151	F: ATTTGGACTGTAAGTACTGACTGCCTTGC
MRP4	AF071202	R: CCTCCTGGCCTTTCTGTTTTCATC
MRP5	AF104942	F: AACACTGGGGGCACCTTAAGATTTTG
		R: AGCCTATTTTACAAGATGGTGCAACA
		F: TGTCAAGTCCGTTCCGAAGGCATT
		R:ACCGCAGTCGTCGCACAGTCTCTC TC
		F: GCTGTGTGGTTTGGTGTGTTCCCGC

3.10 Padronização da concentração de primer para PCR-Tempo Real

Para quantificação do produto formado durante a reação de PCR-Tempo Real foi utilizado o reagente SYBR green Dye. O SYBR possui afinidade pela menor dupla fita de DNA. Quando não está ligado ao DNA, emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda de 520nm, entretanto, quando se liga a dupla fita de DNA, a fluorescência é aumentada cerca de 100 vezes, permitindo então a detecção do produto de PCR em tempo real.

A determinação da quantidade adequada de cada primer foi realizada através de reações utilizando as concentrações de 200 nM, 400 nM e 800 nM de cada primer e uma amostra do gene conhecido, além das reações na ausência de qualquer amostra amplificável (NTC- Non Template control). Com este ensaio, pode-se determinar a concentração ótima de primer.

Assim, as reações foram feitas em uma placa de 96 wells, com volume final de 20 µl, contendo 5 µl da mistura de cDNA (1:5), 5 µl de primer na concentrações desejadas e 10 µl do SYBR green e colocadas no termociclador 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos(ativação da Taq DNA polimerase), 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 1 minuto(anelamento e extensão). Todas as reações foram realizadas em duplicatas.

3.11 Ensaio de Atividade

Para o Ensaio de atividade foram utilizados corantes bastante conhecidos na literatura como: Rodamina 123 para P-glicoproteína (Draper et al., 1997; Matsunaga et al., 2006; Meaden et al., 2002; Payen et al., 2000;) e CFDA para MRP1 (Matsunaga *et al.*, 2006 ; Meaden et al., 2002). As células (2 frascos de 75cm²), foram tripsinizadas e colocadas num tubo falcon e foram incubadas com 1 mg / ml de Rodamina 123 (Pgp) durante 30 min em solução de PBS (solução tampão de fosfato). Após esse período, o pellet de célula foi lavado com PBS(2x) e diluído em 10ml de PBS, dessa solução estoque foi resuspendido em um volume de 500 µl, que foi centrifugado (formou-se um pellet) que foi resuspendido novamente em 200 µl de PBS. Essa solução de 200 µl foi colocada na placa para medir a fluorescência. A cada 20 minutos o procedimento foi repetido, com novas alíquotas da solução estoque, por 100 minutos (5 medições a cada 20 minutos). Exatamente o mesmo procedimento foi feito para CFDA (MRP1). Foi usado o fluorímetro usando 490nm excitação e 550 nm emissão.

3.12 Ensaio de Resistência – Vincristina

As células foram plaqueadas em uma placa de 24 wells, em uma concentração escolhida através de curva de crescimento (pré estabelecida) de 4×10^4 / wells, com 3 concentrações diferentes de vincristina 5 nM, 10 nM e 25 nM, os experimentos foram feitos em triplicata em ambas linhagens celulares (U138 MG e 251 MG). As trocas de meio foram feitas diariamente, com adição

da droga todos os dias. O grupo controle foi adicionado água MiliQ autoclavada – diluente que foi diluído a droga. A contagem das células foi feita após os períodos de 24, 48 e 72 horas. Para a contagem retirou-se o meio e adicionou-se solução de PBS contendo Tripsina 0,025%/EDTA 0,02% para soltar as células da placa.

3.13 Western Blot

Para a extração da proteína, as células foram lisadas com tampão lise (0,21g/ml de Tris base, 0,584 g/ 100 ml de NaCl, 0,037 g/100 ml de EDTA e 1% de Triton 1 ml/100 ml pH 7,6), inibidor de protease e inibidor de fosfatase por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foi armazenado a

-80 °C. A concentração proteica foi determinada através do método de Lowry. Após a quantificação os extratos proteicos foram diluídos em tampão de amostra (1,51g de Tris-HCl pH 6,8, 40 ml de SDS 10%, 10ml de mercaptoetanol, 20 ml de glicerol e 0,004g de azul de bromofenol) incubados à 100 °C por 3 minutos.

Para o processo de separação foi feito um gel de SDS-PAGE com 7,5% de acrilamida, seguido de um gel de 4% acrilamida. Em cada poço foram incubados 40µg de extrato proteico total (diluído no tampão de amostra) e 3 µl de marcador de peso molecular em cada gel. A corrida foi feita a 100 V pelo período de 2 horas.

Em seguida foram realizadas as transferências das proteínas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o tampão (57,6 g de glicina, 12 g de Tris-base e 4 g de SDS pH 8,3) a 4 °C / 200 mA/ 2:00h. Terminada a transferência das proteínas as membranas foram lavadas 1x com TBS 1X (5min) e 3x com TBS Tween 0,1% (5min) para a retirada do metanol. A fim de bloquear as possíveis ligações não específicas, as membranas foram incubadas à solução de PBS1x + Albumina 1% por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação constante. Passada uma hora da incubação, a membrana foi incubada com o anticorpo primário na diluição recomendada pelo fabricante (abcam), *overnight* em agitação.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS 1X por 10 minutos e com TBS Tween 0,1% (3x) por 10 min. Após as lavagens as membranas foram incubadas no anti corpo secundário na diluição de 1:1000 por 2 horas. Após esse período de incubação as membranas foram lavadas com TBS 1x por 10 minutos e TBS Tween (3x) por 10 minutos. As membranas foram incubadas por 2 minutos com ECL e revelado no equipamento de revelação de imagens quimioluminescente G-Box.

3.14 Análise dos Dados

Todos os dados obtidos estão apresentados como média $\pm$ erro padrão (SE). Os resultados foram submetidos a análises de variância seguida de t-teste não pareado ou one-Way ANOVA. As diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$.

3.15 Padronização dos experimentos

3.15.1 Escolha das linhagens celulares

Primeiramente todas as cinco linhagens celulares de glioma disponíveis no laboratório foram testadas (U251;T98G;U87MG;A172; U138MG), para verificar quais expressavam RNAm para COX-1 e/ou COX-2. Após a realização do experimento de PCR, observou-se que todas as linhagens expressavam tanto COX-1 como COX-2, porém a linhagem U138MG expressou um nível muito inferior de COX-1, comparado as demais linhagens. Decidiu-se então pelo uso da linhagem U138MG por expressar baixos níveis de COX-1 e U251MG por expressar altos níveis de ambas ciclooxygenases.

Figura 3 - Expressão de RNAm de COX-1 (A) e COX-2 (B) em várias linhagens de glioma humano.

a)

b)

3.15.2 Expressão de MDRPs nas linhagens escolhidas

Já com as linhagens escolhidas, submeteu-se tais linhagens ao experimento de PCR para verificar a expressão de RNAm de Proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MDR e MRPs). Verificou-se então que todas as proteínas estudadas (MDR e MRPs1-6) foram expressas em ambas linhagens celulares.

Figura 4 - Expressão de RNAm de Proteínas de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR1 e MRPs 1-6) nas linhagens U138MG (A) e U251MG(B).

a)

b)

3.16 Curva de Crescimento

Sabendo quais proteínas eram expressas nas linhagens escolhidas, foi realizado uma curva de crescimento para as linhagens celulares, a fim de saber qual concentração de célula seria ideal para um modelo experimental futuro.

Foram obtidas as curvas de crescimento de quatro diferentes concentrações (1×10^4 , 3×10^4 , 5×10^4 e 7×10^4 céls/well) de células para a linhagem de U138MG (Figura 5) e U251MG (Figura 6).

A concentração que melhor atende as necessidades do projeto é 4×10^4 céls/ml, pois apresentou uma taxa de crescimento acelerado, além de 48 horas após terem sido semeadas as células entraram na fase de crescimento exponencial. Os experimentos foram feitos em triplicatas para garantir a confiabilidade dos resultados.

Figura 5 - Curva de crescimento da linhagem U138MG. n=3 **Figura 6** - Curva de crescimento da linhagem U251MG.n=3

3.17 Curva de dose do inibidores específicos COX-1 (SC-560) e COX-2 (NS-398)

O primeiro objetivo foi de determinar a quantidade de células, o próximo passo foi testar a influência de varias concentrações de ambos os inibidores (0 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M) do inibidor de COX-1 (SC560) e inibidor de COX-2 (NS-398). As mesmas concentrações foram feitas para os respectivos controles usando DMSO (onde os inibidores foram diluídos) e observou-se a proliferação das linhagens U251MG e U138MG. Os tempos de exposição das células ao tratamento foram de 24 e 48 horas para ambos inibidores. Para verificar a ação desses tratamentos sobre a proliferação celular foi usada o número de células escolhido anteriormente de 4×10^4 céls/well. Os tratamentos na concentração acima de 150 μ M, foram altamente prejudiciais as células em ambos os casos e o tempo de exposição das células aos tratamentos, foi satisfatório em 48 horas. A concentração escolhida para os trabalhos futuros foi de 50 μ M para ambos os inibidores e ficaram expostos pelo período de 48 horas.

A análise da significância dos tratamentos foi feita pelo teste one way ANOVA, onde foi comparado cada tratamento ao seu respectivo controle. Os dados de significância estão presentes nas legendas de cada gráfico. Como os controles não apresentaram uma diferença significativa, foi feito uma média desses controles (expostos ao DMSO em diferentes concentrações 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M), além de um controle negativo, sem DMSO (0 μ M primeira barra azul) e comparamos com os tratamentos nas 3 diferentes concentrações (50 μ M, 100 μ M e 150 μ M). Todas as concentrações tanto dos tratados como dos controles foram feitas com n=2 (número de placas) em triplicata (3 poços de cada concentração). A partir dos experimentos que foram realizados por 2 vezes e obtivemos a média entre eles e foi feito um gráfico final contendo os valores de 24 e 48 horas.

Figura 7 - Curva de concentração de inibidor de COX-2 (NS-398) na linhagem U138MG. n=3

Controle x Tratado

50μM x 50 μM = * P<0.05

24 horas 100μM x 100μM = *** P<0.001

150μM x 150 μM = *** P<0.001

50μM x 50 μM = * P<0.05

48 horas 100μM x 100μM = *** P<0.001

150μM x 150 μM = *** P<0.001

Na comparação dos grupos tratados entre si observamos, uma significância de $P = < 0.0001$, considerado extremamente significativo, tanto em 24 horas como em 48 horas.

Figura 8 - Curva de concentração de inibidor de COX-2 (NS-398) na linhagem U251MG. n=3

Controle x Tratado

50μM x 50 μM = * P<0.05

24 horas 100μM x 100μM = ** P<0.01

50μM x 50 μM = *** P<0.001

48 horas 100μM x 100μM = *** P<0.001

Na comparação dos grupos tratados entre si, observamos uma significância de $P=0.0029$, considerado muito significativo, tanto em 24 horas como em 48 horas.

Figura 9 - Curva de concentração de inibidor de COX-1 (SC-560) na linhagem U138MG. n=3.

Controle x Tratado

50μM x 50 μM = * P<0.05

24 horas 100μM x 100μM = ** P<0.01

150μM x 150 μM = *** P<0.001

50μM x 50 μM = *** P<0.001

48 horas 100μM x 100μM = *** P<0.001

150μM x 150 μM = *** P<0.001

Na comparação dos grupos tratados entre si, observamos uma significância de P=0.0029, considerado muito significativo, tanto em 24 horas como em 48 horas.

Figura 10 - Curva de concentração de inibidor de COX-1 (SC-560) na linhagem U251MG. n=3

Controle x Tratado

24 horas

50 μM x 50 μM = *** P<0.001

100 μM x 100 μM = *** P<0.01

150 μM x 150 μM = *** P<0.001

48 horas

50 μM x 50 μM = *** P<0.001

100 μM x 100 μM = *** P<0.001

150 μM x 150 μM = *** P<0.001

Na comparação dos grupos tratados entre si, observamos uma significância de $P < 0.0001$, considerado muito significativo, tanto em 24 horas como em 48 horas.

3.18 Tratamento com os inibidores de COX-1 (SC-560) e COX-2 (NS-398).

Com bases nas curvas de dose - resposta, a concentração escolhida para o futuro tratamento foi de 50 μ M. As células foram expostas aos inibidores pelo período de 72 horas, após esse período, foi extraído o mRNA para realização de RT-PCR (como descrito anteriormente) onde detectou-se a expressão de MDR e MRPs1-5. As bandas foram quantificadas no programa IMAGE J. Para análise estatística foi usado Anova * $p < 0,05$. N=3 (triplicata biológica)

3.19 Curva de dose - ensaio de Resistência – Vincristina

A partir dessa curva dose/resposta, a concentração escolhida para um futuro tratamento foi de 5 nM, para que não fosse um tratamento extensivamente agressivo, uma vez que a ideia principal era a “criação” de uma linhagem que se tornasse pouco a pouco resistente ao tratamento. Para isso após a escolha da concentração adequada as células foram submetidas ao tratamento com vincristina por 70 dias, sendo expostas a droga um dia sim, um dia não, como indicava um protocolo na literatura (Song, 2012).

Após os 70 dias, havia uma quantidade suficiente de células para que as células fossem coletadas e pudesse ser feito o experimento de PCR. Analisamos se houve alteração na expressão gênica de proteínas que sabidamente pela literatura estão envolvidas no processo de extrusão da vincristina. As proteínas analisadas foram MDR1 e MRP2. Observamos também se houve algum tipo de mudança na expressão de ciclooxygenases.

Figura 11 - Curva de dose resposta de vincristina

Com 3 diferentes concentrações, pelo período de 72 horas, na linhagem celular U138MG

Figura 12 - Curva de dose resposta de vincristina,

Com 3 diferentes concentrações, pelo período de 72 horas, na linhagem celular U251MG.

Controle x Tratado

5μM x 5 μM = * P<0.05

10μM x 10μM = ** P<0.01

25μM x 25 μM= *** P<0.001

5μM x 5 μM = *** P<0.001

10μM x 10μM = *** P<0.001

25μM x25 μM= *** P<0.001

3.20 Ensaio de Atividade – Rodamina 123 e CFDA

Para o ensaio de Rodamina 123, o volume de 500 μ l foi escolhida com base numa curva de concentrações (realizada em tempo 0), como mostrado nos gráficos abaixo. Exatamente o mesmo procedimento foi realizado com CFDA (MRP1). As amostras foram medidas por um fluorímetro, no comprimento de onda de 498nm e 599nm. Cada concentração foi medida em triplicata.

Figura 13 - Padronização de concentração para futura análise no fluorímetro

Concentração escolhida para experimentos futuros foi a de 500µl, na linhagem U138MG e U251MG.

3.21 Padronização dos primers

3.21.1 Padronização dos primers para PCR convencional

A padronização dos primers é um passo importante para otimização dos procedimentos e para assegurar a confiabilidade dos resultados.

No primeiro momento todos os primers (COX-1, COX-2, MDR1, MRP1,MRP2,MRP3,MRP4 MRP5, MRP6 e GAPDH), foram analisados em oito diferentes temperaturas (56,5 °C, 59,1 °C, 61,8 °C, 64,5 °C, 67 °C, 69,1 °C, 70,6 °C e 71,5 °C). Assim, foi possível verificar, qual temperatura entre as oito tiveram o melhor anelamento para ser usado na reação (Figura 5) e esse procedimento foi feito para todos os primers (Quadro 1).

Figura 14 - Teste de temperatura MRP3 – U251MG **Quadro 3** - Temperaturas escolhidas para anelamento dos primers - PCR Convencional.

GENE	Temperatura	Ciclo
<i>COX-1</i>	62,0 °C	38
<i>COX-2</i>	62,0 °C	38
<i>MDR1</i>	59,1 °C	38
<i>MRP1</i>	61,8 °C	38
<i>MRP2</i>	62,0 °C	38
<i>MRP3</i>	61,8 °C	38
<i>MRP4</i>	59,1 °C	38
<i>MRP5</i>	59,1 °C	38
<i>MRP6</i>	69,0 °C	38
<i>GAPDH</i>	59,1 °C	38

3.22 Teste de ciclo

Após a determinação da temperatura de anelamento de cada primer, o próximo passo foi determinar o número de ciclos. Esses testes foram feitos através de uma reação de PCR, onde a cada 2 ciclos, a partir do ciclo 36 até o 46 foram retiradas amostras para análise de amplificações. As amplificações foram confirmadas pela eletroforese em gel de 1% de agarose contendo brometo de etídio sendo o produto visualizado com um sistema de captura UV.

Para finalizar, foi feita a quantificação das densidades arbitrárias de cada ciclo (36, 38, 40, 42, 44 e 46), através do programa Sigma Scan Pro 4. Após quantificação das amplificações foi feito um gráfico (segue abaixo) para verificar qual o melhor ciclo de cada primer.

Analisando os dados dos gráficos, conclui-se que o número de ciclos mais adequado para os primers foi entre 36 e 38, pois nesse intervalo não há risco das amostras saturar. Esse procedimento foi realizado com cada primer, e assim estabelecido os ciclos adequados a cada um. O exemplo abaixo mostra que o ciclo escolhido foi de 36 para o primer de MRP1 em U138MG.

Figura 15 - Teste de ciclos MRP1 – U138MG

Figura 16 - Teste de ciclo MRP1 – U138MG.

3.23 Padronização dos primers para PCR Tempo real

Para o método de PCR -Tempo Real foi feito a padronização da quantidade adequada de cDNA, realizada através de reações utilizando diferentes concentrações de cDNA.

As concentrações testadas foram: 25.000 pg/μl, 12500 pg/μl, 6250 pg/μl, 3125 pg/μl, 1265,5 pg/μl e 781,25 pg/μl. Com isso obtivemos uma curva padrão onde nos mostra a melhor concentração de cDNA para se utilizar nos experimentos futuros. Fizemos também uma curva de concentração dos primers, utilizando 3 concentrações diferentes, sendo 200nM, 400nM e 800nM, esse teste foi feito com cada um dos primers e a partir daí escolheu-se a concentração adequada para cada um, visando uma melhor eficiência do mesmo (Quadro 2).

As reações foram preparadas com um volume final de 20μl para cada concentração, contendo: 10μl de SYBR green, 5 μl de primers na concentração desejada (depende de cada primer) e 5 μl de cDNA(com as concentrações diferentes relatadas acima) sintetizado anteriormente.

As amplificações foram realizadas através do aparelho 7300 Reais Time PCR system (Applied Biosystems). Além das curvas de amplificação, foram realizadas também curvas de dissociação, para verificar a especificidade da amplificação.

Para a escolha da concentração mais adequada foi utilizado o critério de menor variação entre as duplicatas, confirmando a ausência de dímeros de primer ou qualquer outro produto inespecífico, confirmando a confiabilidade dos resultados. Para todas as concentrações foram realizadas duplicatas.

A concentração escolhida de cDNA foi de 6.250pg para todos os primers. Abaixo temos um exemplo de como ocorreu tal padronização, Fig.17 e 18 primer do gene controle 18S.

Quadro 4 - Padronização das concentrações dos primers para PCR-Tempo Real

GENE	Concentrações
<i>MDR1</i>	800nM
<i>MRP1</i>	400nM
<i>MRP2</i>	400nM
<i>MRP3</i>	400nM
<i>MRP4</i>	800nM
<i>MRP5</i>	800nM
<i>MRP6</i>	800nM
<i>18S</i>	200nM
<i>GAPDH</i>	400nM

Figura 17 - Curva padrão de diferentes concentrações de cDNA em duplicata. gene 18S usado como controle interno, linhagem U251MG.

Concentrações decrescentes de cDNA (da direita pra esquerda): 25.000pg, 12.500pg, 6.650pg, 3.125pg, 1.265pg e 0.781pg, os testes foram feitos em duplicatas.

Figura 18 - Corrida em gel de agarose do experimento acima. Gene controle 18S, linhagem U251.

Concentrações crescentes de cDNA (da direita para esquerda)

Figura 19- Curva de dissociação do primer.

Verificamos através dessa curva se houve contaminação ou formação de dímeros no primer, observa-se que não existem outros picos além de um principal, evidenciando que não há formação de dímeros ou algum contaminante.

3.24 Imunofluorescência de Coxs

As células foram plaqueadas na concentração de 4×10^4 em placas de petre de 35mm e foram cultivadas por 3 dias. No terceiro dia as células foram fixadas com paraformaldeído 4%. Após fixadas, as células foram lavadas 3x com PBS gelado, após as lavagens as placas foram bloqueadas com uma solução de 1:1 de água+metanol + 1% de H₂O₂ por 30 minutos. Novamente as células foram lavadas com PBS 3x. Seguiu-se 1 hora de incubação com 1% de albumina soro bovino em PBS/ triton com 1:20 com soro normal de burro. As placas foram colocadas para escorrer a solução. Após, as células foram incubadas no anticorpo primário overnight numa concentração de anti-cox1 1:200 e anti-cox2 1:400. No dia seguinte as placas foram lavadas 3x com PBS triton e foram incubadas duas horas com anticorpo secundário Alexa 488 anti-coelho na concentração de 1:1000. Por último foram lavadas novamente com PBS/triton e foram reveladas no microscópio de fluorescência ZEISS AXIO observer.Z1.

4 RESULTADOS

4.1 PCR – Convencional

Após a exposição ao tratamento com NS-398 (inibidor da COX-2) houve uma diminuição na expressão do RNAm de algumas proteínas quando comparado ao grupo controle em ambas as linhagens, as proteínas MDR1, MRP1 e MRP4 (Fig.22 A, B, E) apresentou uma diminuição de 98,2%, 70% e 84%, respectivamente. As proteínas MRP1, MRP2 e MRP4 (Fig.23 B, C, E) apresentou uma diminuição de 39%, 58% e 52% respectivamente.

Porém, com a exposição ao inibidor SC-560 (inibidor da COX-1) observou-se que em alguns casos, a expressão do RNAm da proteína aumentou na comparação com o grupo controle. A proteína MRP2 (Fig.20 C), apresentando um aumento de 74% e MRP1 e MRP4 (Fig.21 B, E) apresentando um aumento de 38% e 94%, respectivamente. No entanto, outras proteínas também sofreram uma redução em sua expressão como MRP1 (Fig.20 B) e MDR1 (Fig.23 A) que apresentaram uma redução de 44% e 38% respectivamente.

Figura 20 - PCR convencional - inibidor de COX-1 – U138MG

Análise da expressão gênica após o tratamento com inibidor SC-560 (COX-1) na linhagem U138MG. O grupo denominado controle foi exposto a 50 μ M de DMSO e o grupo denominado 50 μ M foi exposto ao inibidor de COX-2. Todos os grupos foram normalizados com o gene endógeno GAPDH. A expressão gênica foi quantificada no programa ImageJ. Para análise estatística foi usado Anova * $p < 0,05$. N=3

Figura 21 - PCR convencional - inibidor de COX 1 - U251MG

Análise da expressão gênica após o tratamento com inibidor NS-398 (COX-2) na linhagem U138MG. O grupo denominado controle foi exposto a 50 μ M de DMSO e o grupo denominado 50 μ M foi exposto ao inibidor de COX-2. Todos os grupos foram normalizados com o gene endógeno GAPDH. A expressão gênica foi quantificada no programa ImageJ. Para análise estatística foi usado Anova * $p < 0,05$. N=3

Figura 22 - PCR convencional - inibidor de COX-2 – U138MG

Análise da expressão gênica após o tratamento com inibidor NS-398 (COX-2) na linhagem U138MG. O grupo denominado controle foi exposto a 50 μ M de DMSO e o grupo denominado 50 μ M foi exposto ao inibidor de COX-2. Todos os grupos foram normalizados com o gene endógeno GAPDH. A expressão gênica foi quantificada no programa ImageJ. Para análise estatística foi usado Anova * $p < 0,05$. N=3.

Figura 23 - PCR convencional - inibidor de COX 2 – U251MG

Análise da expressão gênica após o tratamento com inibidor NS-398 (COX-2) na linhagem U251MG. O grupo denominado controle foi exposto a 50 μ M de DMSO e o grupo denominado 50 μ M foi exposto ao inibidor de COX-2. Todos os grupos foram normalizados com o gene endógeno GAPDH. A expressão gênica foi quantificada no programa ImageJ. Para análise estatística foi usado Anova *p<0,05. N=3

4.2 PCR REAL-TIME

Após o tratamento com ambos inibidores de ciclooxigenases, como descrito em materiais e métodos, foi extraído o RNAm para realização do PCR em tempo real. E foi analisada a expressão de MDR e MRPs1-5. Observamos em nossos resultados um padrão muito parecido com o que encontramos no RT-PCR, o que confirma os resultados obtidos. O tratamento com o inibidor de COX-1 (SC-560) observamos uma diminuição de 68% na expressão de MDR na linhagem U138MG (Fig. 24 A), Observamos também uma diminuição de 38% na expressão de MRP4 na linhagem U251MG (Fig. 25 E).

O tratamento com inibidor de COX-2 (NS-398) mostrou diminuição significativa em três proteínas analisadas, MDR1, MRP1 e MRP4, uma diminuição expressão de 72%, 32% e 68% respectivamente na linhagem U138MG (Fig. 26 A,B e E).

Na linhagem U251MG com exposição ao inibidor de COX-2 observamos a diminuição das mesmas proteínas MDR, MRP1 e MRP4 em 76%, 37% e 59%, respectivamente (Fig.27 A,B e E).

Figura 24 – PCR Real-time -U138MG – SC-560 (inibidor de COX-1) **Figura 25 – PCR Real-time -U251MG – SC-560 (inibidor de COX-1)**

Em todos os experimentos de real time, o gene controle constitutivo foi usado 18S, e o método de análise escolhido foi ($\Delta\Delta Ct$). Os resultados foram analisados pelo método ANOVA, considerando significativo o valor <0,05

Figura 26 - PCR Real-Time - U138MG – NS-398 (inibidor de COX-2) **Figura 27 – PCR Real-time - U251MG – NS-398 (inibidor de COX-2)**

Em todos os experimentos de real time, o gene controle constitutivo foi usado 18S, e o método de análise escolhido foi ($\Delta\Delta C_t$). Os resultados foram analisados pelo método ANOVA, considerando significativo o valor <0,05.

4.3 Ensaio de atividade com Rodamina

Após a concentração escolhida previamente, a absorbância da fluorescência foi medida no fluorímetro, onde observamos uma queda na fluorescência em ambas as linhagens. A queda da fluorescência evidencia a atividade de bombas de efluxo – no caso a Rodamina substrato para MDR (Pg-P) e o CFDA substrato para MRP1. Observamos que na linhagem U138MG a queda da fluorescência de Rodamina é muito baixa, isso deve-se ao fato de que essa linhagem expressa baixos níveis de Pg-P (Fig. 27 A e B) . Já na linhagem U251MG a queda é muito maior, uma vez que essa linhagem expressa maiores níveis de tal proteína (Fig 27 C e D).

Figura 27- Ensaio de Atividade com Rodamina

A)

B)

Cada ponto representa média aritmética de triplicatas, que foram medidas a cada 20 minutos. E foi realizada replicata.

C)

D)

Cada ponto representa média aritmética de triplicatas, que foram medidas a cada 20 minutos. E foi realizada replicata.

4.4 Ensaio de atividade com CFDA

Exatamente o mesmo procedimento feito com Rodamina foi feito com CFDA susbtrato de MRP1, e observamos uma queda significativa em ambas as linhagens celulares, uma vez que ambas possuem altos níveis de expressão de MRP1.

Figura 28 - Ensaio de Atividade CFDA (MRP1)

A)

B)

C)

D)

Cada ponto representa média aritmética de triplicatas, que foram medidas a cada 20 minutos. E foi realizada replicata.

4.5 Imunofluorescência – Ciclooxygenases

No experimento de imunofluorescência observamos a expressão de COX- 1 e COX-2 nas linhagens U138MG e U251MG.

Figura 29- Imunofluorescência – Ciclooxygenases

Imunofluorescência de ciclooxygenases, pode-se observar distribuição proteica em ambas as linhagens.

4.6 Western Blot

Os experimentos de western blots, foram realizados com células tratadas com ambos inibidores de COXs, e podemos observar uma diminuição significativa em algumas proteínas analisadas. Com o tratamento com o inibidor de COX-1 observamos uma diminuição significativa na expressão proteica de MRP4 de 61% na linhagem U138MG (Fig. 31 E), bem como uma diminuição de MDR1 e MRP2 de 58% e 44% respectivamente, na linhagem U251MG (Fig. 32 A e C).

Já com o tratamento inibindo COX-2, observamos uma diminuição significativa na expressão proteica da proteína MRP4 na linhagem U138MG (Fig 34 E). Já na linhagem U251MG as proteínas que diminuíram sua expressão foram MDR1, MRP3 e MRP4 (Fig. 35 A, C e E), esta linhagem também apresentou um aumento significativo de MRP2 em 28% (Fig. 33 B).

Figura 30 - Western Blot - Ciclooxygenases

Análise da expressão proteica de COXs 1 e 2 , por western blot. Observamos à expressão de ambas as ciclooxygenases nas duas linhagens celulares.

Figura 31 - Western Blot - U138MG – SC 560 (inibidor de Cox-1) **Figura 32 - Western Blot - U251MG – SC 560 (inibidor de Cox-1)**

Figura 33 - Western Blot – U138MG – NS 398 (inibidor de Cox-2) **Figura 34 - Western Blot – U251MG – NS 398 (inibidor de Cox-2)**

4.7 Resumo dos Resultados

Tabela 1- Resumo dos resultados com inibidor de COX-1, linhagem U138MG

	PCR Convencional	PCR Tempo Real	Western blot
MDR	-----	-----	-----
MRP1	38% ↓	-----	-----
MRP2	72% ↑	-----	-----
MRP3	-----	-----	-----
MRP4	-----	38% ↓	72% ↓
MRP5	-----	-----	-----

Tabela 2- Resumo dos resultados com inibidor de COX-1, linhagem U251MG

	PCR Convencional	PCR Tempo Real	Western blot
MDR	-----	68% ↓	68% ↓
MRP1	38% ↑	-----	-----
MRP2	-----	-----	56% ↓
MRP3	-----	-----	-----
MRP4	84 ↑	-----	-----
MRP5	-----	-----	-----

Tabela 3- Resumo dos resultados com inibidor de COX-2, linhagem U138MG

	PCR Convencional	PCR Tempo Real	Western blot
MDR	94% ↓	72% ↓	-----
MRP1	43% ↓	32% ↓	-----
MRP2	-----	-----	-----
MRP3	-----	-----	-----
MRP4	28% ↓	68% ↓	69%
MRP5	-----	-----	-----

Tabela 4- Resumo dos resultados com inibidor de COX-2, linhagem U251MG

	PCR Convencional	PCR Tempo Real	Western blot
MDR	-----	76% ↓	73% ↓
MRP1	38% ↓	37% ↓	-----
MRP2	58% ↓	-----	51% ↓
MRP3	-----	-----	56% ↓
MRP4	52% ↓	59% ↓	69% ↓
MRP5	-----	-----	-----

4.8 Ensaio de Resistência – Vincristina

De acordo com a concentração pré estabelecida de 5nM, as células foram expostas ao tratamento com vincristina por 70 dias, após esse período as células resistentes, foram coletadas para preparação do cDNA, foi feito PCR convencional, como descrito em materiais e métodos. No experimento de PCR analisou-se as duas proteínas de resistencia que estariam diretamente ligadas a extrusão de vincristina e alcalóides em geral, MDR (Pg-P) e MRP2, além de analisar se houve alteração na expressão genica das ciclooxigenases.

Figura 35 - Ensaio de Resistência – Vincristina**A)****U138MG**

Análise da expressão de ciclooxigenase 1 e 2 na linhagem de células resistentes - U138MG.

B)

U 251MG

Análise da expressão de ciclooxygenase 1 e 2 nas linhagens de células resistentes, U251MG e U138MG.

MRPs

C)

U138MG

Análise da expressão de MDR (Pg-P) e MRP2, proteínas capazes de transportar alcalóides, como a vincristina.

D)

U251MG

Análise da expressão de MDR (Pg-P) e MRP2, proteínas capazes de transportar alcalóides, como a vincristina.

5 DISCUSSÃO

Os oncologistas foram os primeiros a observarem que cânceres tratados com várias drogas antineoplásicas tendem a desenvolver uma resistência cruzada para muitos outros agentes citotóxicos para o qual eles nunca tinham sido expostos, dificultando a possibilidade de curar esses tumores com quimioterapia. Esta observação sugere que a resistência múltipla a múltiplas drogas (MDR) é em muitos casos, o principal mecanismo de defesa dessas células, que permitem as células cancerosas sobreviverem na presença de muitos agentes citotóxicos diferentes.

Diferentes mecanismos fazem parte do fenótipo de resistência a múltiplas drogas e vários deles estão associados com a alta expressão MDR (P-gP) e proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MRPs). A correlação entre a super-expressão de MRPs e o grau de malignidade do tumor tem sido extensivamente estudada, observa-se em muitos casos uma alta expressão dessas proteínas em tumores altamente malignos, exibindo resistência a maioria dos quimioterápicos conhecidos (Zatelli et al., 2007).

No presente estudo, duas linhagens celulares de glioma (U251MG e U138MG) foram analisadas a fim de verificar a expressão de proteínas relacionadas a resistência (MDR e MRPs1-5), bem como observar a correlação entre MDR e ciclooxigenases.

Sabe-se que células inicialmente sensíveis, podem posteriormente apresentar o fenótipo de resistência ao tratamento, a chamada resistência adquirida, comum em tumores expostos durante muito tempo ao mesmo tratamento. Sabe-se também que em tumores malignos também é comum a super-expressão de ciclooxigenase, principalmente a isoforma COX-2 (Heese et al., 2000).

Descobertas recentes ligaram a COX-2 ao aumento de expressão da Pg-P e outras proteínas de resistência (MRPs), isso foi observado em câncer de pulmão, cólon, mama, próstata e câncer gastrointestinal (Borst et al., 2000).

A forma mais frequente da resistência observada em pacientes com câncer é caracterizado pela resistência cruzada a uma grande variedade de drogas estruturalmente independentes, incluindo a antraciclina, alguns

alcalóides da Vinca (ex.vincristina), entre outros componentes químicos sem analogia química entre si (Choy et al., 2003).

Com base nesses estudos, analisamos também a expressão de MRPs em células resistentes a vincristina, e observamos que em células resistentes ao tratamento houve um aumento na expressão das proteínas responsáveis pela extrusão de tal droga, MDR1 e MRP2. Também foi possível perceber um aumento de 37% na expressão de COX-1 na linhagem U138MG. Nossos resultados de aumento na expressão de proteínas de resistência (MDR e MRP2), em células expostas por um longo período ao mesmo fármaco, corrobora com os dados da literatura. Quezada et al. (2012) realizou um experimento semelhante em células de glioma T98G resistentes a vincristina e observou o mesmo aumento em uma outra proteína de resistência MRP1. Outro grupo de pesquisa cultivou um grupo de células resistentes a doxorrubicina, e observaram o mesmo aumento na expressão de MDR (Pg-P) em células de sarcoma uterino (Rezende, 2010).

Trabalhos também mostraram que quando ciclooxygenase-2 foi inibida, as células tornaram-se mais sensíveis ao tratamento administrado, como por exemplo: células C6 de glioma de rato que se tornaram mais sensíveis ao tratamento com doxorrubicina (Kievit et al., 2011), células K562 tornaram-se menos resistentes a doxorrubicina quando expostos à celecoxibe (Arunasree et al., 2008), células de câncer de mama MCF7 diminuíram sua capacidade de efluxo de alguns substratos após a inibição de ciclooxygenase-2 (Kalalinia et al., 2010), células de câncer de cólon HCT-15 mostraram maior sensibilidade a cisplatina, após a inibição de COX-2 (Saikawa et al., 2004).

Nossos resultados de PCR e western blot corroboram com resultados anteriores na literatura, que também observaram mudanças na expressão de algumas proteínas de resistência como MDR(Pg-P) e MRP4.

Nosso estudo testou a hipótese de que COX-1 e / ou COX-2 podem desempenhar um papel na regulação e expressão de MDR e MRPs em glioma. Isto seria possível pois sabe-se que vários membros da família ABCC são capazes de reconhecer prostaglandinas (produtos das Ciclooxygenase) como substrato (Dean et al., 2001).

Podemos observar em nossos resultados a expressão diferencial de MDR-MRPs entre as linhagens U251MG e U138MG, isso já era esperado, pois

cada linhagem celular pode expressar ou não diferentes membros dessa família de transportadores.

Nossos resultados demonstraram diferentes alterações na expressão de tais proteínas expostas a tratamentos com os inibidores específicos de COX-1 e COX-2. Portanto, inibindo a atividade das ciclooxigenases teríamos teoricamente uma diminuição na liberação do produto dessas enzimas, que são as prostaglandinas (PGs), podendo haver dessa forma uma diminuição na expressão das MRPs responsáveis pelo transporte de PGs, colaborando assim para diminuir a resistência celular (Fletcher, 2010).

O que sabemos através da literatura é que alguns membros da família de proteínas associadas a múltiplas drogas estão diretamente envolvidos no transporte de prostaglandinas (PGs) como por exemplo: MDR1 (P-gp), MRP2 e MRP4, essas proteínas como podemos observar em nossos resultados sofreram algum tipo de modificação em sua expressão com o uso dos inibidores específicos. Em contrapartida algumas proteínas não estão até o momento relacionadas a reconhecer tais substratos e talvez por esse motivo não tiveram em sua expressão nenhuma alteração como por exemplo as proteínas: MRP3, MRP5 e MRP6. Já que essas proteínas teoricamente não seriam capazes de reconhecer COXs como substratos (Fletcher et al., 2010).

Os nossos resultados nos ensaios de atividade com substratos especiais para MDR (Pg-P) (Rodamina) e MRP1 (CFDA) também corroboram com estudos anteriores, podemos observar uma queda na fluorescência nas células, uma vez que as proteínas analisadas estariam transportando o substrato fluorescente para o meio extracelular. O que mostra atividade transportadora de tais proteínas. Um grupo de estudo realizou experimentos semelhantes na linhagem de eritroleucemia humano K562, onde se observou que as células expostas a indometacina se tornaram mais sensíveis ao tratamento com doxorubicina. Nos ensaios de atividade com rodamina e CFDA foi demonstrado uma diminuição na atividade de MDR(Pg-P). (Matsunaga et al., 2005).

Figura 36 – Esquema dos resultados

Os dados em branco – são referentes a expressão gênica.
Os dados em amarelo – são referentes a expressão proteica.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão nossos resultados mostraram que o tratamento com os inibidores específicos para COX-1 (SC-560) e COX-2 (NS-398) foram capazes de modificar a expressão do RNAm e a expressão de algumas dessas proteínas de resistência.

As principais conclusões extraídas desse trabalho foram:

1. Observamos a expressão de ambas ciclooxygenases em ambas linhagens analisadas.
2. Foi observada na curva de crescimento, diferença significativa na cinética de proliferação, das linhagens celulares expostas aos inibidores de COX-1 e COX-2, mostrando a importância dessas proteínas na regulação desse processo.
3. Observou-se a expressão de todas as proteínas de resistência analisadas: MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 e MRP5.
4. Inibindo COX-1 e COX-2, a expressão gênica das proteínas de resistência sofreram modificações, em ambas linhagens estudadas U251MG e 138MG.
5. Inibindo COX-1 e COX-2 a expressão proteica dessas proteínas também foram alteradas em ambas linhagens estudadas.
6. Observamos a atividade de efluxo de Pg-P e MRP1 em ambas linhagens estudadas.
7. Nas células resistentes expostas ao tratamento de vincristina, observamos um aumento significativo na expressão de proteínas capazes de

reconhecê-la como substrato para transporte. Nota-se também o aumento significativo de ciclooxigenase 2 na linhagem U251MG, e aumento de COX-1 na linhagem U138MG.

REFERÊNCIAS*

Agarwal S, Sane S, Ohlfest JR, William FW. Elmquist Role of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2/BCRP) in the Distribution of Sorafenib to the Brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336(1):223-33.

Alexandru O, Laura Dragutescu L, Tataranu L, Ciubotaru V, Sevastre A, Georgescu AM, Purcaru O, Danoiu S, Baćklund M, Dricu A. Helianthin induces antiproliferative effect on human glioblastoma cells in vitro. *J Neurooncol.* 2011 Mar;10:9-18.

Arunasree KM, Roy KR, Anilkumar K, Aparna A, Reddy GV, Reddanna P. Imatinib-resistant K562 cells are more sensitive to celecoxib, a selective COX-2 inhibitor: Role of COX-2 and MDR-1. *Leuk Res.* 2008;326:855-64.

Arunasree MK, Arshad R. Inhibition of bacterial multidrug resistance by celecoxib, a Cyclooxygenase-2 inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:439-42.

Awara WM, El-Sisi AE, El-Sayad ME, Goda AE. The potential role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of experimentally-induced mammary tumour: does celecoxib enhance the anti-tumour activity of doxorubicin? *Pharmacol Res.* 2004;50:487-98.

Bloom DV, Fawcett JA. *Textbook of histology.* 12th ed. Philadelphia: Chapman & Hall; 1994.

Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Perrotton T, Di Pietro A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: Recent advances in the discovery of reversal agents. *Med Res Rev.* 2005;25:453-72.

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

Choy H, Milas L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1440-52.

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1295–302.

Dai C, Holland EC. Glioma models. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1551:19-27.

Dallas S, David S, Miller D, Bendayan R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev.* 2006;58:140-61.

Dannenberg AJ, Zakim D. Chemoprevention of colorectal cancer through inhibition of cyclooxygenase-2. *Semin Oncol.* 1999 Oct;26:499-504.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: Sample references. [updated 2011 Jul 15] Available from: <http://www.icmje.org>.

Davies CL, Loizidou M, Cooper AJ, Taylor L. Effect of gamma-linolenic acid on cellular uptake of structurally related anthracyclines in human drug sensitive and multidrug resistant bladder and breast cancer cell lines. *Eur J Cancer*. 1999;35:1534-40.

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 2001;11:1156-66.

Dohadwala M, Luo J, Zhu L, Dougherty GJ, Sharma S, Huang M, Pold M, Batra RK, Dubinnet SM. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD4. *J Biol Chem*. 2001 Jun 15;276:20809-12.

Draper MP, Martell RL, Levy S.B. Indomethacin-mediated reversal of multidrug resistance and drug efflux in human and murine cell line overexpressing MRP, but not Pglycoprotein. *Br J Cancer*. 1997;75:810-5.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello F M, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*. 1994;107:1183-8.

Erwin A, Vliet V, Zibell G , Pekcec A , Schlichtiger J, Edelbroek PM , Holtman L , Aronica E, Jan Gorter A, Potschka H. COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. *Neuropharmacology*. 2010;58:404-12.

Fantappie O, Masini E, Sardi I. The MDR phenotype is associated with the expression of COX-2 and iNOS in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatology*. 2002;35:843-52.

Feng J, Zhaob L, Guoc YJ, Zhaoa W, Zhanga H, Wanga H, Tong Shaoa, Zhangb S, Fengd J, Jiangd X, Zhaod H. Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrugresistance-associated protein genes in CD133 positive U251glioblastoma stem-like cells. *Brain Res*. 2010;1336:103-11.

Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris M D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer*. 2010;1:147-56.

Forrest M, Kievit A, Freddy Y, Wang A, Fang AC, Kui Wang K, Silber JR, Richar, Ellenbogen G, Zhang M. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. *J Control Release*. 2011; 30;152:76-83.

Goldie JH, Coldman AJ. A mathematical model formulatins the drug sensitivity of tumours to their spontaneous mutations rate. *Cancer Treat Rep*. 1979;63:1727-33.

Gore E. Celecoxib and radiation therapy in non-small-cell lung cancer. *Oncology*. 2004;18:10-4.

- Hasegawa K, Ohashi Y, Ishikawa K, Yasue A, Kato R, Achiwa Y, Nishio E, Udagawa Y. Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor. *Int J Oncol*. 2005;26:1419-28.
- Hara A, Okayasu I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. *Acta Neuropathol*. 2004 Jul;108(1):43-8.
- Hasegawa K, Ohashi Y, Ishikawa K, Yasue A, Kato R, Achiwa Y, Nishio E, Udagawa Y, Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T, Takahashi T. Increased expression of cyclooxygenase-2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Int J Oncol*. 2005 May;26:1419-28.
- Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J, Kraeft S-K, Seyfried NT, Abe T, Chen LB, Carroll RS, Black PM: Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human gliomas and *in vitro* inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS398. *Cancer Res*. 2000;60:4926-31.
- Kang H, Lee E, Pyo H, Lim S. Cyclooxygenase-independent down-regulation of multidrug resistance-associated protein-1 expression by celecoxib in human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2005 ;4:1358-63.
- Kondo Y, Hollingsworth EF, Kondo S. Molecular targeting for malignant glioma. *Int J Oncol*. 2004; 24:1101-11.
- Holland EC. Glioblastoma multiforme the terminator. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97:6242-4.
- Holland EC. Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models. *Nature*. 2001;2:120-9.
- Lage JJ, Hughes CS, Fine RL, Page RL. P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer*. 1996;77:1892-8.
- Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB genotype and PG-P expression, function and therapeutic drug response: a critical review and research. *Pharmacogenomics J*. 2007 Jun;7(3):154-79.
- Leslie ME, Deeley GR, Cole P C. Multidrug resistance proteins: role of glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204:216-37.
- Lin T, Islam O, Heese K. ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis – a different perspective. *Cell Res*. 2006;16:857-71.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O, Webster K, Burger P, Jouvett A, Scheithauer B, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114:97-109.

- Lucena RC, Ribeiro M. Correlação clínico-topográfica em glioblastomas multiformes nas síndromes motoras: significados fisiopatológicos. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006;64:441-5.
- Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Enrici RM. Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Res*. 2009; 29:5171-84.
- Matsunaga S, Asano T, Tsutsuda-Asano A, Fukunaga Y. Indomethacin overcomes doxorubicin resistance with inhibiting multi-drug resistance protein 1 (MRP1). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;58:348-53.
- Meaden ER, Hoggard PG, Khoo SH, Back DJ. Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Immunol Methods*. 2002;262:159-65.
- Miller B, Patel AV, Sorokin A. Cyclooxygenase-2 rescues rat mesangial cells from apoptosis induced by adriamycin via upregulation of multidrug resistance protein 1 (PGlycoprotein). *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:977-85.
- Nies AT, Jedlitschiky G, König J, Herold-Mende C, Steiner H, Schmitt P, Keppler D. Expression and Immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1–MRP6 (ABCC1–ABCC6), in human brain. *Neuroscience*. 2004;129:349-60.
- Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*. 2005;25:1-7.
- Pairat M, Engelhardt G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol*. 1996;10:1-17.
- Payen L, Courtois A, Campion J-P, Guillouzo A, Fardel O. Characterization and inhibition by a wide range of xenobiotics of organic anion excretion by primary human hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 2000 ;60:1967-75.
- Petersen C, Petersen S, Milas L, Lang F, Tofilon PJ. enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective Cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2000;6:2513-20.
- Quezada C, Wallys G, Carlos O, Fernández k, Segura R, Rómulo Meloc R, Casanellod P, Sobreviad L, Martina RS. 5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2012;11:122-27.

Ratnasinghe D, Daschner PJ, Anver MR, et al. Cyclooxygenase-2, P-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible? *Anticancer Res.* 2001;21(3C):2141-7.

Rezende BCG. Estudo de resistência a múltiplas drogas em linfoma canino [dissertação]. São Paulo;2005.

Robbins SL. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Sorokin A. Cyclooxygenase-2: potential role in regulation of drug efflux and multidrug resistance phenotype. *Curr Pharm Des.* 2004;10:647–57.

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009;9:719-26.

Zatelli MC, Luchin A, Tagliati F, Leoni S, Piccin D, Bondanelli M, Uberti E. Cyclooxygenase-2 inhibitors prevent the development of hemoresistance phenotype in a breast cancer cell line by inhibiting glycoprotein p-170 expression. *Endocr Relat Cancer.* 2007;14:1029-38.

Zhenhua G, Jin Z, Lihua Zhao, Qing Luo, Xianqing Jin Expression and clinical significance of multidrug resistance proteins in brain tumors. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:122.

Zhou RL, Zhang L, Wang R. Effect of celecoxib on proliferation, apoptosis, and surviving expression in human glioma cell line U251. *Chin J Cancer.* 2010;29:294-9.

Wouter B, Nagengast TH, Munnink O, Dijkers CF, Geke AP. Hospers, Adrienne H. Brouwers, Carolien P. Schröder, Marjolijn Lub-de Hooge, and Elisabeth G.E. de Vries. Multidrug Resistance in Oncology and Beyond: From Imaging of Drug Efflux Pumps to Cellular Drug Targets. *Multi-Drug Resistance in Cancer. Methods Mol Biol.* 2010;596:15-31.