Lívia Rosa Fernandes

**Caracterização do potencial citotóxico de oxisteróis
como estratégia terapêutica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do
crescimento celular, hemodinâmicos e da
hemostasia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2015

Lívia Rosa Fernandes

**Caracterização do potencial citotóxico de oxisteróis
como estratégia terapêutica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do
crescimento celular, hemodinâmicos e da
hemostasia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Lívia Rosa

Caracterização do potencial citotóxico de oxisteróis como estratégia
terapêutica / Lívia Rosa Fernandes. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Resistência a múltiplos medicamentos 2.Glicoproteína P
3.Leucemia mielogênica crônica BCR-ABL positiva 4.Morte celular 5.Apoptose
6.Cetocolesteróis 7.Espectrometria de massas

USP/FM/DBD-086/15

Fernandes LR. Caracterização do potencial citotóxico de oxisteróis como estratégia terapêutica [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Resistência a múltiplas drogas (MDR) é um fenômeno multifatorial que causa falha na quimioterapia em pacientes e é caracterizado pela resistência cruzada a uma ampla variedade de drogas com estrutura e mecanismos de atuação diferentes. A terapia contra câncer tradicionalmente utiliza a citotoxicidade como estratégia de tratamento, assumindo que a destruição das células do tumor aperfeiçoa o potencial de sobrevivência do paciente. 7-cetocolesterol (7KC) é um dos principais produtos da auto-oxidação do colesterol, através da adição de um radical cetona no carbono 7. Diversos trabalhos descreveram o potencial citotóxico do 7KC mas, até o momento, nenhum estudo caracterizou 7KC como agente quimiosensibilizador. No presente estudo, foi avaliado o efeito de 7KC na viabilidade celular e fenótipo MDR das linhagens celulares de leucemia mielóide crônica K562 e Lucena (uma linhagem celular resistente a múltiplas drogas induzida pela exposição contínua a vincristina). Foi observado que 7KC pode causar redução da viabilidade celular em células K562 e também em células MDR Lucena, por meio de apoptose com exposição de fosfatidilserina, envolvimento das caspases 3/7 e 8 e despolarização da membrana mitocondrial. Ao mesmo tempo, 7KC pode reduzir o fenótipo MDR em linhagem Lucena com a diminuição da expressão de MDR1 e maior acúmulo intracelular de daunorubicina e rodamina 123. Além disso, a co-incubação das linhagens celulares em associação a quimioterápicos mostrou uma maior redução da viabilidade celular, em relação ao seu uso isolado. Com a análise por espectrometria de massas para quantificação de proteínas livres de marcadores do efeito de 7KC sobre a linhagem MDR Lucena foi possível identificar a alteração na expressão de proteínas

relacionadas ao tRNA, fatores de alongamento, proteínas ribossomais, fosfatases proteicas, ATP sintases, enzimas Redox, proteínas "Heat shock", proteossomos, NEDDilação proteica, Stat3, MAPK 1, Anexina 1, histonas e ribonucleossoma.

Descritores: resistência a múltiplos medicamentos; glicoproteína P; leucemia mielogênica crônica BCR-ABL positiva; morte celular; apoptose; cetocolesteróis; espectrometria de massas

Fernandes LR. Evaluation of oxysterols cytotoxic potential as a therapeutic strategy [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

The multidrug-resistant (MDR) phenotype is multifactorial, related to the poor outcome patients treated with chemotherapeutic drugs, it contributes to the overall clinical resistance. Cytotoxicity has been frequently employed as a strategy towards cancer therapy. 7-Ketocholesterol is one of the main products of cholesterol autoxidation and several studies described its great cytotoxic potential in a variety of cell models. At the present study, 7KC effect on cell viability and MDR phenotype was accessed in K562 lineage, a CML cell model, and its MDR counterpart Lucena. Cell viability reduction was observed, together with apoptosis characterized by phosphatidylserine exposure, caspases 3/7 and 8 activation and mitochondrial membrane potential decrease. Besides, 7KC downregulates MDR1 expression in Lucena cell lines, promoting intracellular drug accumulation. Moreover, 7KC co-incubation with both Daunorubicin and Vincristin promoted a reduction of cell viability compared to the use of each drug alone. Additionally, label free mass spectrometry protein quantification of Lucena MDR cell line treated with 7KC allowed the identification and change of expression of elongation factors, ribosomal proteins, protein phosphatases, Redox enzymes, heat shock proteins, protein NEDDylation, Stat3, MAPK1, Annexin 1, histones and ribonucleosome.

Descriptors: drug resistance, multiple; P-glycoprotein; Leukemia, myelogenous, chronic, BCR-ABL positive; cell death; apoptosis; ketocholesterols; mass spectrometry.

AGRADECIMENTOS

Existem poucas oportunidades de agradecer publicamente às pessoas que nos ajudaram no dia-a-dia e nos momentos de dificuldade. Gostaria de agradecer a todos que estiveram do meu lado nesse caminho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski pela orientação, por se empenhar em minha formação científica. Pela disponibilidade, gentileza e todos os ensinamentos de vida. Muito obrigada por ter me aceitado como aluna e mais do que tudo, por me incentivar a querer aprender sempre.

Aos Profs Dr. Gilberto Domont e. Dr. Fábio Nogueira pelo fundamental suporte metodológico, ensinamento e incentivo necessários para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu crescimento científico.

À Dra Débora Levy, por todo o ensinamento ao longo dessa jornada.

À Dra Luciana Morganti Ferreira Maseli, por todo o apoio e amizade. Obrigada por ser essa pessoa única, boa de coração.

À amiga Ana Carolina Bassi Stern por todo o companheirismo científico e não tão científico assim. São Paulo não seria a mesma coisa sem gente ruiva.

À Cleidinha Menarbin Appolonio por participar do “programa social de manutenção do nível de cafeína dos pós-graduandos”, por todos os “abraços de mãe”, entre todos os outros gestos e palavras de apoio e amizade ao longo desses anos.

A Dra Nair Maeda, Naná, por essa amizade que surgiu em meio a todas as conversas de fim de expediente, pelo carinho, conselhos e lanchinhos.

A Rita de Cássia Cavaglieri, pela ajuda e amizade.

Aos amigos de laboratório, Dra Rosângela Soares, Dra Natália de Vita, Dra Adriana Debeis, Dra Andréa Turbuck, Dra Zenaide Moises, Dr Jorge Ruiz, Linha Fukuya, Denise

Chaves, Mariana Clavé, Suelen Feitoza, Bruno Sini, Joel Cunha e Sr Joel, pelo companheirismo, ajuda e amizade.

Aos amigos, Luiza, Illene e Patrícia. Carol, Thais, Rodrigo, Luciana, Fabiana, Hanna e Tatiana por serem reais e incondicionais.

A Paula Kaminow por me fazer sentir em casa mesmo tão longe.

Minha irmã Glaucia, Babi, meus padrinhos Paulão e Valéria, meus avós Nilton e Darcy, meus primos e tios pela presença constante, incentivo, conselhos e carinho.

Ao meu querido Giuseppe, por todo carinho e apoio diários. Por ser o contrabalanço em momentos de desbalanço, me ouvir e ponderar. Por caminhar ao meu lado com um horizonte amplo e me ajudar a me tornar uma pessoa melhor.

Especialmente aos meus pais, Márcia e Francisco, meus principais incentivadores com apoio incondicional para todas as empreitadas. Em vocês encontro a palavra necessária, na bronca ou no incentivo, para fazer melhor sempre. Essa jornada não seria possível se não fosse por vocês.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão do auxílio financeiro para execução desse trabalho.

” O homem, como um ser histórico
inserido num permanente movimento de procura,
faz e refaz constantemente seu saber”

(Paulo Freire)

SUMÁRIO

Resumo -----	
Abstract-----	
Agradecimentos -----	
SUMÁRIO-----	
LISTA DE FIGURAS-----	
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS-----	
Introdução -----	1
Leucemia Mielóide Crônica-----	3
Resistência a múltiplas drogas -----	5
Biotransformação metabólica-----	6
Redução da sensibilidade a apoptose -----	7
Bombas de efluxo de drogas - Proteínas transportadoras ABC-----	10
Oxisteróis-----	13
7KC e o processo de morte celular -----	17
Objetivo-----	19
Metodologia-----	21
Modelo experimental e a cultura de células -----	22
Avaliação da viabilidade celular -----	22
Tratamentos celulares -----	23
Estudo do processo de morte celular -----	23
Avaliação do processo apoptótico -----	23
Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)-----	24
Estudo da Atividade de caspases-----	24
Estudo da Influência de 7KC na atividade da proteína MDR1 -----	25
Análise do efeito de 7KC na expressão da linhagem celular Lucena -----	25
Caracterizaçãodo perfil de expressão de mRNA através de PCR quantitativo-----	25
Caracterização do perfil de proteínas totais através de espectrometria de massa ----	26
Análise Estatística -----	28
Resultados -----	29

Avaliação da viabilidade celular -----	30
Estudo do processo de morte celular -----	31
Avaliação do processo apoptótico -----	31
Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) -----	34
Estudo da Atividade de caspases -----	35
Estudo do efeito de 7KC no fenótipo de resistência a múltiplas drogas -----	39
Estudo do efeito de 7KC na regulação proteica diferencial da linhagem celular lucena -----	46
Discussão -----	53
Avaliação da Viabilidade Celular -----	55
Estudo do processo de morte celular -----	55
Avaliação do processo apoptótico -----	55
Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) -----	57
Estudo da Atividade de caspases -----	58
Oxisteróis e o estudo da resistência a drogas -----	60
Estudo do efeito de 7KC na regulação proteica diferencial da linhagem celular lucena -----	64
API5 e CDK6 - 7KC pode causar apoptose, parada do ciclo celular e sensibilização a quimioterapia: -----	65
MDR1, DNA-PKcs, ILF2 e ILF3 - 7KC pode causar sensibilização a quimioterapia e morte celular: -----	67
PDI e HSPs- Morte celular e o estresse do retículo endoplasmático -----	68
A utilização de oxisteróis com enfoque terapêutico no tratamento de Leucemias ----	69
Conclusão -----	72
Anexos -----	74
Anexo 1: -----	75
Anexo 2 -----	77
Bibliografia -----	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa de incidência de câncer no Brasil para o ano de 2014 distribuídos entre homens e mulheres	2
Figura 2 - Representação esquemática das principais vias de síntese de oxisteróis envolvendo oxidação enzimática e não enzimática.	15
Figura 3 - 7KC causou redução da viabilidade de maneira concentração-dependente. .	30
Figura 4 - Estudo do processo apoptótico em linhagem K-562 exposta a diferentes concentrações de 7KC	32
Figura 5 - Estudo do processo apoptótico em linhagem Lucena exposta a diferentes concentrações de 7KC	33
Figura 6 - 7KC promove a redução do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) após 24 h de tratamento..	35
Figura 7 - 7KC aumenta o número de células positivas K-562 para atividade de caspases 3/7 e 8.	37
Figura 8 - Estudo da atividade de caspases no processo de morte celular da linhagem MDR Lucena mediado por 7KC.....	38
Figura 9 - Redução da expressão de MDR1 após tratamento com 7KC.	40
Figura 10 - Associação de 7KC diminui a concentração de daunorubicina necessária para redução da viabilidade celular de K-562.....	42
Figura 11-Associação de 7KC diminui a concentração de vincristina necessária para redução da viabilidade celular de K-562.....	42
Figura 12 - Associação de 7KC diminui a concentração de daunorubicina necessária para redução da viabilidade celular de Lucena.....	44
Figura 13 - Associação de 7KC diminui a concentração de vincristina necessária para redução da viabilidade celular de Lucena.....	45
Figura 14- Agrupamento das proteínas diferencialmente expressas de acordo com sua localização celular.....	47
Figura 15 - Agrupamento das proteínas diferencialmente expressas de acordo com sua função molecular.....	48
Figura 16 - Agrupamento das proteínas diferencialmente expressas de acordo com seu envolvimento em processos biológicos.	49

Figura 17 - Rede de interações das proteínas diferencialmente expressas na linhagem celular Lucena após 24 h de tratamento com 7KC.	50
Figura 18 - Distribuição da Expressão diferencial das proteínas identificadas na linhagem celular Lucena após 24h de tratamento com 7KC.	51
Figura 19 - Expressão diferencial média das proteínas identificadas na linhagem celular Lucena após 24h de tratamento com 7KC.....	52
Figura 20 - Representação gráfica do possível papel da redução de API5 e CDK6 em células Lucena tratadas com 7KC.	67

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
.mgf	<i>Mascot generic format</i>
μM	Micro molar
24,25-EC	24(S),25-epoxicolesterol
25-OHC	25-hidroxicolesterol
7-KC	7-cetocolesterol
7β-OHC	7β-hidroxicolesterol
ABC	<i>ATP-Binding Cassete</i>
ABCA1	<i>member 1 of human transporter sub-family ABCA</i>
ABCB1	<i>member 1 of human transporter sub-family ABCB</i>
ABCG1	<i>member 1 of human transporter sub-family ABCG</i>
ABL	<i>Abelson murine leukemia</i>
AIF	Fator indutor de apoptose <i>Apoptosis-inducing factor</i>
ANOVA	Análise de variância
Apaf-1	Protease associada à apoptose 1 <i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
API 5	Fator de inibição da apoptose 5 <i>Apoptosis inhibitor 5</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region protein</i>
Caspase	<i>Cysteine-dependent aspartic acid-directed proteases</i>
CCND1	Ciclina D1 <i>Cyclin D1</i>
Cdk2	Quinase dependente de ciclina 2 <i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CDK4	Quinase dependente de ciclina 4 <i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
CDK6	Quinase dependente de ciclina 6 <i>Cyclin-dependent kinase 6</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
c-FLIP	<i>Cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory protein</i>
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>

CYP	Citocromo P450
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte <i>Death-inducing signaling complex</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>
E2F	<i>Transcription fator family E2F</i>
E2F1	<i>Transcription factor E2F1</i>
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FMK	<i>Fluoromethyl ketone</i>
Grp78	78 kDa glucose-regulated protein
h	Hora
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência <i>High Performance (pressure) Liquid Chromatography</i>
HSP	Proteínas de choque térmico <i>Heat shock protein</i>
hsp70	Proteínas de choque térmico <i>Heat shock protein 70</i>
hsp90	Proteínas de choque térmico <i>Heat shock protein 90</i>
IAP	Proteína inibidoras de apoptose <i>Inhibitors of Apoptosis</i>
IC ₅₀	Metade da concentração Inibitória máxima <i>in vitro</i>
ILF2	<i>Interleukin enhancer-binding factor 2</i>
ILF3	<i>Interleukin enhancer-binding factor 3</i>
INSIG	Genes insulina induzíveis <i>Insulin-inducible genes</i>
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade <i>Low Density Lipoprotein</i>
LMC	Leucemia Mielóide Crônica <i>Cronic Mieloid Leukemia</i>
LXR	<i>Liver X receptors</i>
LXR	<i>Liver X receptors α</i>
LXR	<i>Liver X receptors β</i>
m/z	<i>Molecular mass number/ charge number</i>
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
MDR	Resistência a múltiplas drogas <i>Multidrug Resistance</i>

MDR1	Proteína de resistência a múltiplas drogas <i>multidrug resistance protein 1</i>
<i>MDR1</i>	Gene de resistência a múltiplas drogas <i>multidrug resistance gene 1</i>
Min	Minutos
mM	Milimolar
MOMP	Permeabilização da membrana mitocondrial
MPT	Transição de permeabilidade mitocondrial
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nano-LC-MS/MS	<i>Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORP	<i>OSBP-related protein</i>
ORP4	<i>OSBP-related protein 4</i>
OSBP	<i>Oxysterol binding protein</i>
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
P450	Citocromo P450
p53	Proteína citoplasmática, de massa molecular 53 kDa
PARP	<i>Poly ADP-ribose polymerase</i>
PBS	Tampão fosfato-salino <i>Phosphate buffered saline</i>
PDI	Proteínas disulfeto isomerase
P-gp	p-glicoproteína <i>Permeability glycoprotein</i>
Ph	Cromossomo Filadelfia
pRb	Proteína retinoblastoma
PRKDC	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
Redox	Redução-oxidação
Rho	Rodamina 123 <i>Rhodamine 123</i>
RIP1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RIP3	Receptor-interacting protein kinase 3
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SCAP	Proteína de ativação da clivagem de SREBP <i>SREBP cleavage activating protein</i>

SEM	Erro padrão da média <i>Standard error of the mean</i>
SFB	Soro fetal bovino
Smac /Diablo	Segundo ativador mitocondrial de caspase/Proteína de Ligação-IAP Direta com baixo pI <i>Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI</i>
SREBP	Proteínas de ligação a elementos regulatórios de esteróis <i>Sterol regulatory element binding protein</i>
Stat3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
String	<i>Search tool for the retrieval of interacting genes/proteins</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
U/mL	Unidade por mililitro
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
v/v	Volume por volume
$\Delta\Psi_M$	Variação do potencial de membrana mitocondrial

INTRODUÇÃO

Câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo (1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda. No Brasil, as estimativas para os anos de 2014 e 2015 apontam para a ocorrência de 576 mil casos novos de câncer. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil), enquanto estimam-se cerca de 10 mil casos novos de leucemia. Para o Brasil, no ano de 2014 (2)(Figura1).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%		Homens	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 1 - Estimativa de incidência de câncer no Brasil para o ano de 2014 distribuídos entre homens e mulheres (Exceto câncer de pele não melanoma, adaptado de Incidência de Câncer no Brasil Rio de Janeiro: INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2014)

Apesar do progresso alcançado nas últimas décadas, o risco do desenvolvimento de resistência a quimioterapia permanece um grande obstáculo no sucesso do tratamento dos

diversos tipos de câncer. Nesse cenário, torna-se fundamental a adoção de estratégias efetivas para o controle do câncer através do desenvolvimento de ações aplicadas à prevenção e ao tratamento.

LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, resultante da expansão clonal de uma célula hematopoiética precursora (3). A incidência da LMC representa 15% a 20% dos casos de leucemias dos adultos (4). LMC apresenta um curso de evolução da doença que envolve três fases, baseadas tanto em características clínicas quanto em características patológicas: As fases crônica, acelerada e blástica.

A maioria dos pacientes é diagnosticada na fase crônica, a fase inicial da LMC, que é caracterizada por um aumento de elementos mielóides maduros e imaturos, além de retenção da diferenciação hematopoiética. A doença pode progredir para uma fase acelerada, uma etapa intermediária caracterizada pelo aumento no número de blastos e basófilos circulantes. A fase aguda ou blástica é o estágio final da LMC e apresenta o pior prognóstico (5-7). Apesar de não completamente entendidos, os mecanismos envolvidos na progressão para a fase blástica incluem instabilidade genômica, ativação de vias de sinalização que interrompem a diferenciação mielóide, inibição de genes supressores de tumor e aumento de vias de sobrevivência (5-7).

LMC foi o primeiro câncer humano a associado a anormalidade cromossômica: o cromossomo Filadélfia (Ph), que é resultado de uma translocação balanceada dos braços longos dos cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11)] (8). A justaposição da sequência 3' do proto-oncogene ABL1 a sequência 5' do gene BCR no cromossomo 22 resulta na expressão da proteína quimérica BCR-ABL (9, 10). Esta quimera funciona como tirosina quinase com atividade constitutiva. Foram identificadas três proteínas BCR-ABL distintas

que diferem na extensão da sequência BCR retida na proteína resultante da fusão e são associadas a diferentes tipos de leucemia, sendo P210 BCR-ABL1 um marco molecular da LMC. A localização citoplasmática da oncoproteína BCR-ABL permite acesso a substratos que não eram disponíveis a proteína ABL devido a sua localização nuclear, promovendo a ativação de vias de sinalização de proliferação e sobrevivência (11). A expressão de BCR-ABL determina a transformação da célula progenitora hematopoiética normal em maligna ao permitir a alteração da adesão das células progenitoras as células estromais e a matriz extracelular, provocando o escape da regulação do processo de proliferação. Ao mesmo tempo, promove a manutenção de sinal mitogênico constante por meio das vias RAS e MAP quinase e a resistência a apoptose, culminando no acúmulo de células leucêmicas Ph+ (12). Pacientes com LMC retêm a expressão de BCR-ABL ao longo do curso da doença, sugerindo a importância dessa proteína na manutenção do fenótipo neoplásico mesmo na sua fase avançada (13).

A tirosina quinase BCR-ABL funciona através da ligação com ATP e transfere um grupo fosfato dessa molécula para resíduos de tirosina em uma variedade de substratos. A expressão constitutiva de BCR-ABL nas células LMC proporciona a possibilidade de terapia alvo-orientado com inibidor de tirosina quinase, como mesilato de imatinib. Imatinib funciona através do bloqueio do sítio de ligação da molécula de ATP com a enzima, inibindo assim sua atividade de quinase e impedindo a fosforilação de seus alvos (14).

O tratamento de leucemias Ph positivas expressando BCR-ABL acarreta remissão duradoura em adultos e crianças tratados na fase crônica da doença (15, 16). Enquanto imatinib se mostrou eficiente no tratamento de LMC, particularmente na fase crônica,

até um terço dos pacientes necessitarão de terapias alternativas (17). A efetividade de imatinib diminui durante as fases aguda e blástica, fazendo com que a progressão da doença afete a taxa de resposta dos pacientes a esse inibidor: 80% em fase crônica, 40% para fase acelerada e cerca de 20% durante a crise blástica (18). Essa mudança na taxa de resposta pode estar relacionada à amplificação gênica de BCR-ABL, que pode promover o desenvolvimento de resistência (13), ou ao surgimento de mutações pontuais especialmente no sítio de ligação da droga (18-20).

Atualmente, inibidores de segunda geração, como nilotinib (Tasigna, AMN107; Novartis), são usados no tratamento dos pacientes resistentes. Mas nem sempre são eficientes (17) já que outros mecanismos de resistência não relacionados à estrutura de BCR-ABL podem estar envolvidos, como, por exemplo, a presença de células tronco quiescentes, inibição do influxo de imatinib, mecanismos de efluxo de drogas, alterações decorrentes do grande acúmulo de instabilidade gênica como consequência da fisiologia da doença (21, 22) e o desenvolvimento de um mecanismo conhecido como resistência à múltiplas drogas (MDR), que atualmente representa um dos grandes obstáculos para o sucesso da terapia do câncer.

RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

Resistência a múltiplas drogas (MDR) pode ser definida como o fenômeno multifatorial no qual células de câncer que inicialmente apresentavam resposta ao tratamento exibem resistência cruzada a diversas drogas que, além de não possuírem relação estrutural ou funcional, também podem possuir diferentes alvos moleculares (23). Apesar do processo de proliferação tumoral descontrolada favorecer a expansão clonal, é importante perceber que as células são geneticamente heterogêneas e a própria

exposição da população neoplásica às drogas antitumorais pode representar um fator de seleção para aquelas com capacidade de sobrevivência e crescimento (23).

Células de câncer podem exibir MDR de forma intrínseca ou podem adquirir MDR ao longo da quimioterapia. No evento da MDR intrínseca, as células apresentam características inerentes que permitem a tolerância à quimioterapia na exposição inicial ao tratamento. Enquanto na MDR adquirida ou extrínseca, a resistência ao quimioterápico ocorre ao longo do tratamento ou na recorrência da doença (24-26). O fenótipo MDR também pode ser classificado como clássico e não-clássico. Mecanismos envolvidos em sistemas enzimáticos que não dependem da concentração da droga no interior da célula são denominados não-clássicos. Enquanto os mecanismos clássicos estão relacionados ao transporte da droga (27).

O conhecimento biológico da quimioresistência é complexo. O fenótipo resistente é uma resposta adaptativa das células de câncer e geralmente envolve um ou mais dos seguintes mecanismos: modificações na composição da membrana celular (causando redução da captação da droga); alteração da estrutura do alvo ou da droga; indução de mecanismos de reparo de DNA; inibição da apoptose; e o aumento da expressão das bombas de efluxo de drogas.

BIOTRANSFORMAÇÃO METABÓLICA

O primeiro obstáculo para um composto alcançar o compartimento intracelular é a membrana plasmática. Essas substâncias podem entrar na célula por difusão passiva ou transporte ativo (28, 29). Uma vez no compartimento intracelular, enzimas de metabolismo de drogas são a primeira alternativa para o desenvolvimento de resistência celular através da alteração química da droga. Esse processo envolve enzimas de fase I e fase II. A fase I compreende um conjunto de reações de oxidação, redução e hidrólise que

transforma a molécula tóxica para ser eliminada ou submetida a ação de enzimas de fase II. É realizada principalmente pelas enzimas citocromo P450 (CYPs) e epóxido hidrolases. As CYPs podem estar localizadas na mitocôndria e no retículo endoplasmático, convertem moléculas xenobióticas em epóxidos (metabólitos aromáticos) que têm sua toxicidade reduzida através da ação das epóxido hidrolases, podendo ser processados por enzimas de fase II e expulsos da célula por transportadores de membrana (30).

O envolvimento das CYPs no fenótipo MDR pode estar relacionado à própria atividade de enzimática, uma vez que são enzimas polimórficas, presentes tanto em tecido normal quanto em tumoral, e a expressão de algumas variantes foi considerada relevante no desfecho do tratamento (31, 32). Além disso, de uma maneira geral, os metabólitos produzidos pelas enzimas CYP são melhores substratos para a bomba de efluxo ABCB1 que o composto original, promovendo sua extrusão da célula, reduzindo a eficácia do tratamento (33).

As enzimas de fase II estão envolvidas em reações de conjugação que incluem sulfatação, acetilação, além da conjugação com glutatona. Entre essas enzimas estão sulfotransferases, acetiltransferases e glutatona-S-transferase (GST), que transformam espécies reativas em conjugados metabólicos hidrofóbicos não-tóxicos (34, 35). A presença de modificações nessas enzimas pode resultar na alteração da exposição ao agente quimioterápico. Embora variantes polimórficas de GST tenham sido associadas a uma melhor sobrevida e a redução dos níveis celulares de GST aumente a citotoxicidade de fármacos à base de platina, seu papel na MDR ainda não é bem estabelecida (36, 37).

REDUÇÃO DA SENSIBILIDADE A APOPTOSE

A morte celular é o propósito final da quimioterapia e a interrupção da via de apoptose é um dos maiores obstáculos para obtenção do sucesso no tratamento. A

apoptose pode ser iniciada através de duas vias principais: a via extrínseca ou dos receptores de morte por meio da ativação de receptores de morte em resposta a uma molécula ligante; e a via intrínseca ou mitocondrial envolvendo a liberação de citocromo C (38).

O acionamento dessas vias promove a ativação de uma família de proteases, as caspases, que intermedeia a clivagem de substratos celulares promovendo as mudanças bioquímicas e morfológicas que caracterizam a apoptose. Caspases são expressas como pró-enzimas inativas e, uma vez ativadas podem ativar outras caspases, permitindo um processo de protease em cascada e amplificando a via de sinalização causando morte celular rapidamente. De uma forma geral, as caspases podem ser classificadas em iniciadoras (caspases 2, 8, 9, e 10) e efectoras (caspases 3, 6 e 7) (39). As demais caspases identificadas estão envolvidas na resposta inflamatória (caspases 1, 4 e 5), a apoptose no choque séptico (caspase 11), e a apoptose no retículo endoplasmático (caspase 12) (39-41). Outra característica bioquímica é a assimetria dos fosfolipídeos em associação a externalização de fosfatidilserina na superfície das células apoptóticas que resultam no reconhecimento fagocitário de células apoptóticas por células adjacentes, permitindo a fagocitose rápida sem prejudicar o tecido vizinho.

A via de sinalização extrínseca envolve interações mediadas por receptores transmembrana. Cada receptor possui seu ligante específico e com a conexão do ligante, proteínas citoplasmáticas adaptadoras específicas para o receptor de morte são recrutadas. Por exemplo, a conexão de Fas ligante ao Fas receptor resulta na ligação da proteína adaptadora FADD (42). FADD então se associa a pro-caspase 8 e o complexo de

sinalização indutor de morte (DISC) é formado, resultando na ativação auto-catalítica de caspase 8 (43).

A via de sinalização intrínseca pode iniciar apoptose através de diversos estímulos produzindo sinalização intracelular que agem diretamente em alvos celulares e produzem mudanças na membrana mitocondrial, resultando na transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), perda do potencial transmembrana e a liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço entre membranas para o citosol (44): citocromo C e Smac/DIABLO (45). Essas proteínas ativam a via mitocondrial dependente de caspases. Citocromo C se liga e ativa Apaf-1, assim como caspase 9, formando o apoptossomo (46), enquanto a liberação de Smac/DIABLO promove a apoptose através da inibição das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) (47). Outro grupo de proteínas pró-apoptóticas, AIF e endonuclease G, são liberadas da mitocôndria durante apoptose. Ambas são translocadas para o núcleo onde causam fragmentação no DNA além de condensação da cromatina periférica (48). Tanto AIF quanto endonuclease G funcionam numa maneira dependente de caspase.

O controle e regulação de eventos mitocondriais relacionados a apoptose ocorrem através da família BCL-2, que controlam a permeabilidade de membrana e podem ser tanto pro- ou antiapoptóticos. Alguns membros com perfil antiapoptóticos são Bcl-2, Bcl-x e Bcl-x L, e alguns com perfil pró-apoptótico são Bcl-10, Bax, Bid, Bad (49).

A via intrínseca é o principal alvo para a apoptose induzida por quimioterápicos e qualquer oscilação pode gerar alterações na resposta a quimioterapia. A integridade da membrana mitocondrial é controlada através do equilíbrio entre proteínas pro e antiapoptóticas, como a família Bcl-2. A superexpressão de proteínas antiapoptóticas Bcl-

2/ Bcl-x L, avaliada em pacientes com câncer de mama e leucemia mielóide aguda, foi correlacionada a quimioresistência e baixa sobrevida, enquanto a redução da sua expressão promove uma melhor resposta à droga (50, 51). Entretanto a superexpressão das mesmas proteínas também foi relacionada com a proliferação celular lenta, fator associado a um prognóstico positivo. De forma similar, as correlações relatadas de Bax em amostras clínicas com a resposta a quimioterapia também são conflitantes (52, 53) .

BOMBAS DE EFLUXO DE DROGAS - PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS ABC

As proteínas transportadoras ABC são uma superfamília de proteínas de membrana com 48 membros divididos em sete famílias. Presentes em quase todas as células, possuem um papel biológico importante como transportadores de membrana e moduladores de canais iônicos, responsáveis pela condução de diversas substâncias, utilizando a energia química fornecida pela hidrólise do ATP [revisado em (54)]. A proteção das células e tecidos dos efeitos deletérios de xenobióticos é uma das principais funções fisiológicas dessas proteínas (55). Contudo, essa característica protetora não é considerada benéfica quando o agente xenobiótico em questão é um quimioterápico, e a atividade da proteína impede seu acúmulo e ação nas células de câncer.

ABCB1 foi a primeira proteína identificada em 1974, quando Ling e Thompson descreveram um clone de linhagem celular resistente a colchicina que não permitia a entrada da substância no citoplasma (56). As células selecionadas também apresentavam resistência a actinomicina D e vinblastina. Posteriormente foi mostrado que a principal diferença entre as células originais e o clone resistente era a expressão de uma glicoproteína de 170 KDa chamada P-glicoproteína (P-gp) ou MDR1 (57). A presença de MDR1 foi rapidamente vista como um fator prognóstico negativo que impacta na eficiência de agentes quimioterápicos já que é capaz de reduzir a acumulação intracelular

de drogas com diferentes alvos celulares e estruturas químicas, especialmente moléculas hidrofóbicas catiônicas ou neutras, a níveis inferiores ao limiar terapêutico (58).

Dois outros membros da família ABC, MRP e BCRP, foram caracterizados como bombas de efluxo de drogas capazes de conferir resistência a quimioterapia. MRP foi isolada em células de câncer de pulmão resistentes (37) e possui um espectro de substratos diferente dos transportados por MDR1. Subsequentemente, duas isoformas, MRP1 (ABCC1) e MRP2 (ABCC2), foram identificadas como transportadoras de produtos metabólitos de drogas (por exemplo, conjugados com glutatona). BCRP (ABCG2) foi inicialmente observada em linhagens celulares resistentes a mitoxantrona (59, 60) e, como MDR1, transporta drogas não metabolizadas. A expressão dessas três proteínas pode se tornar elevada em resposta à quimioterapia, já que o tratamento pode exercer uma pressão seletiva na população tumoral. Além disso, o dano celular e a resposta ao estresse foram associados ao aumento da expressão das proteínas transportadoras, fazendo do sucesso inicial da quimioterapia um fator de desenvolvimento de resistência.

A inibição da atividade de MDR1, permitindo o acúmulo intracelular de drogas, é uma forma efetiva de transpor MDR. Diversos compostos moduladores de MDR1, chamados quimiosensibilizadores, foram capazes de reverter o fenótipo MDR como bloqueadores de canal de cálcio (verapamil), hormônios esteroides (tamoxifeno e progesterona), inibidores de proteína quinase (estaurosporina) entre outros (61). Esses moduladores apresentam variados níveis de sucesso na supressão da resistência a drogas *in vitro*, mas sua eficácia e segurança clínica são indesejáveis ou ainda não foram determinadas (61).

A coadministração de quimioterapia convencional e moduladores de MDR é uma estratégia de tratamento potencialmente eficaz. O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no fenótipo de resistência a drogas no tratamento do câncer é essencial para o desenvolvimento de estratégias efetivas, empregando candidatos mais potentes com toxicidade seletiva.

OXISTERÓIS

A terapia contra câncer tradicionalmente utiliza a citotoxicidade como estratégia de tratamento, assumindo que a destruição das células do tumor aperfeiçoa o potencial de sobrevivência do paciente (62). Uma classe de compostos cada vez mais estudada em relação ao seu potencial anticancerígeno são os oxisteróis. Essas moléculas compõem um grupo heterogêneo definido como derivados oxigenados do colesterol. Podem ser produzidas de maneira natural ou sintética, por oxidação enzimática e não enzimática do colesterol (63). Também têm sido objeto de grande atenção no estudo da aterosclerose, principalmente devido a sua presença no tecido aterosclerótico humano (64). A adição de um grupo funcional oxigenado torna a molécula de colesterol mais hidrofílica, reduzindo sua meia-vida e direcionando-a a eliminação ou a oxidações subseqüentes, podendo ser considerada uma via catabólica do colesterol (65, 66).

Alguns dos oxisteróis fisiologicamente mais importantes são produzidos nas células por hidroxilases mitocondriais da superfamília de hemoproteínas citocromo P450 (P450, CYP) (67) (Figura 2). Colesterol 25-hidroxilase não é uma enzima CYP, mas seu produto, 25-hidroxicolesterol (25-OHC), atua como regulador da via SREBP (*sterol regulatory element binding protein*), responsável pela regulação transcricional dependente de colesterol (68). Já 24(S),25-epoxicolesterol (24,25-EC) atua como regulador da homeostase do colesterol na via do mevalonato, sendo produzido em uma proporção constante à produção de colesterol, sugerindo um papel de marcador da síntese de colesterol (69, 70). Além da origem enzimática, oxisteróis podem ser formados por processos oxidativos induzidos por radicais livres, peróxidos lipídicos ou cátions divalentes em uma via denominada auto-oxidação (64). Os principais oxisteróis formados

por essa via são modificados na posição sete do anel B, entre eles 7-cetocolesterol (7-KC) e 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OHC) (66).

Apesar da pequena proporção oxisterol/colesterol aparentar que oxisteróis têm pequeno impacto no papel principal do colesterol na estrutura e função de membranas celulares, estas moléculas têm sido expostas como potentes reguladores de diversas funções biológicas. Os papéis fisiológicos incluem o transporte de esteróis entre tecidos, produtos intermediários na síntese do ácido biliar e a regulação da expressão gênica, atuando como ligantes que promovem a expressão de genes alvo através da ativação de fatores de transcrição. Células podem responder a esses compostos através de diversas vias com distinta seletividade para diferentes oxisteróis. Muitos de seus efeitos biológicos são induzidos através de interações com membros das famílias protéicas OSBP (*Oxysterol binding protein*) e ORP (*OSBP-related protein*). O genoma humano contém pelo menos 12 genes OSBP/ORP e diferentes membros promovem efeitos celulares diversos (71). Por exemplo, ORP8 suprime a expressão do gene ABCA1 em células THP-1 (72), enquanto OSBP aumenta a recirculação dessa proteína transportadora de esteróis em macrófagos J774 (73). Ademais, a família OSBP/ORP também influencia o tráfego celular endossomal (74) e promove interação célula-célula através da interação entre ORP4 e vimentina (75).

Figura 2 - Representação esquemática das principais vias de síntese de oxisteróis envolvendo oxidação enzimática e não enzimática (adaptado de Ruiz *et al.* (54)).

Como moléculas reguladoras, oxisteróis também participam em diversos aspectos do metabolismo lipídico como ligantes de LXR (*Liver X Receptors*). LXR são receptores nucleares expressos em níveis elevados no fígado, tecido adiposo, intestino, rins e macrófagos (LXRα), ou expressos em todos os tecidos (no caso LXRβ) e ativam genes envolvidos no efluxo celular de esteróis (colesterol ou oxisteróis), incluindo *ABCA1* e *ABCG1* (67, 76). Igualmente, oxisteróis assim como colesterol, podem promover a expressão de genes através de SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) em associação com SCAP (*SREBP cleavage activating protein*) e INSIG (*insulin-inducible*

genes), induzindo a expressão de genes envolvidos no acúmulo de colesterol, como o receptor LDL (77). Outro mecanismo pelo qual oxisteróis podem regular funções celulares é através de modificações nas propriedades biofísicas das membranas. Uma mistura complexa de fosfolipídios, esteróis e proteínas forma a estrutura das membranas biológicas. Como a presença de colesterol afeta grande parte de sua função biológica, mesmo pequenas modificações químicas na sua estrutura seriam capazes de alterar mecanismos biofísicos com efeito nas proteínas de membrana (78) e nas propriedades de canais iônicos (79).

Parish e colaboradores (80) observaram que os oxisteróis e seus derivados têm a capacidade de inibir o crescimento e viabilidade de células de hepatoma e linfoma em cultura. Desde então, outros estudos mostraram sua toxicidade em uma variedade de outras células. A exposição a esses compostos pode causar uma variedade de resultados, e esses efeitos incluem: alterações na estrutura da membrana e receptores celulares (81); inibição da biossíntese de colesterol (82) e DNA (83); disfunção mitocondrial (84); e indução da morte celular em linhagens celulares através do aumento do estresse oxidativo, apoptose ou necrose (85).

Recentemente, Carvalho e colaboradores (86) caracterizaram o potencial citotóxico de uma biblioteca de oxisteróis naturais e sintéticos em diversas linhagens celulares. Nesse estudo, 7-cetocolesterol apresentou citotoxicidade intermediária ($IC_{50}=25,7\mu M$) quando comparado a outros oxisteróis como 7 β -hidroxicolesterol ($IC_{50}=6,9\mu M$), cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol ($IC_{50}=12,9\mu M$), 5 α -cholestane-3 β ,6 β -diol ($IC_{50}=12,0\mu M$) e 5 α ,6 α -Epoxy-3 β -hydroxycholestan-7-one ($IC_{50}=14,2\mu M$). No mesmo

trabalho foi demonstrado que, assim como o 7-cetocolesterol, a maioria dos oxisteróis apresentou citotoxicidade também em associação à cisplatina e à doxorubicina.

7KC E O PROCESSO DE MORTE CELULAR

7-cetocolesterol (7KC) é um dos principais produtos da auto-oxidação do colesterol, através da adição de radical cetona no carbono sete. A dupla ligação presente no anel hidrocarbônico B pode ser alvo de radicais livres fazendo a posição sete uma das mais sensíveis a auto-oxidação e como foi relatado anteriormente é capaz de reduzir a viabilidade celular. Muito da toxicidade atribuída aos oxisteróis é derivada da sua habilidade de induzir apoptose. 7KC pode causar morte por apoptose pela via extrínseca, como demonstrado através do tratamento de células musculares lisas da aorta com 7KC e a ativação da via de morte mediada por Fas (1) e mediada por TNFR (2).

Também pode causar morte pela via intrínseca e diferentes moléculas relacionadas a apoptose foram pesquisadas em diversos modelos celulares após tratamento com 7KC. Por exemplo, a liberação de AIF no citosol em linhagem celular de câncer de mama MCF-7, mesmo após incubação com inibidor de caspases, indicando um mecanismo independente de caspases e de permeabilização de membrana mitocondrial (1). Em contraste, em células U937, 7KC induz morte celular associada à liberação de citocromo C e AIF. Múltiplos outros trabalhos descreveram o potencial citotóxico do 7KC (87-90) e sugerem que a toxicidade de oxisteróis pode estar associada à proliferação celular, a redução do potencial de membrana mitocondrial, a liberação do citocromo C e a produção de espécies reativas de oxigênio (89, 91).

Embora a maior parte dos estudos relate que 7KC induz morte celular por apoptose, Monier e colaboradores sugeriram que 7-cetocolesterol induz uma forma complexa de morte celular chamada de oxiapoptofagia, que combina características de

oxidação, apoptose e autofagia (92), caracterizada pelo aumento da permeabilidade da membrana, fragmentação e/ou condensação do núcleo, produção reduzida de óxido nítrico, e dano oxidativo ao DNA. Essa forma característica de morte celular foi posteriormente confirmada por Nury e colaboradores, que descreveram a redução da proliferação celular, redução do metabolismo mitocondrial, ativação de caspase 3, degradação de PARP e redução da expressão de Bcl-2 (93).

Uma grande dificuldade é a falta de seletividade para células neoplásicas e a possibilidade de causar efeitos colaterais severos nas células saudáveis. Poucos estudos relatam experimentos realizados com oxisteróis em células normais, entretanto oxisteróis parecem não ser tóxicos nas concentrações que seriam citotóxicas ou citostáticas para linhagens celulares de câncer (94).

Todas essas diferenças estão em consonância com estudos que relatam que a via de morte induzida por oxisteróis pode depender do modelo biológico utilizado (95). A maior elucidação dos mecanismos celulares induzidos por oxisteróis pode contribuir para o aumento do conhecimento do seu comportamento biológico sozinho e em associação a outras drogas convencionais.

OBJETIVO

O objetivo geral desse trabalho é estudar o efeito de 7-cetocolesterol em um modelo de leucemia mielóide crônica com fenótipo de resistência à múltiplas drogas. Esse objetivo pode ser desdobrado em:

- Avaliar o efeito de 7-cetocolesterol na viabilidade celular de células resistentes ou não a quimioterapia tradicional;

- Avaliar a capacidade de 7-cetocolesterol induzir morte celular com características típicas de apoptose em linhagem celular sensível e com fenótipo MDR;

- Avaliar o efeito de 7-cetocolesterol na modulação do fenótipo MDR e sua possível utilização em associação a quimioterápicos tradicionais *in vitro*;

- Investigar o mecanismo biológico de 7-cetocolesterol como modulador do fenótipo de resistência à múltiplas drogas através de uma abordagem proteômica abrangente.

METODOLOGIA

MODELO EXPERIMENTAL E A CULTURA DE CÉLULAS

Como modelo de estudo de resistência múltipla a drogas em leucemia mielóide crônica foram utilizadas as linhagens celulares K-562 e Lucena, cedidas pela Dra. Vivian Rumjanek do Laboratório de Imunologia Tumoral, Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ. A linhagem parental K-562 não apresenta fenótipo de resistência múltipla a drogas (MDR) e originou a linhagem MDR Lucena através da exposição ao quimioterápico Vincristina (96).

As suspensões celulares foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina-estreptomicina, 35.7 mM de NaHCO_3 (Sigma-Aldrich) e 20 mM de Hepes (Sigma-Aldrich), em garrafas de superfície não aderente em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5,0% de CO_2 . Para a manutenção da linhagem Lucena foi também adicionado 60 nM de sulfato de vincristina (Sigma-Aldrich). Em ambos os casos o meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias.

AValiação DA VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método colorimétrico de MTT. Foram incubadas 1×10^4 células por poço com diversas concentrações de colesterol (100 a 0,01 μM), 7-cetocolesterol (100 a 0,01 μM), daunorubicina (20 a 0,125 μM) e vincristina (20 a 0,125 μM). Posteriormente aos determinados períodos de incubação, foi adicionado 1.2 mM de reativo de MTT e após 4 h em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5,0% de CO_2 , os cristais formados foram solubilizados com a adição de isopropanol (50% v/v). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada por meio da comparação do acúmulo de formazan entre células tratadas e não tratadas, utilizando espectrofotômetro com filtro de 570 nm.

O método colorimétrico de MTT também foi empregado para o estudo do efeito da exposição simultânea das linhagens celulares a 7KC e daunorubicina ou vincristina. As células foram incubadas com diversas concentrações de daunorubicina (20 a 0,125 μ M) e vincristina (20 a 0,125 μ M) em associação a 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M de 7KC para K-562, enquanto a linhagem resistente Lucena foi exposta a 75 μ M, 125 μ M e 150 μ M.

TRATAMENTOS CELULARES

Após os ensaios de viabilidade celular foram determinadas as concentrações de 7KC utilizadas para o estudo do processo de morte celular. Enquanto a linhagem sensível K-562 foi exposta a 25 μ M, 50 μ M e 75 μ M de 7KC, a linhagem resistente Lucena foi exposta a 75 μ M, 125 μ M e 150 μ M do mesmo oxisterol. Para os estudos da atividade proteica e expressão gênica, foi utilizado 7KC 75 μ M para linhagem Lucena.

As soluções de oxisterol e colesterol foram preparadas em meio RPMI suplementado com 10% (v/v) SFB, 35.7 mM de NaHCO_3 (Sigma-Aldrich) e 20 mM de HEPES (Sigma-Aldrich) e os períodos de incubação foram realizados em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5,0% de CO_2 . Todos os tratamentos foram realizados em 3 experimentos independentes.

ESTUDO DO PROCESSO DE MORTE CELULAR

AVALIAÇÃO DO PROCESSO APOPTÓTICO

Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit II (BD Biosciences) foi utilizado no estudo de eventos apoptóticos e detecção de necrose, segundo instruções do fabricante. Após o tratamento, conforme descrito anteriormente, por 2, 4, 6 e 24 h, as células foram ressuspensas em tampão de ligação, incubadas com FITC-Annexin V/PI (1:1, v/v) a temperatura ambiente no escuro por 30 min. O núcleo das células foi contrastado com Hoechst 33342 (Molecular Probes®) por 30 min. Os ensaios foram avaliados em

microscópio de fluorescência ImageXpress Micro High Content System (Molecular Devices). Nove sítios de cada experimento independente realizado em duplicata foram analisados utilizando o software MetaXpress (Molecular Devices).

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$)

BD™ MitoScreen Kit (BD Biosciences) foi utilizado para avaliar o potencial de membrana mitocondrial, segundo instruções do fabricante. Após o tratamento por 24 h, conforme descrito anteriormente, as células foram ressuspensas em solução de trabalho JC-1 e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5,0% de CO₂ por 15 min. Após ressuspensas em PBS, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACScan, BD Biosciences) através do software BD CellQuest™ (BD Biosciences)

ESTUDO DA ATIVIDADE DE CASPASES

Image-iT™ LIVE Green Caspase-3 and -7 Detection Kit (Molecular Probes®) e Image-iT™ LIVE Green Caspase-8 Detection Kit (Molecular Probes®) foram utilizados para estudar a atividade das caspases 3/7 e 8, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. Após o tratamento, conforme descrito anteriormente, por 2, 4, 6, 12 e 24 h, o reagente FLICA específico de cada kit foi adicionado e as células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5,0% de CO₂ por 60 min. Em seguida, as células foram ressuspensas e o núcleo foi contrastado com Hoechst 33342 (Molecular Probes®) por 30 min e fixadas. Os experimentos foram avaliados em microscópio de fluorescência ImageXpress Micro High Content System (Molecular Devices). Nove sítios de cada experimento independente realizado em triplicata foram analisados utilizando o software MetaXpress (Molecular Devices).

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE 7KC NA ATIVIDADE DA PROTEÍNA MDR1

Para o estudo da atividade da proteína MDR1 foi analisado o acúmulo intracelular de rodamina 123 (Rho) e Daunorrubicina (DNR) na presença e ausência de 7KC

Para este ensaio 1×10^5 células foram incubadas por 24 h, com e sem exposição previa a 7KC (75 μ M) ou verapamil (100 μ M), ressuspensas em sequencia e incubadas com em meio RPMI com Rho ou DNR 600 μ g/mL por 1 h a 37 °C, permitindo o acúmulo dos substratos no interior das células. Em seguida o meio de cultura foi retirado, e as células incubadas por 3 h a 37 °C em RPMI para que ocorresse a extrusão parcial dos compostos fluorescentes. Após ressuspensas em PBS, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACScan, BD Biosciences) através do software BD CellQuest™ (BD Biosciences)

ANÁLISE DO EFEITO DE 7KC NA EXPRESSÃO DA LINHAGEM CELULAR LUCENA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MRNA ATRAVÉS DE PCR QUANTITATIVO

Para avaliação da expressão de mRNA através de PCR quantitativo as linhagens celulares foram incubadas com ou sem 75 μ M 7-KC por 24 h. A extração de ácido ribonucleico (RNA) total foi realizada usando 1,0 mL de TRIzol® (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) e a qualidade foi determinada utilizando a razão das absorbâncias em 260 nm e 280 nm. O DNA complementar (cDNA) foi preparado a partir 1,0 μ g do RNA total utilizando com RQ1 RNase-free DNase (Promega) seguido de High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), de acordo com a instrução dos fabricantes. A eficiência de amplificação de todos os iniciadores e variação da expressão gênica nas diferentes condições experimentais foram avaliadas utilizando SYBR Green® PCR Master Mix (Applied

Biosystems)em 7500 Fast system (Applied Biosystems)empregando o método descrito por Livak e Schmitt(97). As sequências dos iniciadores utilizados nesse estudo estão listadas na tabela 1

Tabela 1 - Sequencia dos iniciadores pra genes humanos utilizados nesse estudo.

Genes	Iniciadores
MDR1	CCCATCATTGCAATAGCACC
	GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA
B2M	ACCCCCACTGAAAAAGATGA
	ATCTTCAAACCTCCATGATG

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE PROTEÍNAS TOTAIS ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

Para avaliação do perfil de expressão protéico diferencial, a linhagem celular Lucena foi incubada com ou sem 75 μ M de 7-KC por 24 h. Após a retirada do meio de cultura, as proteínas foram extraídas em tampão 8M Urea combinado a inibidores de proteases e quantificadas utilizando o método de Bradford. As proteínas foram digeridas usando tripsina após a redução de ligações dissulfeto e tióis de alquilação. Os peptídeos resultantes foram dessalinizados com colunas C18 antes da análise LC-MS/MS.

Os peptídeos foram separados por nano-LC-MS/MS em coluna Reprosil-Pur C18-AQ (3 μ m) usando Easy-LC nano-HPLC (Thermo Scientific). O gradiente de HPLC foi de 0 à 34% em solvente B (A= 0.1% de ácido fórmico, B= 90% ACN, 0,1% de ácido fórmico) por 120 minutos em um fluxo de 250 nL/min. A análise de massa foi realizada usando LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Uma varredura da espectrometria de massa (400-2000 m/z) foi registrada no Orbitrap numa resolução de 30 000 a 400 m/z para um alvo de 10⁶ íons. Os 15 íons mais intensos obtidos por aquisição dependente de dados através de dissociação induzida por colisão (CID, *collision-induced dissociation*) MS/MS foram analisados pelo LTQ Orbitrap XL. Os parâmetros para a aquisição de CID foram: tempo de

ativação: 15 ms; energide normalização: 35; O-ativação: 0.25; exclusão dinâmica: ativado com repetição de contagem 1; duração da exclusão: 30s e limiar de intensidade= 10000, íons alvo = 2^4 .

Os arquivos obtidos foram analisados usando o software Proteoma Discoverer v1.4 (Thermo Scietific). O espectro MS/MS foi convertido para o formato .mgf e pesquisado no banco de dados “SwissProtHuman database” usando software Sequest Search Engine. Os parâmetros de busca no banco de dados foram estabelecidos conforme exemplo: MS/MS massa de tolerância 0.6 Da (CID data). Sequências de peptídeos compartilhados foram agrupados como proteína de acessões agrupada. Taxas de detecção falsa foram realizadas utilizando o algoritmo de Percolator com q menor igual a 0,01.

A quantificação relativa foi realizada utilizando software Proteoma Discoverer usando cromatograma de íon extraído (XIC - *extracted ion chromatogram*). A análise quantitativa foi realizada utilizando valores log2 das intensidades avaliadas e os dados foram normalizados em relação a proporção mediana do peptídeo. A quantificação foi feita considerando apenas proteínas com 3 ou mais peptídeos. Cada amostra foi analisada em triplicata biológica e replicata experimental. Proteínas ou peptídeos significativamente regulados nas triplicatas biológicas foram determinados e a razão entre amostra tratada e controle foi calculada.

As proteínas diferencialmente reguladas foram analisadas com Gene Ontology empregando o software ProteinCenter (Thermo). Interações proteína-proteína e redes de interação foram construídas utilizando software String.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism®. Para os ensaios de avaliação de morte celular por Anexina V/PI e Caspases foi utilizado análise de variância agrupada, seguida do teste de Bonferroni. Para os demais experimentos foi utilizado análise de variância seguida do teste de Dunnett. Para avaliar a linearidade das respostas obtidas foi feito teste secundário para linear trend.

RESULTADOS

AValiação DA VIABILIDADE CELULAR

Os efeitos *in vitro* de colesterol e 7-cetocolesterol (7KC) foram estudados através de ensaio de MTT. Nesses ensaios, a viabilidade e proliferação celulares são avaliadas através da atividade metabólica mitocondrial das células. A linhagem celular K-562 tratada com diversas concentrações de 7KC apresentou redução da viabilidade celular tanto em 24 h ($IC_{50}=60,43 \pm 3,08 \mu M$) quanto em 48 h ($IC_{50}= 71,08 \pm 12,42 \mu M$). Embora a linhagem multirresistente Lucena tenha mostrado redução da viabilidade celular em 24 e 48 h, as concentrações de 7KC necessárias para obtenção de 50% de inibição ($IC_{50}=103,87 \pm 1,64$ e $102,14 \pm 0,99 \mu M$, respectivamente) foram superiores aos observados para a linhagem parental (Figura3). Enquanto colesterol não apresentou toxicidade em nenhuma concentração testada.

Figura 3 - 7KC causou redução da viabilidade de maneira concentração-dependente. Avaliação da viabilidade celular das linhagens K-562 (A) e Lucena (B) expostas a diversas concentrações de colesterol e 7KC. Células foram expostas a diversas concentrações dos compostos por 24 h e 48 h e seu efeito na viabilidade celular foi avaliado através da capacidade de redução do reagente MTT. O ensaio foi realizado em triplicatas independentes. Os dados são a porcentagem média de células em relação aos controles $\pm$ SEM.

ESTUDO DO PROCESSO DE MORTE CELULAR

AVALIAÇÃO DO PROCESSO APOPTÓTICO

O estudo da morte por apoptose e/ou necrose foi realizado por meio da detecção da exposição de fosfatidilserina empregando a marcação com anexina V e da internalização de iodeto de propídeo após tratamento com o oxisterol. Exposição de K-562 a 7KC foi capaz de desencadear apoptose precoce especialmente com a utilização de 50 e 75 μM por 24 h ($80,21\% \pm 0,98$ e $77,13\% \pm 3,40$, respectivamente). As condições em que K-562 apresentaram apoptose tardia foram com os tratamentos de 50 μM por 2 h ($23,2\% \pm 2,8$) além de 25 μM por 4 h ($19,04 \pm 4,45$) e 75 μM por 6 h ($29,08 \pm 0,43$) (Figura 4).

K-562

Figura 4 - Estudo do processo apoptótico em linhagem K-562 exposta a diferentes concentrações de 7KC, 25 μM (A), 50 μM (B) e 75 μM (C) por 2,4, 6, e 24 h. Foi considerado apoptose precoce a externalização de fosfatidilserina, necrose a permeabilidade da membrana a iodeto de propídeo e apoptose tardia a detecção ambos eventos simultaneamente. Em todas as concentrações foi possível observar a indução do processo apoptótico nos períodos de tempo avaliados. 7KC 50 e 75 μM foram capazes de induzir o maior número de células apoptóticas após 24h de exposição. Ensaios foram realizados em triplicatas independentes. Dados são % média ± SEM. Estrelas indicam $p < 0,05$.

De forma semelhante, 7KC foi capaz de desencadear processo apoptótico na linhagem celular Lucena (Figura 5), especialmente após 24 h na concentração 150 μ M ($77,24\% \pm 2,12$). As condições que apresentaram maior porcentagem de apoptose tardia foram as concentrações 75, 125 e 150 μ M em intervalo de tempo de 4 h ($23,92\% \pm 0,24$, $24,26\% \pm 2,5$ e $20,5\% \pm 2,0$, respectivamente).

Em nenhuma das avaliações foi possível observar alta frequência de células em processo de necrose, evidenciada pela internalização de iodeto de propídeo, indicando também que as células analisadas se encontravam integras.

Lucena

Figura 5 - Estudo do processo apoptótico em linhagem Lucena exposta a diferentes concentrações de 7KC, 75 μ M (A), 125 μ M (B) e 150 μ M (C) por 2, 4, 6, e 24 h. Foi

considerado apoptose precoce a externalização de fosfatidilserina, necrose a permeabilidade da membrana a iodeto de propídeo e apoptose tardia a detecção ambos eventos simultaneamente. Embora em todas as concentrações tenha sido possível observar a indução do processo apoptótico nos períodos de tempo avaliados, 7KC 125 e 150 μ M foram capazes de induzir o maior número de células apoptóticas precoce e tardia. Ensaios foram realizados em triplicatas independentes. Dados são % média $\pm$ SEM. Estrelas indicam $p < 0,05$.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)

A variação do potencial de membrana mitocondrial da linhagem celular K-562 foi avaliada após a exposição a 25, 50 e 75 μ M de 7KC por 24h. Todas as concentrações testadas na linhagem parental k-562 levaram a uma redução do $\Delta\Psi_m$, sendo essa redução menos pronunciada na menor concentração testada 25 μ M ($0,37 \pm 0,12$) e mais pronunciada com o aumento da concentração de 50 μ M ($0,27 \pm 0,11$) para 75 μ M ($0,16 \pm 0,06$), sugerindo um efeito dose dependente (Figura 6,A).

Também foi possível observar redução do potencial de membrana mitocondrial na linhagem resistente Lucena após exposição a 7KC em todas as concentrações testadas. Embora a menor concentração testada (75 μ M) tenha apresentado uma redução de $\Delta\Psi_m$ menos pronunciada ($0,4 \pm 0,09$), as concentrações 100 e 150 μ M apresentaram valores semelhantes ($0,17 \pm 0,10$ e $0,20 \pm 0,09$, respectivamente) (Figura 6,B).

Figura 6 - 7KC promove a redução do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) após 24 h de tratamento. Avaliação da variação do $\Delta\Psi_m$ em linhagens K-562 (A) e Lucena (B) após 24 h de exposição a diversas concentrações de 7KC. Embora em todas as concentrações tenha sido possível observar a indução do processo apoptótico nos períodos de tempo avaliados, K-562 exposta a 7KC 75 μ M e Lucena exposta a 100 e 150 μ M apresentaram a maior variação de $\Delta\Psi_m$ em relação ao controle. Ensaios foram realizados em triplicatas independentes. Dados são Intensidade média de fluorescência $\pm$ SEM. Todos os valores apresentam $p < 0,05$ em relação ao controle. Estrelas indicam $p < 0,05$.

ESTUDO DA ATIVIDADE DE CASPASES

Para obter um melhor entendimento sobre os eventos de morte celular mediados pela exposição a 7KC, o processo de apoptose foi posteriormente estudado através do ensaio de atividade das caspases 3/7 e 8. Na linhagem K-562, a proporção de células que apresentavam atividade de caspases 3/7 e 8 foi superior ao controle em todos os tempos e concentrações avaliadas em extensão semelhante, sendo a maior porcentagem para caspase 3/7 observada após incubação por 6 h com 75 μ M ($29,23\% \pm 0,93$) e para caspase

8 após 24 h com 75 μ M de 7KC ($41,03\% \pm 0,44$), como pode ser observado nas Figuras 7, A e C.

Contudo, quando a atividade dessas enzimas é considerada, não foi possível observar atividade em todas concentrações e tempos de exposição de maneira semelhante como exposto acima. Com a avaliação da atividade das caspases 3/7, somente é possível observar um aumento em relação ao controle após 24 h de exposição com 7KC 25 μ M ($1,22 \pm 0,12$), 2, 6 e 24 h com 50 μ M ($1,16 \pm 0,07$; $1,16 \pm 0,047$ e $1,24 \pm 0,06$, respectivamente), e também após 6 e 24 h com 75 μ M ($1,16 \pm 0,03$ e $1,29 \pm 0,015$, respectivamente), conforme indicado na Figura 7 B.

Em relação a caspase 8, um aumento da atividade enzimática em relação ao controle pode ser mensurado após 24 h de exposição com 7KC 25 μ M ($1,35 \pm 0,009$), após 6, 12 e 24 h com 7KC 50 μ M ($1,06 \pm 0,009$; $1,13 \pm 0,003$ e $1,30 \pm 0,007$, respectivamente), e após 12 e 24 h com 75 μ M ($1,19 \pm 0,06$ e $1,37 \pm 0,015$, respectivamente), conforme indicado na Figura 7 D.

Já a linhagem com fenótipo MDR somente apresentou células com caspases ativas em relação ao controle após 24 h de incubação. Com o estudo das caspases 3/7, somente foi observado o aumento da proporção de células com caspases ativas após exposição a 7KC 125 e 150 μ M por 24 h ($25,18 \pm 0,41$ e $15,07 \pm 0,10$, respectivamente. Figura 8 A). Esse aumento foi acompanhado por um aumento na atividade dessas enzimas, mas não nas mesmas proporções ($1,17 \pm 0,07$ e $1,29 \pm 0,02$, respectivamente. Figura 8 B). Já com a avaliação da caspase 8, foi possível observar um aumento na proporção de células após 24 h de tratamento com 7KC 75 e 150 μ M ($14,48 \pm 0,39$ e

19,95 $\pm$ 0,44, respectivamente. Figura 8 C). Enquanto a atividade da enzima só foi observada após 24 h de exposição a 7KC 150 μ M (1,22 $\pm$ 0,009. Figura 8 D).

K-562

Figura 7 - 7KC aumenta o número de células positivas K-562 para atividade de caspases 3/7 e 8. Estudo da atividade de caspases no processo de morte celular da linhagem K-562 mediado pela exposição a 7KC 25 μ M, 50 μ M ou 75 μ M por intervalos de 2 a 24 h. Após

o tratamento, a atividade das caspases 3/7 e 8 foram avaliadas através da fluorescência emitida na clivagem de seus substratos específicos empregando análise celular multiparamétrica automatizada (High Content Analysis). Experimentos realizados em triplicatas independentes. Estrelas indicam $p < 0,05$ para as diferenças comparadas. Dados são média $\pm$ SEM.

Lucena

Figura 8 - Estudo da atividade de caspases no processo de morte celular da linhagem MDR Lucena mediado por 7KC. As células foram submetidas à exposição a 7KC 25 µM, 50 µM

ou 75 μ M por intervalos de 2 a 24 h. Após o tratamento, a atividade das caspases 3/7 e 8 foram avaliadas através da fluorescência emitida na clivagem de seus substratos específicos empregando análise celular multiparamétrica automatizada (*High Content Analysis*). Experimentos realizados em triplicatas independentes; Estrelas indicam $p < 0,05$ para as diferenças comparadas. Dados são média $\pm$ SEM.

ESTUDO DO EFEITO DE 7KC NO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

A expressão de *MDR1* da linhagem celular Lucena foram avaliadas por PCR quantitativo utilizando o método de quantificação relativa (97). Foi observado que 7KC foi capaz de reduzir a expressão de mRNA de *MDR1* ($0,658 \pm 0,09$ em relação ao controle) após 24 h de incubação (Figura 9, A). Também foi possível observar a redução da expressão da proteína *MDR1* no mesmo período de incubação ($1851208 \pm 1,5$ area sob a curva, uma redução de 52% em relação ao controle) (Figura 9, B).

A atividade da P-glicoproteína (*MDR1*) também foi avaliada através de ensaios de função da bomba, que mede a sua capacidade de acúmulo/efluxo de substratos fluorescentes. O tratamento com 7KC foi capaz de promover um maior acúmulo de rodamina 123 na linhagem Lucena tratada ($2,084 \pm 0,26$) em relação ao controle (Lucena sem tratamento). Tratamento com inibidor da atividade de P-gp Verapamil também foi capaz de promover acúmulo ($3,27 \pm 0,37$). Mas nenhum dos tratamentos promoveu acúmulo na ordem de grandeza observado na linhagem parental K-562 ($28,10 \pm 6,6$) (Figura 9, C).

7KC também foi capaz de promover maior acúmulo da antraciclina daunorubicina em células tratadas ($2,45 \pm 0,15$) em relação ao controle sem tratamento. O tratamento com o inibidor verapamil também foi avaliado mas, nesse caso, não apresentou diferença significativa ($1,41 \pm 0,06$). Assim como observado nos resultados obtidos com Rodamina

123, o acúmulo apresentado pela linhagem k-562 ($31,90 \pm 2,9$) foi superior ao observado em qualquer tratamento da linhagem Lucena (Figura 9, D).

Figura 9 - Redução da expressão de MDR1 após tratamento com 7KC. Linhagem celular Lucena foi exposta a 75 μ M de 7KC por 24 h e a expressão de mRNA foi avaliada por qPCR (A). A expressão proteica foi avaliada por nLC-MS/MS (B). Para caracterizar o efeito funcional de 7KC sobre MDR1, foi realizado ensaio de acúmulo/efluxo utilizando dois substratos fluorescentes de MDR1: rodamina 123 (C) e daunorubicina (D). Em ambos os casos foram utilizados como controle a linhagem parental K-562 sem tratamento e Lucena tratada com 100 μ M de Verapamil, um inibidor de P-gp. Todos os resultados foram expressos em relação a linhagem Lucena sem tratamento (Controle), Experimentos realizados em triplicatas independentes; Estrelas indicam $p < 0,05$ para as diferenças comparadas. Dados são média $\pm$ SEM.

O efeito *in vitro* de 7KC sobre a viabilidade celular foi avaliada através de ensaio de MTT em combinação com diversas concentrações dos quimioterápicos daunorubicina e vincristina. Foi observado que K-562 é mais susceptível a daunorubicina que a vincristina, porém, em ambos os casos, o tratamento com 50 e 75 μM de 7KC foi capaz de reduzir a concentração mínima necessária dos dois quimioterápicos para reduzir a viabilidade celular em mais de 50% (Figura 10 e Figura 11).

K-562

Figura 10 - Associação de 7KC diminui a concentração de daunorubicina necessária para redução da viabilidade celular de K-562. Avaliação da viabilidade celular da linhagem K-562 exposta a diversas concentrações de daunorubicina (A) e daunorrubicina em associação a 25 μ M (B), 50 μ M (C) e 75 μ M (D) de 7KC. Células foram expostas ao tratamento por 48 h e seu efeito na viabilidade celular foi avaliado através da capacidade de redução do reagente MTT. Ensaios realizados em triplicats independentes. Os dados são a porcentagem média de células em relação aos controles $\pm$ SEM.

K-562

Figura 11- Associação de 7KC diminui a concentração de vincristina necessária para redução da viabilidade celular de K-562. Avaliação da viabilidade celular da linhagem K-562 exposta a diversas concentrações de vincristina (A) e vincristina em associação a 25 μ M (B), 50

μM (C) e $75 \mu\text{M}$ (D) de 7KC. Células foram expostas ao tratamento por 48 h e seu efeito na viabilidade celular foi avaliado através da capacidade de redução do reagente MTT. Ensaios realizados em triplicatas independentes. Os dados são a porcentagem média de células em relação aos controles $\pm$ SEM.

A viabilidade celular também foi avaliada durante o tratamento com diversas concentrações dos quimioterápicos daunorubicina e vincristina de forma isolada ou em associação a 75, 125 ou $150 \mu\text{M}$ no caso de Lucena. Pudemos observar que o efeito de redução da viabilidade celular desses compostos é potencializado pelo co-tratamento com 7KC em concentrações em torno de IC_{50} , sendo capaz de reduzir a concentração mínima necessária dos dois quimioterápicos para reduzir a viabilidade celular em mais de 50% (Figura 12 e Figura 13).

Lucena

Figura 12 – Associação de 7KC diminui a concentração de daunorubicina necessária para redução da viabilidade celular de Lucena. Avaliação da viabilidade celular da linhagem Lucena exposta a diversas concentrações de daunorubicina (A) e daunorubicina em associação a 75 μM (B), 125 μM (C) e 150 μM (D) de 7KC. Células foram expostas ao tratamento por 48 h e seu efeito na viabilidade celular foi avaliado através da capacidade de redução do reagente MTT. Ensaios realizados em triplicats independentes. Os dados são a porcentagem média de células em relação aos controles $\pm$ SEM.

Lucena

Figura 13 – Associação de 7KC diminui a concentração de vincristina necessária para redução da viabilidade celular de Lucena. Avaliação da viabilidade celular da linhagem Lucena exposta a diversas concentrações de vincristina (A) e vincristina em associação a 75 μM (B), 125 μM (C) e 150 μM (D) de 7KC. Células foram expostas ao tratamento por 48 h e seu efeito na viabilidade celular foi avaliado através da capacidade de redução do reagente MTT. Os dados são a porcentagem média de células em relação aos controles $\pm$ SEM.

ESTUDO DO EFEITO DE 7KC NA REGULAÇÃO PROTEICA DIFERENCIAL DA LINHAGEM CELULAR LUCENA

Para obter um melhor entendimento sobre as consequências do tratamento com 7KC na linhagem MDR Lucena foi avaliada a regulação proteica diferencial utilizando análise proteômica quantitativa livre de marcadores. Foi possível observar um total de 1988 proteínas, das quais 959 apresentavam 3 ou mais peptídeos identificadores e 428 se encontravam diferencialmente reguladas. O critério utilizado para selecionar as proteínas reguladas após o tratamento com 7KC foi: (1) razão entre tratamento e controle maior ou igual a 2, para as proteínas mais expressas (“up-regulated”); e (2) razão entre tratamento e controle menor ou igual a 0,5 para as proteínas menos expressas (“downregulated”). A lista com as proteínas diferencialmente reguladas pode ser encontrada no anexo 2.

Seguindo as recomendações do Gene Ontology Consortium (98), as proteínas diferencialmente reguladas foram agrupadas em três ontologias diferentes, de acordo com a sua localização celular (Figura 14), atividade bioquímica (Figura 15) e processo biológico (Figura 16). Essas associações permitem uma distribuição funcional da base de dados, mesmo havendo redundância na categorização das proteínas, visto que podem ter mais de uma localização celular, assim como podem desempenhar mais de uma função biológica.

Figura 14-Agrupamento das proteínas diferencialmente expressas de acordo com sua localização celular. Proteínas diferencialmente expressas na linhagem celular Lucena após 24 h de tratamento com 7KC foram agrupadas de acordo com sua localização celular utilizando Protein Center Software de acordo com Gene Ontology Consortium (<http://geneontology.org/>).

Figura 15 - Agrupamento das proteínas diferencialmente expressas de acordo com sua função molecular. Proteínas diferencialmente expressas na linhagem celular Lucena após 24 h de tratamento com 7KC foram agrupadas de acordo com suas funções moleculares utilizando Protein Center Software de acordo com Gene Ontology Consortium (<http://geneontology.org/>).

Figura 16 - Agrupamento das proteínas diferencialmente expressas de acordo com seu envolvimento em processos biológicos. Proteínas diferencialmente expressas na linhagem celular Lucena após 24 h de tratamento com 7KC foram agrupadas de acordo com seu envolvimento em processos biológicos utilizando Protein Center Software de acordo com Gene Ontology Consortium (<http://geneontology.org/>).

As proteínas diferencialmente expressas foram analisadas utilizando o software STRING a fim de determinar sua rede de interações (Figura 17). Como as interações preditas podem ser diretas ou indiretas, essa abordagem permitiu a classificação de acordo com interações físicas e funcionais nas seguintes categorias: (1) Fatores de alongamento; (2) Proteínas ribossomais (3) Fosfatases (4) tRNA. (5) Metabolismo do ATP; (6) Enzimas Redox; (7) Proteínas de choque térmico (HSP) (8) Proteassomos; (9) NEDDilação Proteica (10) Agrupamento de Stat3, MAPK 1 e Anexina 1; (11) Histonas e (12) Ribonuclear.

Figura 17 - Rede de interações das proteínas diferencialmente expressas na linhagem celular Lucena após 24 h de tratamento com 7KC. As proteínas mais expressas e menos expressas em relação ao controle foram agrupadas de acordo com sua função descrita e relação com demais proteínas avaliadas. Os traços mais espessos indicam relações mais fortes. Grupos identificados: (1) Fatores de alongamento; (2) Proteínas ribossomais (3) Fosfatases (4) tRNA. (5) Metabolismo do ATP; (6) Enzimas Redox; (7) Proteínas de choque térmico (HSP) (8) Proteassomos; (9) NEDDilação Proteica (10) Agrupamento de Stat3, MAPK 1 e Anexina 1; (11) Histonas e (12) Ribonuclear. Os agrupamentos foram gerados utilizando o software STRING (string-db.org).

Seguindo as mesmas categorias, foi analisada a distribuição da expressão diferencial das proteínas agrupadas. A Figura 18 mostra cada proteína em um ponto do gráfico, associada a sua própria variação na expressão em relação ao controle. Enquanto a figura 19 mostra a variação média da expressão proteica nos agrupamentos.

Figura 18 - Distribuição da Expressão diferencial das proteínas identificadas na linhagem celular Lucena após 24h de tratamento com 7KC. As proteínas mais expressas e menos expressas em relação ao controle foram agrupadas de acordo com seu relacionamento na rede de proteínas. Os agrupamentos foram gerados utilizando o software STRING (string-db.org).

Figura 19 - Expressão diferencial média das proteínas identificadas na linhagem celular Lucena após 24h de tratamento com 7KC. Média das proteínas mais expressas e menos expressas em relação ao controle, as quais foram agrupadas de acordo com seu relacionamento na rede de proteínas. Os agrupamentos foram gerados utilizando o software STRING (string-db.org).

DISCUSSÃO

Resistência múltipla a drogas é um fenômeno multifatorial que causa falha na quimioterapia em pacientes e é caracterizado pela resistência cruzada a uma ampla variedade de drogas que podem apresentar estrutura e mecanismos de atuação diferentes (23), envolvendo mecanismos complexos como vias de genes reguladores de apoptose, reparo do DNA e desintoxicação intracelular (23).

A linhagem celular K-562 é um modelo utilizado no estudo da Leucemia mieloide crônica, apresenta cromossomo Filadélfia característico e foi caracterizada como uma linhagem eritro-leucêmica, indiferenciada e que apresenta aneuploidia (99-101). A linhagem celular Lucena foi estabelecida a partir da exposição contínua de K-562 a vincristina, um quimioterápico derivado alcalóide da vinca que age como inibidor do fuso mitótico. Lucena apresenta atividade aumentada de P-gp (96), amplificação gênica de MDR1 (96) e resistência a drogas não relacionadas (102), caracterizando o fenótipo MDR. Apesar da utilização de linhagens celulares como amostras representativas das células tumorais ser alvo de opiniões controversas (103), podem ser considerados apropriados para o estudo e melhor entendimento de diversos aspectos da biologia tumoral, como o mecanismo de MDR.

Com o intuito de propor possíveis alternativas terapêuticas e ampliar o conhecimento sobre a biologia relacionada a MDR e oxisterois, o enfoque do estudo aqui apresentado pode ser dividido em três partes: (1) avaliar a capacidade de 7KC induzir morte celular em células de leucemia humanas resistentes ou não aos quimioterapia tradicional e o envolvimento de características típicas de apoptose nesse processo; (2) analisar seu efeito no fenótipo de resistência múltipla a drogas e sua possível utilização

com quimioterápicos tradicionais; e (3) estudar mudanças na expressão proteica de células MDR após a exposição ao oxisterol.

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método colorimétrico de MTT. Em células metabolicamente ativas, o reativo de MTT (Brometo de metil-tiazolil-difenil-tetrazolio) é reduzido a formazan (tiazolil azul de formazan) pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase, permitindo a medida indireta da viabilidade celular por espectrofotometria.

7KC é capaz de reduzir a viabilidade celular em uma variedade de linhagens hematopoiéticas em concentrações que variam de 5 a 100 μM (revisado em (87)). No presente trabalho, ensaios de viabilidade celular mostraram que 7KC foi citotóxico de maneira concentração-dependente e que a linhagem parental K-562 apresentou maior susceptibilidade aos efeitos citotóxicos de 7KC que a linhagem derivada Lucena.

No trabalho aqui apresentado foram estudadas vias envolvidas na indução da apoptose em k-562 e Lucena utilizando 7KC em uma extensão de concentrações que reduziram a viabilidade celular em cada linhagem (25,50 e 75 μM para K562 e 75, 125 e 150 para Lucena), como foi demonstrado pelo ensaio de MTT.

ESTUDO DO PROCESSO DE MORTE CELULAR

AVALIAÇÃO DO PROCESSO APOPTÓTICO

A membrana plasmática é uma estrutura organizada formada por duas camadas de composição lipídica distintas. A camada exterior é neutra e formada por fosfatidilcolina e esfingomiolina, enquanto a camada interior contém aminofosfolídeos fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (PS), além de ácido fosfatídico. Essa assimetria é mantida por transportadores lipídicos específicos de forma dependente de energia. Com

a ativação de caspases, proteínas de membrana são clivadas e essa assimetria é perdida, expondo moléculas de PS que funcionam como um sinal para que as células apoptóticas sejam removidas por fagócitos (104).

Anexina V é uma proteína que possui alta afinidade a fosfolípides de carga negativa e, quando associada a um fluoróforo como isotiocianato de fluoresceína (FITC), pode ser utilizada como uma sonda específica para quantificação da PS externalizada (105). Como a assimetria da membrana também pode ser comprometida com o rompimento da sua integridade, para caracterização da morte celular por apoptose é utilizado um corante vital, impermeável a membrana, como iodeto de propídeo, para garantir a integridade celular.

Foi possível observar uma resposta similar entre K-562 e Lucena quanto a indução do processo apoptótico em resposta a exposição a 7KC. Em ambos os casos, mesmo com a menor concentração e tempo testados foi possível observar apoptose precoce e tardia, em menor extensão. Os dados aqui observados sugerem que até 24 h de tratamento, 7KC pode induzir a morte celular aumentando a apoptose precoce de forma mais acentuada que o aumento da apoptose tardia. Não foi possível observar nenhuma relação entre a dose e o tempo de exposição e o efeito de 7KC no processo apoptótico.

A indução da apoptose precoce, caracterizada pela exposição de fosfatidilserina, após exposição a 7KC é um fenômeno comumente observado e foi descrito em diversos modelos celulares mesmo quando a associação de outros modelos de morte celular são propostos, como autofagia em células do músculo liso vascular(106) e oxiaoptofagia em oligodendrócitos murinos (93, 107). É interessante ressaltar que 7KC foi associado ao

processo de morte celular por necrose em uma variedade de modelos celulares (108) mas esse mecanismo não foi observado nos ensaios realizados nesse trabalho.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$)

Em células saudáveis, a membrana mitocondrial interna apresenta um gradiente de prótons formado pela cadeia respiratória que é necessário para a fosforilação oxidativa e consequente produção de ATP, que resulta na geração de um gradiente eletroquímico ao longo da membrana formando o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Em vertebrados, o processo apoptótico tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca, foi relacionado com a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) e perda do $\Delta\Psi_m$, com consequente liberação de proteínas pro-apoptóticas (109-111).

A carbocianina catiônica lipofílica JC-1 (iodeto de 5,5,6,6-tetracloro-1,1,3,3-tetraetilbenzimidazolocarbocianina) é um cátion lipofílico permeável capaz de entrar seletivamente na mitocôndria. Quando em altas concentrações, ocorre a formação reversível de agregados de JC-1 que causa uma mudança no comprimento de onda da luz emitida de 530 nm (verde, na forma monomérica) para 590 nm (vermelho, na forma agregada) quando o fluorocromo é excitado a 490 nm. A formação e manutenção de JC-1 agregados no interior da mitocôndria são dependentes do gradiente eletroquímico e o aumento da sua concentração ocorre em consequência da polarização da membrana. Então, em mitocôndrias funcionais, que apresentam potencial de membrana mitocondrial altamente negativo, o JC-1 penetra e acumula-se no interior desta organela e emite coloração vermelha. Consequentemente, a despolarização da mitocôndria é indicada pela redução razão de intensidade de fluorescência vermelho/verde (109-111).

A via de sinalização mitocondrial é descrita como um dos mecanismos para o desencadeamento do processo apoptótico e pode ser ativado pelo estresse do retículo endoplasmático e pela via de sinalização p53. A despolarização mitocondrial é seguida da formação do apoptossomo, considerado o ponto de não-retorno no processo de morte celular (112, 113)

A exposição a 7KC e a redução do potencial de membrana mitocondrial envolvida no processo de morte celular são frequentemente associados. Por exemplo, no modelo leucemia U937, assim como no modelo de célula neuronal PC 12 (114), também foi observada perda do potencial de membrana mitocondrial após exposição a 7KC (115). Ao investigar as diversas formas funcionais de p53 no processo de morte celular induzido por 7-oxisterois (7KC e 7 β HOC), Li e colaboradores (116) descreveram um mecanismo no qual a presença de p53 é necessária para a despolarização e indução da via mitocondrial nas linhagens THP1 e J774.

No estudo aqui apresentado, ambas as linhagens responderam de forma semelhante, e foi possível observar a redução do potencial de membrana mitocondrial em uma maneira dose-dependente, em relação ao controle, após 24 h de tratamento com 7KC.

ESTUDO DA ATIVIDADE DE CASPASES

Uma característica do processo apoptótico é a ativação de Caspases (*cysteine-dependent aspartic-acid-directed proteases*). São sintetizadas no citosol como proenzimas inativas e, em resposta ao estresse, se tornam ativas através de um mecanismo em cadeia. Com sua ativação, funcionam como proteases específicas que clivam seu substrato na região carboxi-terminal de resíduos de ácido aspártico, causando

a perda ou ganho de função da proteína alvo, geralmente favorecendo uma via de sinalização pró-apoptótica (117).

A atividade das caspases pode ser detectada *in vitro* de forma específica através de uma molécula de fluorometilcetona (FMK) associada uma sequência de aminoácidos funcional para a atividade da caspase, como uma molécula repórter. No caso das caspases 3 e 7, a sequência reconhecida é ácido aspártico/ácido glutâmico/valina/ácido aspártico (DEVD). Enquanto para caspase 8, a sequência reconhecida é leucina/ácido glutâmico/treonina/ácido aspártico (LETD). Através da sequência de aminoácidos específica, a molécula repórter reage covalentemente com o sítio catalítico da caspase ativada. Assim, a fluorescência emitida é uma medida direta da quantidade de caspase ativada que havia no momento em que o reagente foi adicionado.

7KC promoveu o aumento na atividade das caspases 3/7 em comparação ao controle em ambas as linhagens, mas de forma diferente. A ativação das caspases na linhagem parental k-562 após exposição a 7KC ocorreu mais precocemente e em todas as concentrações de 7KC testadas. Em contraste, essa ativação na linhagem MDR Lucena ocorreu somente no tempo de 24 h e mais pronunciadamente com a maior concentração testada.

A partir da observação do padrão de K-562 para ativação de caspases em diversos intervalos de tempo e concentrações foi aplicado um teste posterior para avaliar a tendência de uma resposta linear (“post test for a linear trend”) ao estímulo 7KC. Porém o resultado obtido indicou uma ausência de linearidade.

Os resultados obtidos no trabalho aqui apresentado concordam com os observados em outros modelos descritos, como a linhagem de leucemia U937 tratadas

com 7KC 100 μ M por 24 h (115) e em células epiteliais pigmentadas da retina humana ARPE-19 expostas a 7KC por 2, 6 e 24 h, levaram a um aumento da atividade de caspase 3 (118). Além da ativação de caspase 3, também foi observado a ativação da caspase 8 em células epiteliais pigmentadas da retina humana ARPE-19 após tratamento com 7KC por 2, 6 e 24h (118). A ativação de caspase 3 não é um evento fundamental na resposta das células a 7KC. Por exemplo, a linhagem celular de bexiga ECV304 quando exposta a 7KC, sofre processo de necrose sem ativação de caspase 3 (119). No modelo leucemia U937 também foi observada perda do potencial de membrana mitocondrial após exposição a 7KC (115)

Também foi observada a ativação da caspase 8, indicando que a morte celular pela exposição a 7KC em K-562 e Lucena também pode ter ocorrido pela via dos receptores de morte (via extrínseca, Via da caspase 8).

OXISTERÓIS E O ESTUDO DA RESISTÊNCIA A DROGAS

O estudo de modelos de resistência a drogas no processo da morte celular mediada por oxisteróis já havia sido abordado de uma forma diferente da utilizada no trabalho aqui apresentado. Em um trabalho Gregorio-King e colaboradores (120) demonstraram que 25-OHC, 7 β -OHC e 7KC são potentes indutores de apoptose e/ou diferenciação em células progenitoras hematopoiéticas e da linhagem humana promielocítica HL60, determinado pelo aumento do número de células Anexina V positivas e CD34+ após exposição a esses compostos.

Em um estudo subsequente, o mesmo grupo desenvolveu linhagens hematopoiéticas HL60 resistentes aos efeitos citotóxicos dos oxisteróis através da exposição contínua a 25-OHC, 7 β -OHC e 7KC (121). As linhagens desenvolvidas apresentam maior viabilidade que a controle após 48 h de exposição aos oxisteróis, mas

ainda apresentam sensibilidade ao agente apoptótico estaurosporina. Em comparação a outro trabalho que explorou a resistência de linhagens de linfoma murino a 7KC (122), o emprego de três agentes indutores de resistência permitiu observar que o efeito citotóxico, apesar de apresentar características comuns, ocorre por mecanismos específicos para o tipo de oxisterol testado. Por exemplo, a captação de cálcio é importante na apoptose induzida por 25-OHC, mas não é crítica na citotoxicidade produzida pela exposição a 7 β -OHC e 7KC (121). Também investigaram o efeito desses compostos na expressão de diversos genes previamente relacionados ao processo de resistência a oxisteróis através de PCR quantitativo. Mostraram que as células resistentes expressam menos bcl-2 que o observado nos controles (121).

Com uma abordagem mais semelhante a apresentada nesse trabalho, Wang e coautores estudaram o efeito da exposição de 7KC, ao mesmo tempo em que descreveram seu efeito na função e expressão de *mdr1* em linhagens de hepatocarcinoma, HepG2 e Huh-7, e células derivadas de hepatócitos primários humanos, Hu S-E/2 (123). Com o objetivo de estudar o efeito da presença de 7KC no microambiente celular de pacientes com câncer e doenças hepáticas crônicas, demonstraram que, após 48 h de exposição a concentrações subtóxicas, 7KC reduz a acumulação intracelular e a toxicidade da doxorrubicina nas linhagens de hepatoma celular, mas não nas células HuS-E/2. Ao contrário, com a utilização de 7KC em concentração um pouco superior houve um acúmulo do quimioterápico nessas células. A avaliação da citotoxicidade de doxorrubicina após tratamento com o oxisterol apresentou resultados semelhantes: Redução da toxicidade em células Huh-7, mas nenhum efeito em Hu S-E/2.

O mesmo estudo sugere um mecanismo pós-transcricional da expressão de *mdr1* em linhagens Huh-7 tratadas com 7KC. Não observaram alterações na produção de mRNA por PCR quantitativo, enquanto a análise por ensaio imunoenzimático (“immunoblotting”) mostrou que expressão proteica é elevada em cerca de 50% (123).

No estudo aqui exposto, foi avaliado o efeito de 7KC em uma linhagem celular com fenótipo MDR, Lucena, e sua linhagem parental K-562. Foi observado por PCR quantitativo que a exposição ao oxisterol em concentrações subtóxicas reduziu a expressão do mRNA de MDR1 ($65,8\% \pm 0,09$ em relação ao controle). Apesar da redução observada, não houve um regresso ao fenótipo parental visto que a expressão de MDR1 em k-562 não foi detectável por esta técnica (dados não apresentados). Essa observação foi corroborada pelos dados obtidos na avaliação da expressão proteica total por nLC-MS/MS que mostrou uma redução da proteína *mdr1* (52% em relação ao controle).

A atividade da P-glicoproteína (MDR1) está relacionada ao fenótipo da resistência a múltiplas drogas caracterizado pela redução da concentração intracelular de drogas que são substrato dessa proteína na célula resistente em comparação a célula sensível. Para caracterização funcional da atividade de MDR1 após exposição das linhagens celulares a 7KC por 24 h foram feitos ensaios de acúmulo/efluxo. Nesses ensaios foi utilizada a daunorubicina, molécula da classe das antraciclinas que é substrato de MDR1 (124) além de possuir espectro de emissão fluorescente, permitindo o estudo de sua retenção intracelular. Outra molécula utilizada nesses ensaios foi Rho, molécula fluorescente empregada em ensaios para caracterização funcional do fenótipo de resistência (125) e que foi usada na caracterização da linhagem celular Lucena durante seu desenvolvimento (96). O influxo dessas moléculas nas células ocorre passivamente

através da permeabilidade natural da membrana, enquanto o efluxo ocorre passivamente em células sensíveis e ativamente no caso de células resistentes. Como resultado, quanto maior a presença de P-glicoproteína ativa nas células, menor é a sua fluorescência. Utilizando citometria de fluxo, pudemos observar que houve maior acúmulo tanto de daunorubicina quanto de rodamina 123 nas células após exposição a 7KC por 24 h. Após os ensaios de acúmulo/efluxo, a viabilidade celular observada pelo ensaio de MTT não estava alterada em nenhuma das condições testadas em relação ao controle (dados não apresentados).

A redução da expressão de MDR1 e a capacidade das células acumularem mais drogas associadas à habilidade de 7KC induzir morte no modelo celular estudado reafirmaram a possibilidade de utilização desse oxisterol como agente na terapia citotóxica anticâncer em associação a quimioterápicos tradicionais. Essa característica foi avaliada em ensaios combinatórios onde as linhagens K-562 e Lucena foram co-incubadas com três concentrações citotóxicas de 7KC e concentrações crescentes de daunorubicina ou vincristina. A presença de 7KC reduziu a porcentagem de viabilidade celular em todas as concentrações testadas de ambos os quimioterápicos, ressaltando assim a possibilidade de sua utilização como agente terapêutico tanto isoladamente como em combinação com outras drogas.

A divergência dos resultados observados no estudo aqui apresentado e o relatado por Wang et al. (123) pode estar relacionada aos diferentes efeitos da exposição crônica e aguda, mas principalmente ao modelo celular adotado. Como foi aqui extensamente discutido, oxisteróis apresentam funções celulares, ativação de vias de sinalização e

propriedades citotóxicas que dependem tanto da estrutura do composto testado quanto do modelo utilizado no desenvolvimento do estudo.

ESTUDO DO EFEITO DE 7KC NA REGULAÇÃO PROTEICA DIFERENCIAL DA LINHAGEM CELULAR LUCENA

A proteômica tem permitido estudos em larga escala tanto da expressão quanto de modificações proteicas. Permite a aplicação de metodologias livre de marcadores para monitorar a abundância relativa de um grupo de proteínas entre diferentes condições. A abordagem utilizada nesse trabalho é conhecida como “*bottom-up*”, que inclui a digestão triptica de uma amostra complexa de proteínas, gerando peptídeos que podem ser analisados por espectrometria de massas. Silva e colaboradores demonstraram a relação entre o sinal médio do espectro de massa dos peptídeos e o número de mols de uma determinada proteína. Esse estudo foi fundamental para o desenvolvimento de metodologias de quantificação relativa, ou seja, a identificação de proteínas diferencialmente expressas é possível através da análise da razão da área do pico de peptídeos idênticos em amostras diferentes. Essa relação se mantém uniforme quando considerados pelo menos 3 peptídeos com sinal mais intenso (126).

Após a seleção das proteínas diferencialmente reguladas entre controle sem tratamento e a linhagem Lucena tratada com 7KC por 24h, foi realizada a categorização funcional das proteínas identificadas através das anotações sobre processos biológicos e funções moleculares depositados no banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e confirmadas através do banco de dados Gene Ontology. O objetivo do Gene Ontology é produzir um vocabulário controlado que pode ser aplicado a todos os eucariotos. Para isso, três ontologias diferentes foram criadas: (1) Processos Biológicos, que se refere ao objetivo biológico do gene ou produto gênico. Um processo é alcançado através de um

ou mais conjuntos ordenados de funções moleculares; (2) Funções moleculares, são definidas como atividade bioquímica de um produto gênico, incluindo a ligação específica a ligantes ou estruturas; e (3) Componente celular, que faz referência ao local da célula onde o produto gênico é ativo (98). Além da classificação funcional, também foi realizada uma pesquisa de predição de interação das proteínas identificadas através do banco de dados String 9.0 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins - <http://string-db.org>), que fornece uma rede de interações preditas ou já descritas na literatura entre proteínas ou entre genes. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais).

A classificação das proteínas diferencialmente reguladas identificadas em ontologias e rede de interação permite um maior entendimento biológico das alterações ocorridas em função do tratamento. No modelo experimental desse trabalho, com a exposição da Linhagem celular Lucena a 7KC, diversas proteínas identificadas podem ser associadas a processos biológicos relacionados ou não ao metabolismo de oxisteróis. Dentre as 453 proteínas diferencialmente expressas identificadas, destacam-se proteínas relacionadas a parada do ciclo celular, morte celular, quimiosensibilização e estresse retículo endoplasmático listadas a seguir:

API5 E CDK6 - 7KC PODE CAUSAR APOPTOSE, PARADA DO CICLO CELULAR E SENSIBILIZAÇÃO A QUIMIOTERAPIA:

Com a análise das proteínas com expressão reduzida, foi possível observar a diminuição do fator de inibição da apoptose 5 [(API5); clone 11 antiapoptose (AAC-11)] na linhagem Lucena após exposição a 7KC. É uma proteína anti-apoptótica que está superexpressa em diversas células de câncer (127, 128), como por exemplo em pacientes com leucemia linfóide crônica (129). Sua expressão foi associada com um pior

prognóstico em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (128) e promoção da invasão e inibição da apoptose em células de cancer cervical (127).

Um dos mecanismos envolvidos seria a relação entre API5 e o fator de transcrição E2F1 (130). A família de fatores de transcrição E2F é formada por importantes reguladores da transição como E2F1, que promove a regulação transcricional de diversos genes como ciclina E, ciclina A e Cdk2, favorecendo a progressão G1-S do ciclo celular mas também foi relacionado a indução da apoptose após dano ao DNA (130). Foi demonstrado através de imunoprecipitação, que API5 aumenta o recrutamento de E2F1 na região promotora de seus genes alvo, favorecendo a proliferação celular (131). Por outro lado, API5 é descrito como um potente supressor específico da morte celular induzida por E2F1 (130). Ao mesmo tempo, a inibição de API5 aumentou a sensibilidade de várias células de cancer a quimioterapia mediada pela fator nuclear Acinus (132).

A progressão do ciclo celular é controlada por outra proteína que apresentou redução da sua expressão em consequência do tratamento com 7KC: CDK6. O complexo formado por CDK6 com CDK4 e CCND1 promove a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), que perde a atividade repressora sobre os fatores de transcrição E2F. Os complexos E2F ativos, por sua vez, ativam a transcrição de proteínas que regulam o ciclo celular (130), como mencionado anteriormente. A redução da expressão de CDK6 foi associada a parada do ciclo celular em células A549 (133) e a inibição da proliferação celular em modelo de carcinoma de células escamosas (134).

Em conjunto, os possíveis efeitos da redução de API5 e CDK6 em células Lucena após tratamento com 7KC podem incluir a indução da apoptose, a parada do ciclo celular

e consequente inibição da proliferação, além de redução do fenótipo MDR não relacionado a expressão de MDR1.

Figura 20 - Representação gráfica do possível papel da redução de API5 e CDK6 em células Lucena tratadas com 7KC. As setas junto a proteínas indicam redução da expressão das proteínas identificadas experimentalmente. Os conectores que indicam redução de expressão ou inibição de um processo são indicados por “-I”.

MDR1, DNA-PKcs, ILF2 E ILF3 - 7KC PODE CAUSAR SENSIBILIZAÇÃO A QUIMIOTERAPIA E MORTE CELULAR:

Como já foi comentado anteriormente nesse trabalho, o tratamento com 7KC reduziu a expressão de *mdr1* na linhagem Lucena. A subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (PRKDC, DNA-PKcs) também foi identificada sub expressa, embora não tenha preenchido os critérios de inclusão na lista de proteínas diferencialmente expressas (redução de 31%). Entretanto, foi considerada devido a sua função biológica e relação com *mdr1*: DNA-PKcs promove a expressão de MDR1 através da fosforilação de RNA Helicase A (135). Seo e colaboradores demonstraram que células

MDR expostas a TRAIL podem ser sensibilizadas para drogas relacionadas a MDR através da inibição da via de DNA-PKcs em modelo de leucemia linfoblástica humana (136). Nesse modelo, os níveis proteicos de *mdr1* foram relacionados aos níveis de DNA-PKcs e a inibição do efluxo ocorre com a ativação da via mitocondrial da apoptose (136). No presente trabalho, tanto DNA-PKcs quanto *mdr1* foram menos expressos em Linhagem Lucena após a incubação com 7KC.

Survivina é uma proteína membro da família dos inibidores de apoptose superexpressa em tumores primários, que tem sua transcrição estimulada pelo complexo formado pelas proteínas ILF2 e ILF3. Nakamura e colaboradores descreveram a molécula YM155, que é capaz de suprimir a expressão de survivina através da redução da expressão de ILF3. A incubação com 7KC também causou a redução de ILF3, assim como de ILF2 em linhagem Lucena.

Figura 21 - Representação gráfica do possível papel da redução de ILF2 e ILF3 sobre a expressão de survivina em células Lucena tratadas com 7KC. As setas junto a proteínas indicam redução da expressão das proteínas identificadas experimentalmente. Os conectores que indicam redução de expressão ou inibição de um processo são indicados por “-I”.

PDI E HSPs- MORTE CELULAR E O ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Entre as proteínas superexpressas após a incubação com 7KC está a família das proteínas disulfeto isomerase (PDI), que são classificadas como chaperonas enzimáticas.

Em células eucariotas, o estresse do retículo endoplasmático induz a superexpressão de enzimas como PDI para evitar a agregação de proteínas mal formadas (137). Zhao e colaboradores (138) mostraram que a superexpressão de PDI induz permeabilização da membrana mitocondrial gerando um sinal pro-apoptótico. Por outro lado, foi observado em linhagens celulares endoteliais humanas HMEC-1 que concentrações tóxicas de oxLDL induzem a modificação de PDI, com inibição da sua atividade enzimática e potencialização tanto do estresse do retículo plasmático quanto o processo apoptótico (139). Também foi possível identificar a expressão diferencial de proteínas que já foram associadas ao 7KC na literatura, como as proteínas de choque térmico (HSP). Em um estudo desenvolvido em macrófagos humanos THP-1, o tratamento das células com 7KC induziu mudanças no perfil oxidativo, inclusive superexpressão de hsp70 e hsp90 (140). Grp78, outra proteína observada superexpressa, também foi relacionada ao estresse do retículo endoplasmático, em células de músculo liso humanas expostas a 7KC (141) e em células endoteliais humanas HMEC-1 (142).

A UTILIZAÇÃO DE OXISTERÓIS COM ENFOQUE TERAPÊUTICO NO TRATAMENTO DE LEUCEMIAS

Pouco foi explorada a possibilidade da utilização quimioterápica de oxisteróis em modelos de Leucemia. Alguns estudos abordaram a necessidade de expansão do conhecimento sobre a relação estrutura-função de moléculas derivadas de colesterol, como Johnson e colaboradores (143), que desenvolveram um trabalho que avaliou a relação entre a estrutura química de oxisteróis e sua potência como indutores de morte em células de leucemia humana CEM-C7. Mostraram que a molécula de colesterol modificada com a inserção de um grupo cetona no carbono 15 apresenta capacidade de causar morte assim como 25HOC, que foi descrita como a molécula mais potente na

indução da morte celular avaliada por MTT, com a promoção de condensação da cromatina e externalização de fosfatidilserina.

Em um estudo realizado por Ayala-torres e colaboradores (144) foi abordada a resposta de células resistentes, com a comparação do efeito de 25-hidroxicolesterol (25HOC) em linhagem celular leucêmica CEM-C7 e em subclone M10R5, que apresenta resistência a ação do oxisterol. Observaram que CEM-C7, e não M10R5, apresentou morfologia apoptótica observada por microscópio de luz, encolhimento celular e mudanças na heterocromatina quando observadas em microscopia de transmissão eletrônica após o tratamento. A ativação de caspases só foi perceptível após 24 h de tratamento e a adição de um inibidor de caspases retardou, mas não foi suficiente para inibir o processo de morte celular em um período de 48 h. O mesmo grupo em um trabalho seguinte (145) mostrou a redução da expressão do proto-oncogene c-myc na linhagem sensível após tratamento com 25HOC. Essa alteração não foi observada na linhagem resistente e precede a ativação de caspases na linhagem sensível, sugerindo seu papel como um importante evento na cascata regulatória da apoptose de células CEM causadas por 25HOC. Em concordância, no modelo celular empregado no trabalho aqui apresentado, a atividade de caspases foi observada com de 24 h tratamento. Ao mesmo tempo, com o método de extração de proteínas adotado, a análise por nLC-MS/MS não apresentou peptídeos suficientes que permitissem a identificação de c-myc entre as proteínas diferencialmente expressas. O papel da síntese proteica na apoptose mediada por oxisteróis havia sido estudada em outros sistemas linfoides, onde tanto ciclohexamida quanto actinomicina D foram capazes de reduzir a indução de apoptose

provocada por 25HOC em células de linfoma murino, sugerindo que a síntese de macromoléculas é necessária para a ocorrência da morte celular programada (146).

CONCLUSÃO

Nossos dados indicam que 7KC pode causar redução da viabilidade celular em células de CML K562 e também em células MDR Lucena, por meio de apoptose com exposição de fosfatidilserina, envolvimento das caspases 3/7 e 8 e despolarização da membrana mitocondrial.

Ao mesmo tempo, 7KC pode reduzir o fenótipo MDR em linhagem Lucena com a diminuição da expressão de MDR1 e maior acúmulo intracelular de drogas. Além disso, a co-incubação das linhagens celulares em associação a quimioterápicos mostrou uma maior redução da viabilidade celular, em relação ao seu uso isolado.

A relação entre 7KC e o modelo aqui estudado se torna mais interessante quando pudemos observar empregando análise proteômica globalo envolvimento de processos relacionados a sensibilização a drogas, morte celular e estresse do retículo endoplasmático através da redução da expressão de ILF2, ILF3, MDR1, API5, CDK6 e do aumento da expressão de PDI, hsp70, hsp90 e Grp78. Diversas outras proteínas estavam diferencialmente expressas após o tratamento da linhagem Lucena com 7KC. Essas proteínas devem ser alvo futuros estudos envolvendo MDR e 7KC.

ANEXOS

ANEXO 1:

Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - Protocolo de Pesquisa N 391/10

MEDICINA USP COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA		
PROTOCOLO DE PESQUISA Nº: 391/10		Data de entrada: 24/02/12 Data sessão: 07/03/12
TÍTULO: Tratamento do Câncer: Inovação no uso de oxisteróis incorporados a nanoemulsão lipídica como indutores de morte celular.		
PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski		
DEPARTAMENTO: Clínica Médica		
CONSIDERAÇÕES DO RELATOR APROVADAS PELO PLENÁRIO:		
Autor encaminhou carta pedindo que o projeto de doutorado "Caracterização do Potencial Citotóxico de Oxisteróis como Estratégia Terapêutica", da aluna Lívia Rosa Fernandes, seja aprovado como parte integrante do projeto 391/10 aprovado pelo CEP-FMUSP em 2010. Pelo mencionado, o subprojeto não acarreta utilização de novos animais não altera os procedimentos experimentais aprovados anteriormente. Apenas existe a necessidade de mencionar o número total de animais que estão sendo utilizados.		
Quantidade animais:..... Espécie: Camundongos		
CONCLUSÃO: Aprovado, após esclarecimentos		
ENVIAR Á CONEP	SIM () INFORME A ÁREA TEMÁTICA:	NÃO O
Prof. Dr. Roger Chammas Coordenador Comitê de Ética em Pesquisa		
Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004 mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
Departamento de Clínica Médica
Disciplina de Hematologia e Hemoterapia
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – 1º andar
05403-000 São Paulo SP

Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski
Professor Associado
Diretor do Laboratório de Genética e
Hematologia Molecular – LIM 31
Telefax: 11 3082-2398
e-mail: spbydlow@usp.br

São Paulo, 14 de março de 2012.

À CAPPesq

Ref.: CONSIDERAÇÕES DO RELATOR - Projeto de Doutorado da Aluna Livia Rosa
Fernandes

Conforme solicitado, informamos que o número total de animais (camundongos) a serem
utilizados no projeto é 110.

Colocamo-nos a disposição.

Att.

Prof. Dr. SÉRGIO PAULO BYDLOWSKI
Chefe de Laboratório de
Investigação Médica (LIM) - 31

Recebi:

03/05/2012

ANEXO 2

Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Iniciação

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
log₂(7KC/Ctrl): Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	log ₂ (7KC/Ctrl)
B4DMT5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F OS=Homo sapiens GN=EIF3F PE=2 SV=1 - [B4DMT5_HUMAN]	4	-0.97
B4DVU3	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C OS=Homo sapiens GN=EIF3C PE=2 SV=1 - [B4DVU3_HUMAN]	7	-0.98
O60739	Eukaryotic translation initiation factor 1b OS=Homo sapiens GN=EIF1B PE=1 SV=2 - [EIF1B_HUMAN]	3	-1.04
B4DV79	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Homo sapiens GN=EIF3B PE=2 SV=1 - [B4DV79_HUMAN]	10	-1.21
A8K2Y2	cDNA FLJ78120, highly similar to Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa (EIF2S3), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K2Y2_HUMAN]	9	-1.27
Q05BS0	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=EIF3A PE=2 SV=1 - [Q05BS0_HUMAN]	9	-1.73
Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I OS=Homo sapiens GN=EIF3I PE=1 SV=1 - [EIF3I_HUMAN]	8	-1.74
Q04637-6	Isoform E of Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 OS=Homo sapiens GN=EIF4G1 - [IF4G1_HUMAN]	13	-1.87
Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M OS=Homo sapiens GN=EIF3M PE=1 SV=1 - [EIF3M_HUMAN]	5	-2.58
Q14232	Translation initiation factor eIF-2B subunit alpha OS=Homo sapiens GN=EIF2B1 PE=1 SV=1 - [EI2BA_HUMAN]	3	-2.58
P41567	Eukaryotic translation initiation factor 1 OS=Homo sapiens GN=EIF1 PE=1 SV=1 - [EIF1_HUMAN]	4	-2.60
Q15056-2	Isoform Short of Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Homo sapiens GN=EIF4H - [IF4H_HUMAN]	7	-2.92
B3KM86	cDNA FLJ10524 fis, clone NT2RP2000880, highly similar to Eukaryotic translation initiation factor 5B OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B3KM86_HUMAN]	8	-2.97

 Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Ribossomal

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
H7C2W9	60S ribosomal protein L31 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL31 PE=1 SV=1 - [H7C2W9_HUMAN]	5	2.77
P26373	60S ribosomal protein L13 OS=Homo sapiens GN=RPL13 PE=1 SV=4 - [RL13_HUMAN]	10	2.60
D3YTB1	60S ribosomal protein L32 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL32 PE=1 SV=1 - [D3YTB1_HUMAN]	4	2.31
Q07020	60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens GN=RPL18 PE=1 SV=2 - [RL18_HUMAN]	7	2.17
C9JXB8	60S ribosomal protein L24 OS=Homo sapiens GN=RPL24 PE=1 SV=1 - [C9JXB8_HUMAN]	5	2.10
P23396	40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2 - [RS3_HUMAN]	19	2.10
P62241	40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=1 SV=2 - [RS8_HUMAN]	12	2.00
P62249	40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens GN=RPS16 PE=1 SV=2 - [RS16_HUMAN]	9	1.99
P42766	60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens GN=RPL35 PE=1 SV=2 - [RL35_HUMAN]	4	1.98
C9K025	60S ribosomal protein L35a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL35A PE=1 SV=1 - [C9K025_HUMAN]	4	1.98
P49207	60S ribosomal protein L34 OS=Homo sapiens GN=RPL34 PE=1 SV=3 - [RL34_HUMAN]	3	1.91
P05387	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1 - [RLA2_HUMAN]	8	1.66
P05386	60S acidic ribosomal protein P1 OS=Homo sapiens GN=RPLP1 PE=1 SV=1 - [RLA1_HUMAN]	4	1.54
Q9BTQ7	Similar to ribosomal protein L23 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q9BTQ7_HUMAN]	6	1.52

Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Ribossomal - Continuação

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
B2R4V2	cDNA, FLJ92227, highly similar to Homo sapiens ribosomal protein L36a-like (RPL36AL), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R4V2_HUMAN]	3	1.51
A8K4Z4	cDNA FLJ75549, highly similar to Homo sapiens ribosomal protein, large, P0 (RPLP0), transcript variant 1, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K4Z4_HUMAN]	17	1.47
Q02878	60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=1 SV=3 - [RL6_HUMAN]	20	1.46
X1WI28	60S ribosomal protein L10 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL10 PE=1 SV=2 - [X1WI28_HUMAN]	13	1.45
P15880	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=2 - [RS2_HUMAN]	16	1.42
P62263	40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens GN=RPS14 PE=1 SV=3 - [RS14_HUMAN]	7	1.34
F8W7C6	60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens GN=RPL10 PE=1 SV=2 - [F8W7C6_HUMAN]	11	1.29
C9J9K3	40S ribosomal protein SA (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=3 - [C9J9K3_HUMAN]	13	1.28
E5RI99	60S ribosomal protein L30 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL30 PE=1 SV=1 - [E5RI99_HUMAN]	6	1.23
P18124	60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=1 SV=1 - [RL7_HUMAN]	15	1.16
P42677	40S ribosomal protein S27 OS=Homo sapiens GN=RPS27 PE=1 SV=3 - [RS27_HUMAN]	5	1.16
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2 - [RS4X_HUMAN]	23	1.12
M0R3D6	60S ribosomal protein L18a (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL18A PE=1 SV=1 - [M0R3D6_HUMAN]	6	1.09
P62917	60S ribosomal protein L8 OS=Homo sapiens GN=RPL8 PE=1 SV=2 - [RL8_HUMAN]	7	1.02

 Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Ribossomal - Continuação

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
J3QSV6	Ribosomal L1 domain-containing protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RSL1D1 PE=1 SV=1 - [J3QSV6_HUMAN]	12	-0.88
P62424	60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens GN=RPL7A PE=1 SV=2 - [RL7A_HUMAN]	19	-0.88
P46779	60S ribosomal protein L28 OS=Homo sapiens GN=RPL28 PE=1 SV=3 - [RL28_HUMAN]	8	-0.90
P32969	60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens GN=RPL9 PE=1 SV=1 - [RL9_HUMAN]	10	-0.99
P0CW22	40S ribosomal protein S17-like OS=Homo sapiens GN=RPS17L PE=1 SV=1 - [RS17L_HUMAN]	7	-1.00
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=2 - [RS27A_HUMAN]	5	-1.39
M0R0F0	40S ribosomal protein S5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=1 SV=1 - [M0R0F0_HUMAN]	10	-1.50
E7EQV9	Ribosomal protein L15 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL15 PE=1 SV=1 - [E7EQV9_HUMAN]	7	-1.67
P62847-2	Isoform 2 of 40S ribosomal protein S24 OS=Homo sapiens GN=RPS24 - [RS24_HUMAN]	4	-2.12
P62841	40S ribosomal protein S15 OS=Homo sapiens GN=RPS15 PE=1 SV=2 - [RS15_HUMAN]	5	-3.35

 Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: tRNAI

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=YARS PE=1 SV=4 - [SYYC_HUMAN]	11	1.19
Q9Y3I0	tRNA-splicing ligase RtcB homolog OS=Homo sapiens GN=RTCB PE=1 SV=1 - [RTCB_HUMAN]	4	-1.02
A0A090N8G0	Glycyl-tRNA synthetase OS=Homo sapiens GN=GARS PE=4 SV=1 - [A0A090N8G0_HUMAN]	10	-1.08
B4DNN3	cDNA FLJ54453, highly similar to Glutaminyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.18) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DNN3_HUMAN]	3	-1.11
Q15046	Lysine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=KARS PE=1 SV=3 - [SYK_HUMAN]	10	-1.12
Q9Y285-2	Isoform 2 of Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit OS=Homo sapiens GN=FARSA - [SYFA_HUMAN]	9	-1.19
A8K492	cDNA FLJ76789, highly similar to Homo sapiens methionine-tRNA synthetase (MARS), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K492_HUMAN]	11	-1.44
P12081-4	Isoform 4 of Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=HARS - [SYHC_HUMAN]	5	-1.59
P26640	Valine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=VARS PE=1 SV=4 - [SYVC_HUMAN]	12	-3.83

 Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: ATP

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
P12236	ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=1 SV=4 - [ADT3_HUMAN]	11	3.27
P05141	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7 - [ADT2_HUMAN]	15	2.56
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1 - [ATPA_HUMAN]	26	2.34
Q59HF3	ATPase, H+ transporting, lysosomal 56/58kD, V1 subunit B, isoform 2 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [Q59HF3_HUMAN]	5	1.53
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3 - [ATPB_HUMAN]	27	1.24
P38606-2	Isoform 2 of V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Homo sapiens GN=ATP6V1A - [VATA_HUMAN]	7	1.13
O75348	V-type proton ATPase subunit G 1 OS=Homo sapiens GN=ATP6V1G1 PE=1 SV=3 - [VATG1_HUMAN]	3	-1.03
B4DL14	ATP synthase subunit gamma OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DL14_HUMAN]	7	-1.07
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4 - [TERA_HUMAN]	26	-2.44

Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Redox

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
Q06830	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1 - [PRDX1_HUMAN]	19	2.46
P30044-2	Isoform Cytoplasmic+peroxisomal of Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX5 - [PRDX5_HUMAN]	7	2.44
Q13162	Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1 - [PRDX4_HUMAN]	4	1.18
P30041	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3 - [PRDX6_HUMAN]	16	0.98
C9JFR7	Cytochrome c (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=1 SV=1 - [C9JFR7_HUMAN]	7	3.60
P14406	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX7A2 PE=1 SV=1 - [CX7A2_HUMAN]	3	2.82
P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX5A PE=1 SV=2 - [COX5A_HUMAN]	9	-1.88
B2R983	cDNA, FLJ94267, highly similar to Homo sapiens glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R983_HUMAN]	8	1.88
P09211	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2 - [GSTP1_HUMAN]	10	1.65
X6RA14	S-formylglutathione hydrolase OS=Homo sapiens GN=ESD PE=1 SV=1 - [X6RA14_HUMAN]	5	-3.10
Q75MT9	Malate dehydrogenase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=3 SV=1 - [Q75MT9_HUMAN]	19	2.77
P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Homo sapiens GN=SOD1 PE=1 SV=2 - [SODC_HUMAN]	10	1.06

 Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: HSP

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
Q58FF4	Heat shock protein 90Bf OS=Homo sapiens GN=HSP90Bf PE=1 SV=1 - [Q58FF4_HUMAN]	3	5.25
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Homo sapiens GN=HSPA2 PE=1 SV=1 - [HSP72_HUMAN]	13	3.20
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1 - [HSP7C_HUMAN]	35	2.93
P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2 - [CH10_HUMAN]	11	2.61
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5 - [HSP71_HUMAN]	27	2.28
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5 - [HS90A_HUMAN]	60	2.09
Q58FG1	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A4 OS=Homo sapiens GN=HSP90AA4P PE=5 SV=1 - [HS904_HUMAN]	4	1.67
B7Z532	cDNA FLJ51028, highly similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z532_HUMAN]	22	1.60
B7Z4F6	cDNA FLJ54912, highly similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B7Z4F6_HUMAN]	45	1.26

 Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Proteossomo

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
P28074	Proteasome subunit beta type-5 OS=Homo sapiens GN=PSMB5 PE=1 SV=3 - [PSB5_HUMAN]	5	1.70
A8K4T6	cDNA FLJ76282, highly similar to Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5 (PSMD5), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K4T6_HUMAN]	8	-0.99
P25787	Proteasome subunit alpha type-2 OS=Homo sapiens GN=PSMA2 PE=1 SV=2 - [PSA2_HUMAN]	4	-1.17
A2ACR1	Proteasome subunit beta type OS=Homo sapiens GN=PSMB9 PE=1 SV=1 - [A2ACR1_HUMAN]	3	-1.43
B7Z478	Proteasome (Prosome, macropain) subunit, beta type, 2, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=PSMB2 PE=2 SV=1 - [B7Z478_HUMAN]	5	-1.46
Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens GN=PSMD2 PE=1 SV=3 - [PSMD2_HUMAN]	24	-1.57
P25789	Proteasome subunit alpha type-4 OS=Homo sapiens GN=PSMA4 PE=1 SV=1 - [PSA4_HUMAN]	10	-1.82
Q6IBT1	Proteasome subunit beta type OS=Homo sapiens GN=PSMB7 PE=2 SV=1 - [Q6IBT1_HUMAN]	4	-1.88
A0A024R201	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=PSMD13 PE=4 SV=1 - [A0A024R201_HUMAN]	8	-3.03
P51665	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens GN=PSMD7 PE=1 SV=2 - [PSMD7_HUMAN]	4	-3.12
Q99460-2	Isoform 2 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PSMD1 - [PSMD1_HUMAN]	13	-3.17
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Homo sapiens GN=PSMD12 PE=1 SV=3 - [PSD12_HUMAN]	8	-3.40

 Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Histona

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]	13	4.83
Q5TEC6	Histone H3 OS=Homo sapiens GN=HIST2H3PS2 PE=1 SV=1 - [Q5TEC6_HUMAN]	6	4.18
K7EK07	Histone H3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=H3F3B PE=1 SV=1 - [K7EK07_HUMAN]	8	3.33
P16403	Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2 - [H12_HUMAN]	10	3.18
P16402	Histone H1.3 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1D PE=1 SV=2 - [H13_HUMAN]	10	3.18
P68431	Histone H3.1 OS=Homo sapiens GN=HIST1H3A PE=1 SV=2 - [H31_HUMAN]	8	2.25
A8K9J7	Histone H2B OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K9J7_HUMAN]	14	2.06
P06899	Histone H2B type 1-J OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BJ PE=1 SV=3 - [H2B1J_HUMAN]	13	1.96
P23527	Histone H2B type 1-O OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BO PE=1 SV=3 - [H2B1O_HUMAN]	13	1.94
Q71DI3	Histone H3.2 OS=Homo sapiens GN=HIST2H3A PE=1 SV=3 - [H32_HUMAN]	8	1.52
P16104	Histone H2AX OS=Homo sapiens GN=H2AFX PE=1 SV=2 - [H2AX_HUMAN]	8	1.27
P04908	Histone H2A type 1-B/E OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AB PE=1 SV=2 - [H2A1B_HUMAN]	8	1.15
E9PC52	Histone-binding protein RBBP7 OS=Homo sapiens GN=RBBP7 PE=1 SV=1 - [E9PC52_HUMAN]	7	-0.90
O14929-2	Isoform B of Histone acetyltransferase type B OS=Homo sapiens GN=HAT1 - [HAT1_HUMAN]	3	-1.50
P16401	Histone H1.5 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1B PE=1 SV=3 - [H15_HUMAN]	3	-1.70
P05204	Non-histone chromosomal protein HMG-17 OS=Homo sapiens GN=HMGN2 PE=1 SV=3 - [HMGN2_HUMAN]	2	-2.53
Q09028-3	Isoform 3 of Histone-binding protein RBBP4 OS=Homo sapiens GN=RBBP4 - [RBBP4_HUMAN]	10	-3.22

Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Ribonuclear

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2 - [ROA2_HUMAN]	29	2.78
B2R603	cDNA, FLJ92712, highly similar to Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2) (HNRPC), transcript variant 1, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B2R603_HUMAN]	12	2.22
B2R5W2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens GN=HNRNPC PE=2 SV=1 - [B2R5W2_HUMAN]	12	2.22
P09651-2	Isoform A1-A of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 - [ROA1_HUMAN]	24	2.07
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU PE=1 SV=6 - [HNRPU_HUMAN]	29	2.00
A8KAQ5	cDNA FLJ77404, highly similar to Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein 70kDa polypeptide (RNP antigen) (SNRP70), transcript variant 1, mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8KAQ5_HUMAN]	3	1.95
O14979-3	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Homo sapiens GN=HNRNPDL - [HNRDL_HUMAN]	7	1.85
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1 - [ROA0_HUMAN]	8	1.68
P62318-2	Isoform 2 of Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Homo sapiens GN=SNRPD3 - [SMD3_HUMAN]	3	1.52
Q8IXJ3	Small nuclear ribonucleoprotein component OS=Homo sapiens GN=SNRP116 PE=2 SV=1 - [Q8IXJ3_HUMAN]	13	1.47
Q14103-3	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPD - [HNRPD_HUMAN]	13	1.13
D6R9P3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens GN=HNRNPAB PE=1 SV=1 - [D6R9P3_HUMAN]	10	1.08
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3 - [HNRPF_HUMAN]	12	-1.20
B4DXB0	cDNA FLJ51133, highly similar to Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (EC 1.17.4.1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DXB0_HUMAN]	4	-1.27

 Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Ribonuclear - Continuação

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A' OS=Homo sapiens GN=SNRPA1 PE=1 SV=2 - [RU2A_HUMAN]	5	-1.54
E9PCY7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=1 - [E9PCY7_HUMAN]	13	-1.76
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens GN=SNRNP200 PE=1 SV=2 - [U520_HUMAN]	18	-2.63
P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Homo sapiens GN=SNRPD1 PE=1 SV=1 - [SMD1_HUMAN]	4	-2.82

 Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Fosfatase

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
B4DDF7	cDNA FLJ53296, highly similar to Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DDF7_HUMAN]	17	-1.09
HOYEY4	ADP-sugar pyrophosphatase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NUDT5 PE=1 SV=1 - [HOYEY4_HUMAN]	11	-1.10
P30154	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R1B PE=1 SV=3 - [2AAB_HUMAN]	8	-1.45
P67775	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2CA PE=1 SV=1 - [PP2AA_HUMAN]	6	-3.71
Q9H773	dCTP pyrophosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=DCTPP1 PE=1 SV=1 - [DCTP1_HUMAN]	4	-4.24

Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Quinase

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
P22392-2	Isoform 3 of Nucleoside diphosphate kinase B OS=Homo sapiens GN=NME2 - [NDKB_HUMAN]	15	1.64
P14618	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4 - [KPYM_HUMAN]	35	1.00
E7EU96	Casein kinase II subunit alpha OS=Homo sapiens GN=CSNK2A1 PE=1 SV=1 - [E7EU96_HUMAN]	4	-1.30
Q00534	Cyclin-dependent kinase 6 OS=Homo sapiens GN=CDK6 PE=1 SV=1 - [CDK6_HUMAN]	9	-1.73
A8K5M4	cDNA FLJ75088, highly similar to Homo sapiens p21 (CDKN1A)-activated kinase 2 (PAK2), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K5M4_HUMAN]	6	-1.95
B4DHN0	Mitogen-activated protein kinase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DHN0_HUMAN]	11	-2.05
A8K245	cDNA FLJ75441, highly similar to Homo sapiens vaccinia related kinase 1 (VRK1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K245_HUMAN]	7	-2.66

Lista das proteínas diferencialmente reguladas após tratamento com 7KC - Classificação Funcional: Nedilação

Key e Descrição: Identificação das proteínas fornecidas por UniProt (www.uniprot.org); Peptídeos: Número de peptídeos identificados;
 $\log_2(7KC/Ctrl)$: Variação observada entre linhagem Lucena tratada com 7KC e o controle.

KEY	Descrição	Peptídeos	$\log_2(7KC/Ctrl)$
A8K8U1	cDNA FLJ77762, highly similar to Homo sapiens cullin-associated and neddylation-dissociated 1 (CAND1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [A8K8U1_HUMAN]	18	-2.50
Q15843	NEDD8 OS=Homo sapiens GN=NEDD8 PE=1 SV=1 - [NEDD8_HUMAN]	2	-3.02
B4DIH5	COP9 signalosome complex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=COPS2 PE=1 SV=1 - [B4DIH5_HUMAN]	2	-4.53

BIBLIOGRAFIA

1. Ades T, Alteri R, Bandi P, Brooks D, Center M, Chen A, et al. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta 2012; Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>.
2. Silva INdCJAGd. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil Rio de Janeiro: INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2014. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>.
3. Frazer R, Irvine AE, McMullin MF. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. The Ulster medical journal. 2007;76(1):8-17. Epub 2007/02/10.
4. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. The New England journal of medicine. 1999;341(3):164-72. Epub 1999/07/15.
5. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. Oncology (Williston Park). 1999;13(2):169-80; discussion 81, 84. Epub 1999/03/18.
6. Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. The Journal of clinical investigation. 2010;120(7):2254-64. Epub 2010/07/02.
7. Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. Nature reviews Cancer. 2007;7(6):441-53. Epub 2007/05/25.
8. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243(5405):290-3. Epub 1973/06/01.

9. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983;306(5940):277-80. Epub 1983/11/17.
10. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36(1):93-9. Epub 1984/01/01.
11. Wetzler M, Talpaz M, Van Etten RA, Hirsh-Ginsberg C, Beran M, Kurzrock R. Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(4):1925-39. Epub 1993/10/01.
12. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-56. Epub 2000/11/09.
13. Barnes DJ, Palaiologou D, Panousopoulou E, Schultheis B, Yong AS, Wong A, et al. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer research*. 2005;65(19):8912-9. Epub 2005/10/06.
14. Mauro MJ, Druker BJ. STI571: a gene product-targeted therapy for leukemia. *Current oncology reports*. 2001;3(3):223-7. Epub 2001/04/11.
15. O'Hare T, Zabriskie MS, Eiring AM, Deininger MW. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(8):513-26. Epub 2012/07/25.

16. Millot F, Baruchel A, Guilhot J, Petit A, Leblanc T, Bertrand Y, et al. Imatinib is effective in children with previously untreated chronic myelogenous leukemia in early chronic phase: results of the French national phase IV trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(20):2827-32. Epub 2011/06/15.
17. Roychowdhury S, Talpaz M. Managing resistance in chronic myeloid leukemia. *Blood reviews*. 2011;25(6):279-90. Epub 2011/10/11.
18. Radich JP. The Biology of CML blast crisis. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2007:384-91. Epub 2007/11/21.
19. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*. 2000;96(3):1070-9. Epub 2000/07/27.
20. Vaidya S, Ghosh K, Vundinti BR. Recent developments in drug resistance mechanism in chronic myeloid leukemia: a review. *European journal of haematology*. 2011;87(5):381-93. Epub 2011/08/06.
21. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 2009;16(2):122-31. Epub 2009/04/02.
22. Galimberti S, Cervetti G, Guerrini F, Testi R, Pacini S, Fazzi R, et al. Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with

chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2005;162(1):57-62. Epub 2005/09/15.

23. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine*. 2002;53:615-27. Epub 2002/01/31.

24. Baguley BC. Multidrug resistance in cancer. *Methods in molecular biology*. 2010;596:1-14. Epub 2009/12/02.

25. Lage H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(20):3145-67. Epub 2008/06/27.

26. Shaffer BC, Gillet JP, Patel C, Baer MR, Bates SE, Gottesman MM. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2012;15(1-2):62-9. Epub 2012/03/14.

27. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2000;11(4):265-83. Epub 2000/10/18.

28. Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur J Pharm Sci*. 2006;27(1):80-90. Epub 2005/10/26.

29. Dobson PD, Kell DB. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(3):205-20. Epub 2008/03/01.

30. Brown CM, Reisfeld B, Mayeno AN. Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug metabolism reviews*. 2008;40(1):1-100. Epub 2008/02/09.
31. Oyama T, Kagawa N, Kunugita N, Kitagawa K, Ogawa M, Yamaguchi T, et al. Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2004;9:1967-76. Epub 2004/02/24.
32. Purnapatre K, Khattar SK, Saini KS. Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs. *Cancer letters*. 2008;259(1):1-15. Epub 2007/12/07.
33. Pal D, Mitra AK. MDR- and CYP3A4-mediated drug-drug interactions. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2006;1(3):323-39. Epub 2007/11/28.
34. Townsend DM, Findlay VL, Tew KD. Glutathione S-transferases as regulators of kinase pathways and anticancer drug targets. *Methods in enzymology*. 2005;401:287-307. Epub 2006/01/10.
35. Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, et al. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2006;90(1):5-22. Epub 2005/12/03.
36. Ekhardt C, Rodenhuis S, Smits PH, Beijnen JH, Huitema AD. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer treatment reviews*. 2009;35(1):18-31. Epub 2008/09/06.

37. Jansen BA, Brouwer J, Reedijk J. Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *Journal of inorganic biochemistry*. 2002;89(3-4):197-202. Epub 2002/06/14.
38. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(4):277-88. Epub 2002/05/11.
39. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal*. 1997;326 (Pt 1):1-16. Epub 1997/08/15.
40. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000;403(6765):98-103. Epub 2000/01/19.
41. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell death and differentiation*. 2014. Epub 2014/12/20.
42. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995;81(4):495-504. Epub 1995/05/19.
43. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995;14(22):5579-88. Epub 1995/11/15.
44. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2861-74. Epub 2004/04/13.

45. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell death and differentiation*. 2006;13(9):1423-33. Epub 2006/05/06.
46. Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*. 2013;21(4):501-15. Epub 2013/04/09.
47. de Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental oncology*. 2012;34(3):200-11. Epub 2012/10/17.
48. Kitagawa K, Niikura Y. Caspase-independent mitotic death (CIMD). *Cell Cycle*. 2008;7(8):1001-5. Epub 2008/04/17.
49. Basu A, DuBois G, Haldar S. Posttranslational modifications of Bcl2 family members--a potential therapeutic target for human malignancy. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2006;11:1508-21. Epub 2005/12/22.
50. Deng X, Kornblau SM, Ruvolo PP, May WS, Jr. Regulation of Bcl2 phosphorylation and potential significance for leukemic cell chemoresistance. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2001(28):30-7. Epub 2001/02/07.
51. Sjostrom J, Blomqvist C, von Boguslawski K, Bengtsson NO, Mjaaland I, Malmstrom P, et al. The predictive value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(3):811-6. Epub 2002/03/16.
52. Mrozek A, Petrowsky H, Sturm I, Kraus J, Hermann S, Hauptmann S, et al. Combined p53/Bax mutation results in extremely poor prognosis in gastric carcinoma

with low microsatellite instability. *Cell death and differentiation*. 2003;10(4):461-7. Epub 2003/04/30.

53. Oliveira C, Seruca R, Seixas M, Sobrinho-Simoes M. The clinicopathological features of gastric carcinomas with microsatellite instability may be mediated by mutations of different "target genes": a study of the TGFbeta RII, IGFII R, and BAX genes. *The American journal of pathology*. 1998;153(4):1211-9. Epub 1998/10/20.

54. Ruiz JL, Fernandes LR, Levy D, Bydlowski SP. Interrelationship between ATP-binding cassette transporters and oxysterols. *Biochemical pharmacology*. 2013. Epub 2013/03/19.

55. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome research*. 2001;11(7):1156-66. Epub 2001/07/04.

56. Ling V, Thompson LH. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *Journal of cellular physiology*. 1974;83(1):103-16. Epub 1974/02/01.

57. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta*. 1976;455(1):152-62. Epub 1976/11/11.

58. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(9):3004-8. Epub 1987/05/01.

59. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant

cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer research*. 1999;59(1):8-

13. Epub 1999/01/19.

60. Ross DD, Yang W, Abruzzo LV, Dalton WS, Schneider E, Lage H, et al. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(5):429-33. Epub 1999/03/10.

61. Mahadevan D, List AF. Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. *Blood*. 2004;104(7):1940-51. Epub 2004/06/26.

62. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(20):1536-46.

63. Smith LL. Cholesterol autoxidation 1981-1986. *Chemistry and physics of lipids*. 1987;44(2-4):87-125.

64. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999;142(1):1-28.

65. Bjorkhem I, Diczfalusy U. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(5):734-42.

66. Olkkonen VM. Macrophage oxysterols and their binding proteins: roles in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*. 2012;23(5):462-70. Epub 2012/07/21.

67. Luoma PV. Cytochrome P450--physiological key factor against cholesterol accumulation and the atherosclerotic vascular process. *Annals of medicine*. 2007;39(5):359-70.

68. Russell DW. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1529(1-3):126-35.
69. Wong J, Quinn CM, Brown AJ. Synthesis of the oxysterol, 24(S), 25-epoxycholesterol, parallels cholesterol production and may protect against cellular accumulation of newly-synthesized cholesterol. *Lipids in health and disease*. 2007;6:10.
70. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular aspects of medicine*. 2009;30(3):111-22.
71. Yan D, Olkkonen VM. Characteristics of oxysterol binding proteins. *International review of cytology*. 2008;265:253-85.
72. Yan D, Mayranpaa MI, Wong J, Perttinen J, Lehto M, Jauhiainen M, et al. OSBP-related protein 8 (ORP8) suppresses ABCA1 expression and cholesterol efflux from macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(1):332-40.
73. Bowden K, Ridgway ND. OSBP negatively regulates ABCA1 protein stability. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(26):18210-7.
74. Wyles JP, McMaster CR, Ridgway ND. Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(33):29908-18.
75. Wyles JP, Perry RJ, Ridgway ND. Characterization of the sterol-binding domain of oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 reveals a novel role in vimentin organization. *Experimental cell research*. 2007;313(7):1426-37.

76. Makishima M. Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *Journal of pharmacological sciences*. 2005;97(2):177-83.
77. Raghow R, Yellaturu C, Deng X, Park EA, Elam MB. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2008;19(2):65-73.
78. Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science*. 2000;290(5497):1721-6.
79. Meaney S, Bodin K, Diczfalusy U, Bjorkhem I. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: critical importance of the position of the oxygen function. *Journal of lipid research*. 2002;43(12):2130-5.
80. Parish EJ, Chitrakorn S, Luu B, Schmidt G, Ourisson G. Studies of the oxysterol inhibition of tumor cell growth. *Steroids*. 1989;53(3-5):579-96. Epub 1989/03/01.
81. Olkkonen VM. Oxysterol binding protein and its homologues: new regulatory factors involved in lipid metabolism. *Current opinion in lipidology*. 2004;15(3):321-7. Epub 2004/05/29.
82. Schroepfer GJ, Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiological reviews*. 2000;80(1):361-554. Epub 2000/01/05.
83. Ishimaru C, Yonezawa Y, Kuriyama I, Nishida M, Yoshida H, Mizushima Y. Inhibitory effects of cholesterol derivatives on DNA polymerase and topoisomerase activities, and human cancer cell growth. *Lipids*. 2008;43(4):373-82. Epub 2008/01/25.

84. Lizard G, Moisant M, Cordelet C, Monier S, Gambert P, Lagrost L. Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. *J Pathol.* 1997;183(3):330-8. Epub 1998/01/10.
85. Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Molecular aspects of medicine.* 2009;30(3):153-70. Epub 2009/03/03.
86. Carvalho JF, Silva MM, Moreira JN, Simoes S, Sa e Melo ML. Sterols as anticancer agents: synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR analysis. *Journal of medicinal chemistry.* 2010;53(21):7632-8. Epub 2010/10/12.
87. de Weille J, Fabre C, Bakalara N. Oxysterols in cancer cell proliferation and death. *Biochemical pharmacology.* 2013;86(1):154-60. Epub 2013/03/19.
88. Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiological reviews.* 2008;88(3):887-918.
89. Li W, Ghosh M, Eftekhari S, Yuan XM. Lipid accumulation and lysosomal pathways contribute to dysfunction and apoptosis of human endothelial cells caused by 7-oxysterols. *Biochemical and biophysical research communications.* 2011;409(4):711-6. Epub 2011/05/31.
90. Favero GM, Maranhao RC, Maria DA, Levy D, Bydlowski SP. Synthetic nanoemulsion resembling a protein-free model of 7-ketocholesterol containing low

density lipoprotein: In vitro and in vivo studies. *Biol Res.* 2010;43(4):439-44. Epub 2010/01/01.

91. Roussi S, Gosse F, Aoude-Werner D, Zhang X, Marchioni E, Geoffroy P, et al. Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7beta-hydroxysitosterol and 7beta-hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis.* 2007;12(1):87-96. Epub 2006/12/01.

92. Monier S, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, et al. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochemical and biophysical research communications.* 2003;303(3):814-24. Epub 2003/04/03.

93. Nury T, Zarrouk A, Mackrill JJ, Samadi M, Durand P, Riedinger JM, et al. Induction of oxiaoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7beta-hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol: Protective effects of alpha-tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids.* 2015. Epub 2015/02/17.

94. Travert C, Carreau S, Le Goff D. Induction of apoptosis by 25-hydroxycholesterol in adult rat Leydig cells: protective effect of 17beta-estradiol. *Reproductive toxicology.* 2006;22(4):564-70. Epub 2006/10/07.

95. Prunet C, Lemaire-Ewing S, Menetrier F, Neel D, Lizard G. Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7beta-hydroxycholesterol-induced cell death: a morphological and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol.* 2005;19(5):311-26. Epub 2005/11/18.

96. Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC, et al. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An Acad Bras Cienc.* 2001;73(1):57-69. Epub 2001/03/14.
97. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8. Epub 2002/02/16.
98. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics.* 2000;25(1):25-9. Epub 2000/05/10.
99. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1975;45(3):321-34. Epub 1975/03/01.
100. Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. K562--a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer.* 1979;23(2):143-7. Epub 1979/02/01.
101. Seigneurin D, Champelovier P, Mouchiroud G, Berthier R, Leroux D, Prenant M, et al. Human chronic myeloid leukemic cell line with positive Philadelphia chromosome exhibits megakaryocytic and erythroid characteristics. *Experimental hematology.* 1987;15(8):822-32. Epub 1987/09/01.
102. Maia RC, Silva EA, Harab RC, Lucena M, Pires V, Rumjanek VM. Sensitivity of vincristine-sensitive K562 and vincristine-resistant K562-Lucena 1 cells to anthracyclines and reversal of multidrug resistance. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al].* 1996;29(4):467-72. Epub 1996/04/01.

103. Ertel A, Verghese A, Byers SW, Ochs M, Tozeren A. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Molecular cancer*. 2006;5(1):55. Epub 2006/11/04.
104. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology*. 1992;148(7):2207-16. Epub 1992/04/01.
105. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(5):1545-56. Epub 1995/11/01.
106. He C, Zhu H, Zhang W, Okon I, Wang Q, Li H, et al. 7-Ketocholesterol induces autophagy in vascular smooth muscle cells through Nox4 and Atg4B. *The American journal of pathology*. 2013;183(2):626-37. Epub 2013/06/19.
107. Nury T, Zarrouk A, Vejux A, Doria M, Riedinger JM, Delage-Mourroux R, et al. Induction of oxiaoptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress, apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes: impairment by alpha-tocopherol. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;446(3):714-9. Epub 2013/12/05.
108. Lizard G, Monier S, Cordelet C, Gesquiere L, Deckert V, Gueldry S, et al. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular

wall. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 1999;19(5):1190-200. Epub 1999/05/14.

109. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science. 1998;281(5381):1309-12. Epub 1998/08/28.

110. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(9):621-32. Epub 2010/08/05.

111. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. Oncogene. 2004;23(16):2850-60. Epub 2004/04/13.

112. Mohamad N, Gutierrez A, Nunez M, Cocca C, Martin G, Cricco G, et al. Mitochondrial apoptotic pathways. Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica et al. 2005;29(2):149-61. Epub 2005/09/29.

113. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1995;9(13):1277-87. Epub 1995/10/01.

114. Han JH, Kim YJ, Han ES, Lee CS. Prevention of 7-ketocholesterol-induced mitochondrial damage and cell death by calmodulin inhibition. Brain research. 2007;1137(1):11-9. Epub 2007/01/17.

115. Miguët-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, et al. Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7beta-

hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. *Biochemical pharmacology*. 2002;64(3):527-41. Epub 2002/07/31.

116. Li W, Laskar A, Sultana N, Osman E, Ghosh M, Li Q, et al. Cell death induced by 7-oxysterols via lysosomal and mitochondrial pathways is p53-dependent. *Free radical biology & medicine*. 2012;53(11):2054-61. Epub 2012/09/19.

117. McStay GP, Green DR. Measuring apoptosis: caspase inhibitors and activity assays. *Cold Spring Harbor protocols*. 2014;2014(8):799-806. Epub 2014/08/03.

118. Luthra S, Fardin B, Dong J, Hertzog D, Kamjoo S, Gebremariam S, et al. Activation of caspase-8 and caspase-12 pathways by 7-ketocholesterol in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(12):5569-75. Epub 2006/11/24.

119. Ghelli A, Porcelli AM, Zanna C, Rugolo M. 7-Ketocholesterol and staurosporine induce opposite changes in intracellular pH, associated with distinct types of cell death in ECV304 cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2002;402(2):208-17. Epub 2002/06/08.

120. Gregorio-King CC, Collier FM, Bolton KA, Ferguson M, Hosking JB, Collier GR, et al. Effect of oxysterols on hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology*. 2002;30(7):670-8. Epub 2002/07/24.

121. Gregorio-King CC, Gough T, Van Der Meer GJ, Hosking JB, Waugh CM, McLeod JL, et al. Mechanisms of resistance to the cytotoxic effects of oxysterols in human leukemic cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2004;88(3):311-20. Epub 2004/05/04.

122. Low YL, Hwang PL. Lymphoma cells selected for resistance against the cytotoxic effect of oxygenated sterols are also resistant to nonsteroidal antiestrogens. *Biochimica et biophysica acta*. 1995;1269(1):32-40. Epub 1995/10/19.
123. Wang SF, Chou YC, Mazumder N, Kao FJ, Nagy LD, Guengerich FP, et al. 7-Ketocholesterol induces P-glycoprotein through PI3K/mTOR signaling in hepatoma cells. *Biochemical pharmacology*. 2013;86(4):548-60. Epub 2013/06/25.
124. Frezard F, Garnier-Suillerot A. Comparison of the membrane transport of anthracycline derivatives in drug-resistant and drug-sensitive K562 cells. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1991;196(2):483-91. Epub 1991/03/14.
125. Petriz J, Garcia-Lopez J. Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123. *Leukemia*. 1997;11(7):1124-30. Epub 1997/07/01.
126. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2006;5(1):144-56. Epub 2005/10/13.
127. Kim JW, Cho HS, Kim JH, Hur SY, Kim TE, Lee JM, et al. AAC-11 overexpression induces invasion and protects cervical cancer cells from apoptosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000;80(4):587-94. Epub 2000/04/26.
128. Sasaki H, Moriyama S, Yukiue H, Kobayashi Y, Nakashima Y, Kaji M, et al. Expression of the antiapoptosis gene, AAC-11, as a prognosis marker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001;34(1):53-7. Epub 2001/09/15.
129. Krejci P, Pejchalova K, Rosenbloom BE, Rosenfelt FP, Tran EL, Laurell H, et al. The antiapoptotic protein Api5 and its partner, high molecular weight FGF2, are up-

regulated in B cell chronic lymphoid leukemia. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82(6):1363-4. Epub 2007/09/11.

130. Morris EJ, Michaud WA, Ji JY, Moon NS, Rocco JW, Dyson NJ. Functional identification of Api5 as a suppressor of E2F-dependent apoptosis in vivo. *PLoS genetics*. 2006;2(11):e196. Epub 2006/11/23.

131. Garcia-Jove Navarro M, Basset C, Arcondeguy T, Touriol C, Perez G, Prats H, et al. Api5 contributes to E2F1 control of the G1/S cell cycle phase transition. *PloS one*. 2013;8(8):e71443. Epub 2013/08/14.

132. Rigou P, Piddubnyak V, Faye A, Rain JC, Michel L, Calvo F, et al. The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *EMBO J*. 2009;28(11):1576-88. Epub 2009/04/24.

133. Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, et al. Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS letters*. 2008;582(10):1564-8. Epub 2008/04/15.

134. Kikkawa N, Kinoshita T, Nohata N, Hanazawa T, Yamamoto N, Fukumoto I, et al. microRNA-504 inhibits cancer cell proliferation via targeting CDK6 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*. 2014;44(6):2085-92. Epub 2014/03/22.

135. Zhong X, Safa AR. Phosphorylation of RNA helicase A by DNA-dependent protein kinase is indispensable for expression of the MDR1 gene product P-glycoprotein in multidrug-resistant human leukemia cells. *Biochemistry*. 2007;46(19):5766-75. Epub 2007/04/20.

136. Seo SB, Hur JG, Kim MJ, Lee JW, Kim HB, Bae JH, et al. TRAIL sensitize MDR cells to MDR-related drugs by down-regulation of P-glycoprotein through inhibition of DNA-PKcs/Akt/GSK-3 β pathway and activation of caspases. *Molecular cancer*. 2010;9:199. Epub 2010/07/29.
137. Galligan JJ, Petersen DR. The human protein disulfide isomerase gene family. *Human genomics*. 2012;6:6. Epub 2012/12/19.
138. Zhao G, Lu H, Li C. Pro-apoptotic activities of PDI and PDIA3: a role of Bcl-2 protein Bak. *The Journal of biological chemistry*. 2015. Epub 2015/02/24.
139. Muller C, Bandemer J, Vindis C, Camare C, Mucher E, Gueraud F, et al. Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;18(7):731-42. Epub 2012/10/23.
140. Palozza P, Simone R, Catalano A, Boninsegna A, Bohm V, Frohlich K, et al. Lycopene prevents 7-ketocholesterol-induced oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis in human macrophages. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2010;21(1):34-46. Epub 2009/01/23.
141. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, et al. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(24):10703-17. Epub 2004/12/02.
142. Sanson M, Auge N, Vindis C, Muller C, Bando Y, Thiers JC, et al. Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention

by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circulation research*. 2009;104(3):328-36.

Epub 2008/12/25.

143. Johnson BH, Russell MJ, Krylov AS, Medh RD, Ayala-Torres S, Regner JL, et al. Structure-apoptotic potency evaluations of novel sterols using human leukemic cells. *Lipids*. 2000;35(3):305-15. Epub 2000/04/27.

144. Ayala-Torres S, Moller PC, Johnson BH, Thompson EB. Characteristics of 25-hydroxycholesterol-induced apoptosis in the human leukemic cell line CEM. *Experimental cell research*. 1997;235(1):35-47. Epub 1997/08/25.

145. Ayala-Torres S, Zhou F, Thompson EB. Apoptosis induced by oxysterol in CEM cells is associated with negative regulation of c-myc. *Experimental cell research*. 1999;246(1):193-202. Epub 1999/01/12.

146. Christ M, Luu B, Mejia JE, Moosbrugger I, Bischoff P. Apoptosis induced by oxysterols in murine lymphoma cells and in normal thymocytes. *Immunology*. 1993;78(3):455-60. Epub 1993/03/01.