

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MANOELLA ABRÃO DA COSTA



PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE LISE CELULAR PARA OBTENÇÃO DE RNA
TOTAL DE DIFERENTES TECIDOS

CURITIBA

2022

MANOELLA ABRÃO DA COSTA

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE LISE CELULAR PARA OBTENÇÃO DE RNA
TOTAL DE DIFERENTES TECIDOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Glaucio Valdameri
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Vivian Rotuno Moure

CURITIBA
2022

Costa, Manoella Abrão da

Padronização de técnica de lise celular para obtenção de RNA total de diferentes tecidos [recurso eletrônico] / Manoella Abrão da Costa – Curitiba, 2022.
1 recurso online: PDF.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Glaucio Valdameri

Coorientador: Profa. Dra. Vivian Rotuno Moure

1. Preparações farmacêuticas. 2. Biomarcadores. 3. Biologia molecular.
4. Neoplasias. 5. Resistência à múltiplos medicamentos. I. Valdameri, Glaucio.
II. Moure, Vivian Rotuno. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MANOELLA ABRÃO DA COSTA** intitulada: **Padronização de técnica de lise celular para obtenção de RNA total de diferentes tecidos**, sob orientação do Prof. Dr. GLAUCIO VALDAMERI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Julho de 2022.

GLAUCIO VALDAMERI

Presidente da Banca Examinadora

JEANINE MARIE NARDIN

Avaliador Externo (HOSPITAL ERASTO GAERTNER)

FABIANE GOMES DE MORAES REGO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esse trabalho aos meus pais e meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado, dando apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, que esteve presente em toda essa jornada, dando capacidade, força e principalmente paciência.

Agradeço também a Universidade Federal do Paraná (UFPR) pela oportunidade de estar realizando esse trabalho e pela CAPES pelo financiamento do projeto.

Agradeço aos meus pais e irmãos, que tiveram paciência e sempre estiveram me dando apoio, força e incentivo. Sei o quanto estão orgulhosos da conclusão de mais essa etapa em minha vida

Agradeço ainda ao meu Orientador, Prof^o Dr. Glaucio Valdameri, e minha Co-orientadora Prof^a Dr^a Vivian Rotuno Moure, que me ensinaram tanto neste tempo e estiveram a disposição para me ajudar.

Agradeço meus amigos do LCDR, Diego, Diogo, Isadora, Isabelle, Ingrid, Julia, Kelly e Marina, que fizeram com que esses anos fossem mais leves, e estiveram sempre dando o apoio necessário para tornar os dias e experimentos mais tranquilos.

Agradeço, minha parceira de mestrado Giovana, que principalmente nessa etapa final, me deu força e acreditou no meu potencial, me ajudando a persistir mesmo quando parecia que as forças estavam sumindo.

"It is our choices, Harry, that show what we truly are, far more than our abilities."

-Albus Dumbledore

RESUMO

A medida que o conhecimento sobre uma variedade de doenças avança, tornou-se mais preciso as formas de prevenção, diagnóstico e tratamento. Os biomarcadores vêm sendo utilizados como ferramentas de auxílio na compreensão da predição, causa, diagnóstico, progressão, regressão ou resultado clínico de um tratamento ou doença. O rápido desenvolvimento das técnicas de biologia molecular ampliou a aplicabilidade dos biomarcadores. O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e a resistência à múltiplas drogas (MDR) é o maior desafio clínico para a eficácia do tratamento. Dentre os vários mecanismos de MDR, o aumento da expressão de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) é considerado o principal. Transportadores ABC têm um papel fisiológico no transporte de diversos compostos através da membrana plasmática às custas da ligação e hidrólise de ATP. O reconhecimento de compostos estruturalmente não relacionados como substratos permite que quimioterápicos também sejam transportados, o que leva à diminuição do acúmulo intracelular e conseqüentemente falha no tratamento quimioterápico em pacientes oncológicos. Portanto, é crucial identificar quais são os transportadores ABC superexpressos em diferentes tipos de câncer. Entretanto, existem vários desafios de padronizações de métodos e condições experimentais para determinar a expressão gênica em amostras clínicas. Por isso, o objetivo deste estudo foi a padronização de uma técnica de lise celular de diferentes tipos de tecidos para a extração de RNA total utilizando o TRIzol. Neste estudo foi desenvolvido um homogeneizador de baixo custo que eficientemente promoveu o rompimento de tecidos, possibilitando a obtenção de RNA total de alta qualidade e em grandes quantidades.

Palavras-chave: extração de RNA total; TRIzol; rompimento de lise celular; biomarcadores

ABSTRACT

The increased knowledge about a variety of diseases improved the prevention, diagnosis, and treatment. Biomarkers have been used as tools to improve the prediction, cause, diagnosis, progression, regression or clinical outcome of a treatment or disease. The rapid development of molecular biology techniques has expanded the applicability of these biomarkers. Cancer is one of the leading causes of death worldwide and multidrug resistance (MDR) is the most significant clinical challenge to treatment effectiveness. Among the various mechanisms of MDR, the increased expression of ABC transporters (ATP-Binding cassette) is considered critical. ABC transporters have a physiological role in the extrusion of various compounds across the plasma membrane. This efflux is mediated by the binding and ATP hydrolysis. The recognition of structurally unrelated compounds as substrates allows the transport of chemotherapeutics, which promote a significant decrease in the intracellular levels and consequently failure of clinical treatment of oncological patients. Therefore, it is crucial to identify which ABC transporters are overexpressed in different types of cancer. However, there are several challenges to the standardization of methods and experimental conditions to study the expression levels in clinical samples. Thus, the goal of this study was the standardization of a protocol of cell lysis for different types of tissues compatible with total RNA extraction using TRIzol. In this study, a low-cost homogenizer was developed that efficiently promoted tissue disruption, making it possible to obtain high quality total RNA in large quantities.

Keywords: RNA extraction; TRIzol; biopsy; cancer; ABC transporters, biomarkers

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - NÚMERO ESTIMADO DE NOVOS CASOS EM 2020, EM AMBOS OS SEXOS E EM TODAS AS IDADES.....	15
FIGURA 2 - MECANISMOS CELULARES QUE PODEM ACARRETAR A RESISTÊNCIA À MÚLTIPLAS DROGAS.....	16
FIGURA 3 - ESTRUTURAS DOS TRANSPORTADORES ABCG2, ABCB1 E ABCC1	18
FIGURA 4 - MECANISMO DE TRANSPORTE DOS SUBSTRATOS EM TRANSPORTADORES ABC.....	19
FIGURA 5 - HOMOGENEIZADOR POWERLYZER 24 QUIAGEN	20
FIGURA 6 - TISSUERUPTOR QUIAGEN	21
FIGURA 7 - HOMOGENIZAÇÃO LIQUIDA	22
FIGURA 8 - SONICADOR.....	23
FIGURA 9 - MOAGEM MANUAL	24
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DAS FASES DURANTE A EXTRAÇÃO DE RNA COM TRIZOL.....	28
FIGURA 11 - GÉIS DE RNA DE CÉLULAS H460 E DIFERENTES TIPOS DE BIÓPSIAS.....	33
FIGURA 12 - COLETA DE BIOPSIA DE MAMA	35
FIGURA 13 - GÉIS DE RNA UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS PARA A REALIZAÇÃO DA LISE CELULAR.	36
FIGURA 14 - PROTÓTIPO 1 PARA REALIZAÇÃO DA RUPTURA CELULAR.....	39
FIGURA 15 - GÉIS DE RNA EXTRAÍDO DE BIÓPSIAS LISADAS COM OS PROTÓTIPOS 1 E 2	40
FIGURA 16 - PROTÓTIPO 2 PARA REALIZAÇÃO DA RUPTURA CELULAR.....	41
FIGURA 17 - PROTOCOLO PADRONIZADO DE EXTRAÇÃO DE RNA DE AMOSTRAS DE CÉLULAS E TECIDOS COM TRIZOL.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIFERENTES COMBINAÇÕES DE BEADS DE AÇO E TEMPO	37
TABELA 2 - COMPARATIVO DOS METODOS DE LISE CELULAR.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	BIOMARCADORES.....	14
2.2	CANCER	14
2.3	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	15
2.3.1	TRANSPORTADORES ABC (ATP-BINDING CASSETTE).....	17
2.4	MÉTODOS DE LISE CELULAR	19
2.4.1	MÉTODOS MECÂNICOS.....	20
2.4.1.1.	BEADS20	
2.4.1.2.	HOMOGENEIZADOR.....	21
2.4.1.3.	HOMOGENEIZAÇÃO LÍQUIDA	21
2.4.1.4.	SONICAÇÃO	22
2.4.1.5.	MOAGEM MANUAL	23
2.5.	EXTRAÇÃO DE RNA	24
2.5.1	SOLUÇÕES À BASE DE FENOL-GUANIDINA ISOTIOCIANATO (TRIZOL).....	26
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4.	MATERIAIS E METODOS.....	29
4.1	AMOSTRA.....	29
4.2.1.	PREPARO DA AMOSTRA	29
4.2.2.	EXTRAÇÃO COM TRIZOL.....	30
4.2.3.	QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DO RNA	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7.	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Os biomarcadores são considerados pilares da medicina, sendo atualmente empregados antes de intervenções terapêuticas ou posteriormente, como indicadores de resposta de tratamentos farmacológicos (CARINE, et.al., 2019)

O câncer é considerado a segunda principal causa de morte no mundo (OPAS, 2022). Ainda, sabe-se que o fenômeno de resistência à múltiplas drogas (MDR) é um dos maiores desafios clínicos da oncologia atual. Um dos principais mecanismos de MDR é a superexpressão de transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) (ROBEY et al., 2018a; SZAKÁCS et al., 2006).

Uma das formas de estudar o processo de MDR mediado pelos transportadores ABC em pacientes com câncer é através de análises a nível transcricional destes transportadores, utilizando o ácido ribonucleico (RNA) extraído de amostras. Pensando na obtenção do RNA total de amostras de biopsias coletadas de pacientes oncológicos, no presente estudo foram testadas diversas metodologias para rompimento de tecido celular usando diferentes tecidos, vislumbrando futuras análises de expressão gênica de transportadores ABC em amostras de pacientes com câncer.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMARCADORES

Em 2001, o termo biomarcador foi definido como uma característica que pode ser objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais ou patogênicos, sendo utilizado para uma resposta terapêutica (HUSS, 2015). Estes incluem o estudo de genes, proteínas, respostas imunes celulares, características histológicas de um tecido e até mesmo características anatômicas e estruturais, visualizadas em exames de radiografia, ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ressonância magnética (ROBINSON, et.al; 2013).

Os biomarcadores auxiliam no prognóstico de pacientes através de duas maneiras: 1) identificação de pacientes com risco aumentado e 2) Identificação de subgrupos de pacientes com maior probabilidade de responder a um tratamento específico (SARMA, et.al., 2019).

Na clínica, existem diversos tipos de biomarcadores, como o colesterol (doença cardiovascular), glicose sérica (Diabetes mellitus), BRCA-1 e BRCA-2 (câncer de mama), entre outros (PARIKH,et.al., 2007). No contexto oncológico, os biomarcadores tumorais são macromoléculas, como proteínas, presentes no tecido tumoral, sangue ou em outro líquido biológico. A presença desse biomarcador, ou alterações nos seus níveis basais, se relacionam com o crescimento ou aparecimento de células neoplásicas, dessa forma indicando a presença do tumor (CONTE, et.al., 2021).

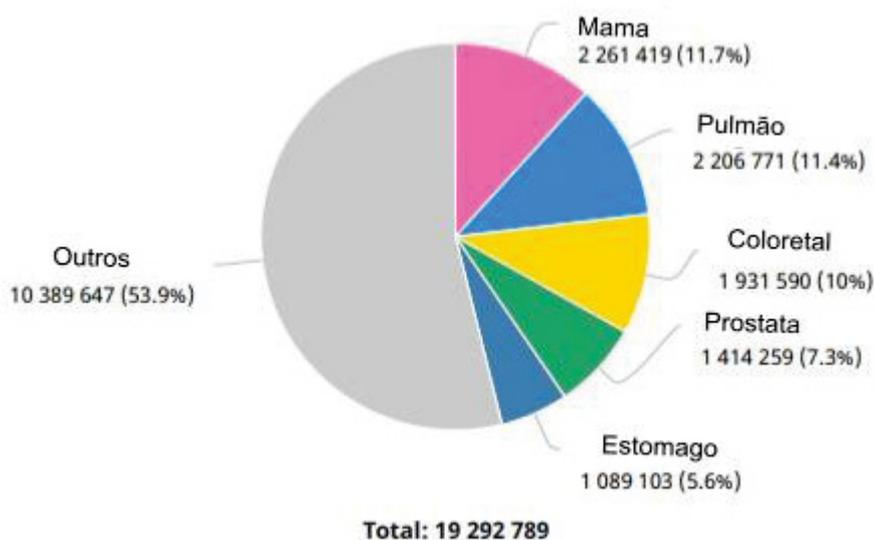
2.2 CANCER

Câncer é um termo que abrange um conjunto de mais de 100 doenças, caracterizadas por um crescimento desordenado das células, que podem invadir outros tecidos e órgãos (INCA, 2018).

O câncer é uma das principais causas de morte e constitui uma barreira importante para o aumento da expectativa de vida (SUNG, 2021). Segundo os dados coletados pelo observatório global de câncer (GLOBOCAN), da organização mundial de saúde (OMS), em 2020 o número estimado de novos casos a nível mundial foi em torno de 19 milhões casos. Como pode ser observado na figura 1, o câncer de mama e pulmão são os mais prevalentes, cada um ultrapassando mais de 2,2 milhões de

casos (GLOBOCAN, 2020). No Brasil, segundo o instituto nacional do câncer (INCA), a estimativa para o ano de 2020 foi em torno de 449.090 novos casos. Na população masculina, o câncer de próstata está em primeiro lugar (29,2%), seguido pelo cancer de cólon e reto (9,1%), e traqueia, brônquio e pulmão (7,9%). Já na população feminina, o câncer de mama lidera a incidência (29,7%), sendo seguido pelo câncer de cólon e reto (9,2%) e colo do útero (7,5%) (INCA, 2020).

FIGURA 1 - NÚMERO ESTIMADO DE NOVOS CASOS EM 2020, EM AMBOS OS SEXOS E EM TODAS AS IDADES



FONTE: Adaptado (GLOBOCAN,2020).

NOTA: Números estimados de novos casos de câncer, separados por tipos de câncer mais incidentes, à nível mundial, para o triênio de 2020-2022.

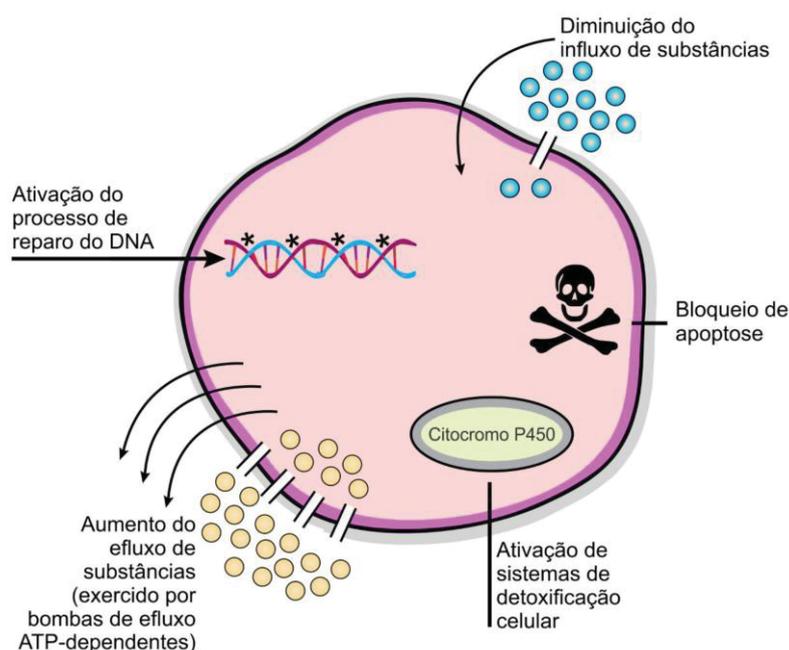
2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Um dos maiores desafios enfrentados no tratamento de diversos tipos de câncer é a resistência à quimioterapia antineoplásica. As manifestações clínicas desta resistência aos medicamentos estão relacionadas a diversos fatores, podendo ser estes relacionados ao hospedeiro, como fatores não genéticos (dieta, adesão ao tratamento) e genéticos (histórico familiar, metabolismo), e fatores relacionados ao tumor. Na figura 2, pode ser observados fatores celulares que acarretam o fenômeno de MDR, como diminuição da captação ou sequestro do medicamento, enzimas alvo alteradas, alteração do metabolismo do medicamento, aumento no reparo de danos ao DNA, falha dos mecanismos reguladores da morte celular e efluxo de medicamentos mediado pelos transportadores ABC (SZAKACS et. al., 2006).

Um fenômeno conhecido como resistência à múltiplas drogas (do inglês: *multidrug resistance* – MDR) ocorre quando a célula neoplásica apresenta uma resistência simultânea para diversos quimioterápicos diferentes, que não possuem o mesmo mecanismo de ação e nem similaridade química. A MDR é uma barreira frequente para o tratamento farmacológico do câncer e a elucidação dos mecanismos moleculares e bioquímicos relacionados com essa resistência constitui um dos maiores alvos na pesquisa oncológica (ROBEY et al., 2018, GOTTESMAN, 2002).

A terapia medicamentosa antineoplásica também pode contribuir para o quadro clínico da MDR, pois em alguns casos permite o surgimento de células menos sensíveis ao próprio regime terapêutico (SZAKÁCS et al., 2014). Essa condição se deve ao desenvolvimento e ativação de mecanismos bioquímicos relacionados com a resistência, resultando em uma diminuição da sensibilidade à terapia, fenômeno chamado de resistência adquirida (BORST, 2012).

FIGURA 2 - MECANISMOS CELULARES QUE PODEM ACARRETAR A RESISTÊNCIA À MÚLTIPLAS DROGAS.



FONTE: Zanzarine, 2019

NOTA: Existem diversos mecanismos envolvidos no processo de MDR, incluindo: o aumento de efluxo de drogas quimioterápicas através de bombas de efluxo como os transportadores ABC, a redução do influxo de drogas que penetram na célula através de carreadores intracelulares ou endocitose, a ativação de proteínas detoxificantes, como a oxidases do citocromo P450, a ativação de mecanismos de reparo de danos induzidos por drogas no DNA e o bloqueio de cascatas de sinalização apoptótica onde tornam a célula resistente à morte celular induzida por drogas.

2.3.1 TRANSPORTADORES ABC (ATP-BINDING CASSETTE)

Os transportadores ABC são proteínas que realizam a translocação de substâncias pelas membranas celulares, sendo esse processo dependente da energia fornecida através da ligação e hidrólise de moléculas de ATP (HIGGINS, 1992). Estes transportadores estão presentes em todos os reinos e possuem diversas atividades biológicas. Os transportadores ABC são divididos em 4 grandes grupos, sendo os três primeiros constituídos por proteínas de membrana: (i) importadores de nutrientes (em sua maioria transportadores ABC bacterianos), (ii) exportadores de diversos compostos, como peptídeos, metabólitos e xenobióticos, (iii) canais iônicos ou reguladores e (iv) proteínas ABC que não possuem domínios transmembrana (TMDs) (SZÖLLŐSI et al., 2018).

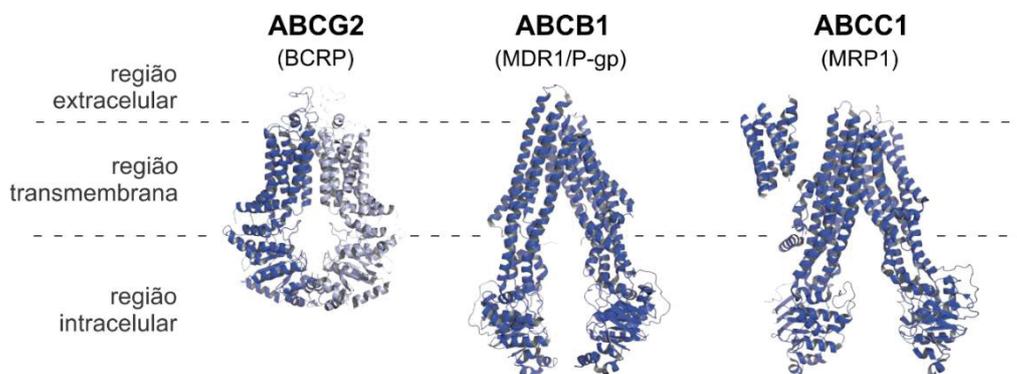
A grande família de proteínas ABC possui mais de 2.000 exemplares identificadas (DASSA, et. al., 2001). No genoma humano existem 48 genes que codificam para as proteínas da família ABC, classificados em sete subfamílias, começando pela subfamília A e finalizando com a subfamília G (SZAKACS et.al. 2006). Estes transportadores estão envolvidos com o efluxo de drogas e sabe-se que pelo menos 20 transportadores ABC estão envolvidos com a exportação de quimioterápico (WEEN et.al., 2015).

Movidos pela energia fornecida por moléculas de ATP, os transportadores ABC realizam o transporte unidirecional das drogas pela membrana plasmática (LITMAN et al., 2001). Além do seu papel na MDR, os transportadores ABC possuem grande importância fisiológica em processos de detoxificação celular e excreção de metabólitos endógenos, como sais biliares, ácido úricoglicuronídeo de bilirrubina, lipídeos, ânions orgânicos (BORST, et.al.,2002) Conseqüentemente, variações genéticas em, pelo menos 14 genes que codificam para transportadores ABC causam doenças como fibrose cística, doença de Stargardt, Tangier, adrenoleucodistrofia e gota (ŠTEFKOVÁ, et.al., 2004).

As proteínas ABC são divididas de acordo com a sequência genética dos seus domínios de ligação a nucleotídeos (do inglês: *nucleotide-binding domains* – NBDs) (DEAN; RZHETSKY; ALLIKMETS, 2001; HIGGINS, 1992). Como observado na figura 3, a estrutura básica dos transportadores ABC é compreendida por 2 TMDs e 2 NBDs.

Em alguns casos, a citar a subfamília C (ABCC), pode-se observar um terceiro TMD, com função desconhecida até a presente data (ROBEY et al., 2018).

FIGURA 3 - ESTRUTURAS DOS TRANSPORTADORES ABCG2, ABCB1 E ABCC1

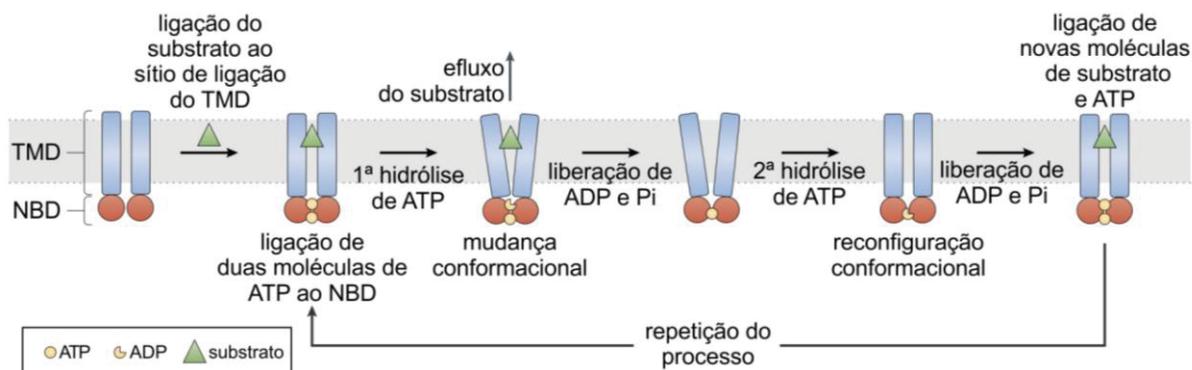


Fonte: Adaptado (ROBEY et al., 2018).

NOTA: Estruturas dos transportadores ABCG2 ou BCRP (*breast cancer resistance protein*), MDR1 ou ABCB1 ou PG-P (glicoproteína P), ABCC1 ou MRP1 (*multidrug resistance associated protein-1*).

O ciclo de transporte pelos transportadores ABC tem seu início quando o substrato se liga aos TMDs. Após isso, duas moléculas de ATP se ligam aos NBDs, que se aproximam, e com isso ocorre uma mudança conformacional nos TMDs, permitindo o efluxo dos substratos para fora das células. O transporte do substrato e a hidrólise do ATP é concomitante e permite que o transportador retorne a sua conformação original, para um novo ciclo (Fig. 4) (LOCHER, 2016).

FIGURA 4 - MECANISMO DE TRANSPORTE DOS SUBSTRATOS EM TRANSPORTADORES ABC.



Fonte: Adaptado (ROBEY et al., 2018).

NOTA: Representação esquemática da atividade de efluxo de substratos realizada pelos principais transportadores ABC relacionados à MDR.

2.4 MÉTODOS DE LISE CELULAR

Lise celular é o processo em que ocorre a ruptura da membrana plasmática da célula e liberação do material intracelular. A eficiência do processo de lise celular para cada tecido e órgão envolve diversos fatores, como o tipo celular, densidade, conteúdo lipídico e espessura (CRAPO, et.al., 2011).

Existem diferentes métodos para realizar a lise celular, que podem ser classificados como mecânicos e não mecânicos (GECIOVA, et.al., 2002; LIU, et.al., 2013). Os métodos mecânicos são aqueles métodos que requerem algum tipo de força mecânica física sem adição de produtos químicos ou enzimas (GECIOVA, et.al., 2002; Liu, et.al., 2013). Em contrapartida, os métodos não mecânicos são conhecidos como suaves, pois geralmente são menos agressivos para as células (PETERNEL, 2013). Ainda, estes podem ser divididos em físicos (choque osmótico, termólise, congelamento e descongelamento), enzimáticos (lise enzimática) e químicos (solventes, EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético - e detergentes) (PETERNEL, 2013).

2.4.1 MÉTODOS MECÂNICOS

Dentre os métodos mecânicos podemos destacar dois: baseados em beads e homogeneizadores.

2.4.1.1. BEADS

O uso de beads (esferas), normalmente constituídas de vidro, cerâmica ou aço, é amplamente utilizado como método de rompimento de células. Usualmente, as beads são misturadas com uma amostra biológica de células ou tecido em meio líquido (principalmente solvente orgânico. Na presente técnica, a mistura de amostra e as beads é agitada intensamente por um determinado período. Durante esse processo, as esferas colidem com a amostra biológica, promovendo a lise celular (Fig. 5) (HOPKINS, 1970; GÜNERKEN, et.al., 2015; CAREVIC, et.al., 2015).

Um exemplo desse modelo de homogeneizador disponível no mercado é o PowerLyzer 24 (Fig. 5), fabricado pela Qiagen. Este equipamento possui capacidade de processar 24 amostras por vez em tubos de 2 mL. Segundo o fabricante, a homogeneização é rápida (aproximadamente 30 segundos).

FIGURA 5 - HOMOGENEIZADOR POWERLYZER 24 QUIAGEN



FONTE: Qiagen (2022)

2.4.1.2. HOMOGENEIZADOR

Nos homogeneizadores o material biológico é triturado por um rotor localizado na extremidade de um eixo. Como representado na figura 6, o rotor gira em determinada rotação dentro de um estator ou sonda estática. O material biológico triturado extravasa através de ranhuras ou furos localizados na ponta do estator. Como o rotor trabalha em velocidades muito altas, o tecido é reduzido em tamanho por uma combinação de forças de cisalhamento líquidas e cisalhamento mecânico tipo tesoura que ocorre na ponta do eixo (GOLDBERG, 2010). Dependendo da dureza da amostra de tecido, os resultados desejados são obtidos rapidamente (5 - 60 segundos).

A empresa Qiagen possui um equipamento portátil, chamado de TissueRuptor (Fig.6), que possui uma lâmina giratória que atinge altas velocidades levando assim a ruptura e homogeneização da amostra.

FIGURA 6 - TISSUERUPTOR QUIAGEN



FONTE: American Laboratory Trading

2.4.1.3. HOMOGENEIZAÇÃO LÍQUIDA

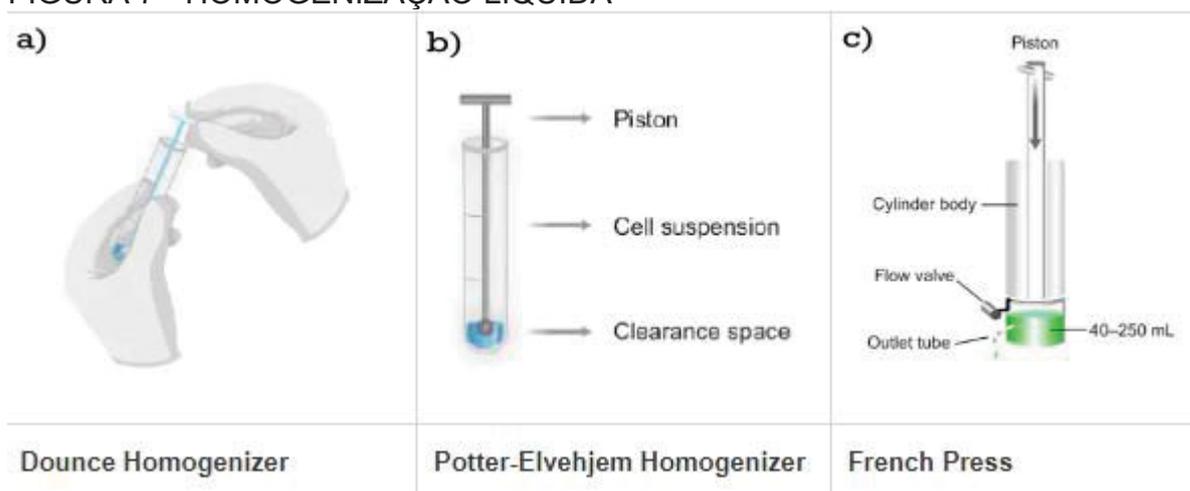
Essa técnica tem como principal mecanismo realizar a lise das células através de uma pressão aplicada a suspensão celular ou tecidual em um espaço estreito. (TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2009). O homogeneizador Dounce, se baseia em empurrar a amostra entre os lados de um tubo de vidro com um pistão. A amostra é inserida no tubo, e conforme o pistilo se movimenta, realizando uma pressão, as forças

de cisalhamento vão sendo criadas, e isto faz com que a amostra seja cortada repetidamente (Fig. 7.a.) (TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2009; BURDEN, 2008).

O homogeneizador PotterElvehjem (Fig. 7.b.), o pistilo é conectado há um motor de laboratório que possui velocidade variável, dessa forma quando a amostra é colocada em contato com o pistilo em giro, o tubo onde a amostra se encontra é pressionado, fazendo com que dessa forma as forças de cisalhamento geradas rompam a amostra (TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2009 ; BURDEN, 2008).

A prensa francesa (Fig. 7.c.), um outro modelo de homogeneizador, a lise celular ocorre quando o pistilo aplica uma alta pressão nas células forçando as mesmas através de um pequeno orifício. A medida que ocorre a alternância de alta pressão para baixa pressão, ocorre a expansão das células, fazendo com que as mesmas rompam (TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2009 ; BURDEN, 2008).

FIGURA 7 - HOMOGENIZAÇÃO LIQUIDA



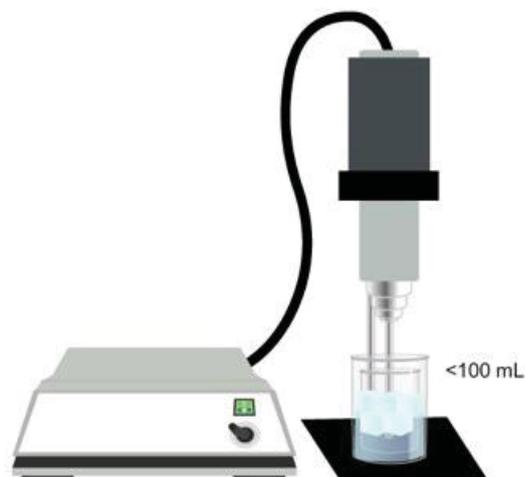
FONTE: Adaptado (ThermoFisher, 2022)

2.4.1.4. SONICAÇÃO

Esse método utiliza uma pressão criada por uma sonda, que irá se expandir e se contrair em altas frequências, gerando uma oscilação de alta frequência, devido a corrente oscilante aplicada nos cristais presentes na sonda de metal. Quando a corrente é aplicada, eles se contraem, e quando ocorre a inversão da corrente, eles se expandem. Essa oscilação gera pequenas ondas de choque, que transferem a energia para a sonda de metal, focando dessa forma em uma pequena área, de modo

extremo. Através dessa oscilação de expansão e contração dos cristais na sonda, fenômeno conhecido como cavitação, ocorre a ruptura das células. O equipamento utilizado para este tipo de lise celular é o sonicador (Fig.8) (TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2009 ; BURDEN, 2008).

FIGURA 8 - SONICADOR



FONTE: ThermoFisher (2022)

2.4.1.5. MOAGEM MANUAL

Essa metodologia é uma das mais utilizadas, e baseia-se na formação de uma fricção quando a amostra entra em contato com duas superfícies duras, normalmente o grau e pistilo (Fig.9) , que deslizam uma contra a outra. Dessa forma, essa moagem faz com que as amostras se rompam. O atrito gerado devido ao contato das superfícies duras, pode ser significativo pois gera calor, dessa forma, normalmente utiliza-se amostras congeladas com nitrogênio líquido para evitar que esse fator colabore com a degradação analitos, como por exemplo o RNA (BURDEN, 2008).

FIGURA 9 - MOAGEM MANUAL



FONTE: ThermoFisher (2022)

2.5. EXTRAÇÃO DE RNA

O isolamento do RNA total é importante em estudos de expressão gênica, seja em análises de um único alvo por técnicas como RT-qPCR ou por análises de larga escala, como RNA-Seq. Uma das maiores dificuldades em trabalhar com RNA é a sua rápida degradação. Para evitar essa degradação, as amostras biológicas (células/tecidos) devem ser imediatamente congeladas em -80°C ou nitrogênio líquido até o processamento. Mesmo após a obtenção do RNA total, esse também deve ser imediatamente congelado em -80°C ou nitrogênio líquido (MASOODI, et.al. 2020; CHOMEZYNSK, et.al., 2006). Outra possibilidade para evitar a degradação é através do uso de reagentes como o RNA Later, uma solução aquosa, de estabilização e armazenamento de RNA tecidual, que permeia o tecido com o intuito de estabilizar e proteger o RNA celular.

Diversos fatores podem interferir com o rendimento da extração, bem como na qualidade do RNA, a citar o excesso de tecido na solução de extração. Outro ponto crítico durante a extração, solubilização e armazenamento de RNA é evitar contaminação com RNase (PUISSANT, et.al., 1990; CHOMEZYNSKI, et. al, 2006).

A obtenção de RNA intacto e de alta qualidade é um critério essencial para análises da expressão gênica (PETRY et. al., 2013). Uma metodologia amplamente utilizada para se avaliar a integridade do RNA é através dos métodos eletroforéticos, como a utilização de um gel de agarose corado com brometo de etídio. Esse método permite a separação e a visualização de bandas referentes aos RNA ribossômicos

(rRNA) 28S e 18S. Um RNA integro e de boa qualidade é aquele em que se observa as duas bandas, onde a banda 28S deve apresentar um tamanho maior que a banda 18S (SCHROEDER et.al.; 2006).

A quantificação do RNA pode ser realizada por métodos espectrofotométricos. Um dos equipamentos mais utilizados para esse fim é o NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers da ThermoScientific, que permite a quantificação do RNA da amostra empregando um volume de 1 µL. Nesse equipamento, há a presença de uma fibra ótica (fibra receptora) embutida no pedestal e outra fibra ótica, chamada de fibra (fibra de origem) em contato com a amostra. Quando a amostra líquida é colocada no equipamento, irá preencher a lacuna presente entre as duas fibras óticas. Com isso a lâmpada de flash de xenônio pulsado, fornece uma fonte de luz e o espectrômetro com uma matriz de *charge couple device* (CCD) irá detectar a luz que passa pela amostra. O valor da absorbância obtida em 260nm será utilizado no cálculo para obtenção do valor da concentração da amostra (THERMOSCIENTIFIC, 2010).

Para realizar a quantificação dos ácidos nucleicos, é necessário primeiramente fazer uma medição de uma amostra chamada de “branco” (utilizando a água). Essa amostra “branco” será utilizada como referência (zero). Após a leitura do branco, é realizada a medição da amostra. Utilizando o resultado do branco e da amostra, é realizado um cálculo para obter a absorbância de cada amostra, conforme a equação abaixo:

$$\text{Absorbância} = -\log [\text{Intensidade da amostra}/\text{intensidade branco}]$$

Com o resultado dessa absorbância, é possível utilizar uma modificação da equação de Lambert-Beer, correlacionando a absorbância calculada com a concentração, como mostrado na equação abaixo:

$$A = \epsilon * b * c$$

Onde, “A” é a absorbância representada em unidades arbitrárias (AU), “ ϵ ” é o coeficiente de absorvidade molar dependente do comprimento de onda (ou coeficiente de extinção) com unidade de $\text{litro mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, “b” comprimento do caminho em cm e “c” concentração da substância a analisar em mol/litro ou molaridade (M).

Para a quantificação de ácidos nucleicos, é realizada uma modificação da equação de Lambert-Beer, para utilizar um fator com unidades $(\mu\text{g/mL})^{-1}(\text{cm})^{-1}$, como mostrada abaixo:

$$c = (A * \mathcal{E}) / b$$

onde “c” é a concentração do ácido nucleico em $\text{ng}/\mu\text{L}$; “A” é a absorbância em AU; “ \mathcal{E} ” é o coeficiente de extinção dependente do comprimento de onda em $(\mu\text{g/mL})^{-1}(\text{cm})^{-1}$; e “b” é o comprimento do caminho em cm. As medições que este aparelho realiza utilizam comprimentos de percurso de 0,05 mm a 1,0 mm (dependente do modelo). Esse comprimento de percurso é a distância entre as fibras ópticas embutidas nas superfícies de medição superior e inferior (THERMOSCIENTIFIC, 2010).

Além de fornecer a concentração da amostra, esse tipo de equipamento fornece indicadores de pureza da amostra através das razões das absorbâncias 260/280 e 260/230. Em amostras de RNA de alta qualidade, a razão $A_{260/280}$ deve apresentar valores em torno de 1,8-2,0. Valores fora dessa faixa indicam que há contaminação de proteínas na amostra. Já a razão $A_{260/230}$ deve apresentar valores na faixa de 1,8-2,2. Valores fora dessa faixa é indicativo de presença de fenol residual (THERMOSCIENTIFIC, 2010).

2.5.1 SOLUÇÕES À BASE DE FENOL-GUANIDINA ISOTIOCIANATO (TRIzol)

Existem três técnicas principais amplamente utilizadas para extração de RNA: extração orgânica, como soluções à base de fenol-guanidina isotiocianato (GITC), tecnologia de coluna de rotação baseada em membrana de sílica (*silica-membrane based spin column*) e tecnologia de partículas (para)magnéticas (TAN, et.al, 2009; BERENSMIER, 2006).

Vários kits comerciais estão disponíveis para purificação de ácidos nucleicos em fase sólida baseados em sílica (por exemplo, RNeasy Mini Kit, Qiagen; GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich; Nucleospin RNA II isolation kit, Macherey-Nagel; High Pure RNA Isolation Kit, Roche Diagnostics; AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep, Axygen) ou partículas magnéticas (por exemplo, AGOWA mag, Agowa; MagneSil, Promega; MGP, Roche Diagnostics). Esses kits apresentam vantagens de serem mais seguros do que a utilização de solventes

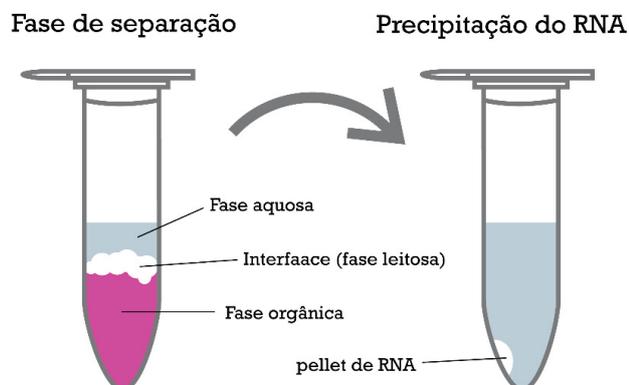
orgânicos, serem mais rápidos para extração de RNA, resultam em alto rendimento e qualidade do RNA (TAVARES, et.al., 2011), mas apresentam a desvantagem de alto custo por amostra, especialmente para a realidade no Brasil.

Um dos métodos mais utilizados é a extração orgânica à base de fenol-guanidina isotiocianato. Esse reagente é pode ser adquirido comercialmente pelo nome TRIzol das marcas Ambion by Life Technology, hoje encontrada com a marca Invitrogen™ (comercializada pela Thermo Fisher Scientific), pelo nome TRI reagent da Sigma-Aldrich (comercializada pela Merck, Sigma-Aldrich), QIAzol da marca Qiagen (comercializada pela Qiagen), entre outros. Para facilitar o entendimento, a partir daqui a solução à base de fenol-guanidina isotiocianato será denominada de TRIzol, qualquer que seja a sua marca comercial.

O reagente TRIzol é uma solução monofásica que contém tiocianato de guanidina e fenol que simultaneamente solubiliza o material biológico e desnatura proteínas, permitindo a desproteinização do RNA (RIO, et.al.,2010). Em 1987, Chomczynski e colaboradores desenvolveram uma metodologia de uma única etapa, utilizando a mistura do tiocianato de guanidina juntamente com o fenol. Esse método permitiu um alto rendimento e pureza do RNA, compatível com análises da expressão gênica (CHOMCZYNSKI, 1987).

O tiocianato de guanidina é um agente caotrópico e serve para auxiliar na desnaturação de proteínas, como por exemplo as que se ligam fortemente a ácidos nucleicos ou degradam o RNA. Nos protocolos de extração de RNA total baseados no uso de TRIzol, também se faz uso de clorofórmio. Quando adicionado o clorofórmio nesta mistura e o material é submetido a centrifugação, ocorre a separação destes solventes em duas fases líquidas: uma fase aquosa menos densa e transparente (contendo o RNA), uma fase leitosa ou interfase (contendo o DNA) e uma fase orgânica, mais densa (contendo as proteínas dissolvidas em fenol e os lipídios dissolvidos em clorofórmio). Assim, RNA, DNA e proteína podem ser purificados a partir de uma única amostra e por isso o nome TRIzol. Após esta etapa de separação, o RNA presente na fase aquosa é separado e precipitado com isopropanol ou 2-propanol (Fig. 7) (PERRY, et.al., 1972; CHOMCZYNSKI, 1987; CHOMCZYNSKI, 2006). Eventualmente, lavagens com etanol ou etapas de precipitação com cloreto de lítio também são observados nos protocolos mais recentes de extração de RNA baseados no uso de TRIzol (WALKER, et.al, 2013; GREEN, et.al, 2016; GREEN, et.al, 2020).

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DAS FASES DURANTE A EXTRAÇÃO DE RNA COM TRIZOL



Fonte: O Autor, 2022.

Nota: Separação das fases durante o processo de extração de RNA. E representação da precipitação do RNA após a adição do isopropanol.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Existem diversas metodologias para extrair RNA de boa qualidade compatível com análises de expressão gênica. A escolha da metodologia deve considerar principalmente a compatibilidade com a amostra biológica, tempo de extração, aplicação do RNA extraído e custos. Considerando todos estes aspectos, foram comparados diferentes métodos de lise celular seguidos de extração de RNA com o reagente TRizol.

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma técnica de extração de RNA em biopsias congeladas de diferentes tecidos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização de um método de lise dos tecidos
- Obtenção de RNA de alta qualidade

4. MATERIAIS E METODOS

4.1 AMOSTRA

Foram utilizadas amostras de biópsia de diversos tipos de tumores, provenientes do Hospital Angelina Caron (Parecer CEP/SD-PB.nº 3507574). As amostras foram armazenadas em RNAlater ou congeladas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta. As células utilizadas foram cultivadas em meio DMEM alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina e streptomina). As células foram cultivadas em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂ à 37° C. O pellet de células foi obtido após um processo de lavagem com uma solução de salina (PBS) e centrifugação (2000 x g) por 5 min. O pellet de células seco foi armazenado imediatamente em nitrogênio líquido ou no freezer -80°C.

4.2. EXTRAÇÃO DE RNA

4.2.1. PREPARO DA AMOSTRA

As amostras de biópsias foram lisadas através de diferentes procedimentos mecânicos, a citar:

- Agitação com homogeneizador mecânico: Foi utilizado o modelo BK-HG160-II da BIOBASE, onde as amostras foram homogeneizadas por 15 segundos e 1 minuto em um tubo eppendorff de 2mL com 1mL do reagente TRIzol.
- Agitação com beads magnéticas: foram utilizadas esferas de aço inox com tamanhos diferentes, 3mm, 5mm e 7mm de diâmetro. Estas foram adicionadas em diferentes combinações (tabela 1) na amostra juntamente com 1mL de TRIzol em um eppendorff de 1,5mL. Os tubos foram agitados em vórtex para rompimento da amostra.
- Moagem manual, utilizando grau e pistilo. As amostras foram trituradas com 1mL de TRIzol até rompimento da amostra.
- Moagem manual utilizando grau, pistilo e nitrogênio líquido até pulverização da amostra, para então seguir para a extração de RNA.

4.2.2. EXTRAÇÃO COM TRIZOL

Para extração do RNA proveniente do pellet de células foi utilizado 1 mL de reagente TRizol (Ambion by Life Technologies Invitrogen) ou Tri Reagent (Sigma). A partir daqui, o agente de solubilização e extração, qualquer que seja a marca será denominado TRizol. Após agitação em vórtex, a amostra foi deixada em descanso por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esse período a amostra foi centrifugada (Centrifuga 5810r eppendorff) à 12.000 x *g* por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorff RNase free. Nesse material foi adicionado 200 µL de Clorofórmio e 200µL de água livre de RNase (Invitrogen). A amostra foi agitada vigorosamente em vortex e deixada em repouso de 2 a 3 minutos. Após esse período a amostra foi submetida a centrifugação à 12.000 x *g* por 15 minutos à 4°C. Posteriormente foi retirada a fase aquosa (superior) e colocada em um novo eppendorff RNase free e adicionado 800µL de Isopropanol. O tubo foi agitado por inversão e deixado em repouso por 3 horas à -20°C. Após incubação, a amostra foi novamente centrifugada à 12.000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao tubo 800 µL de álcool etílico 75% (preparado em água RNase free). Em seguida, a amostra foi agitada no vortex por 1 minuto e centrifugada à 7.500 x *g* à 4°C. O sobrenadante foi descartado e essa etapa foi repetida. Após o descarte do álcool etílico depois da segunda lavagem, a amostra foi deixada à temperatura ambiente em cabine de segurança biológica (fluxo laminar) para secagem, durante aproximadamente 20 minutos. Após a secagem, a amostra foi reidratada com 40 µL água RNase free. Esse foi o protocolo inicialmente utilizado nos testes com biópsias.

4.2.3. QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DO RNA

A quantificação da amostra foi realizada através da leitura da absorbância no NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (ThermoFisher) no comprimento de onda de 260nm. Além disso, foram analisadas as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} para a verificação da pureza do RNA.

Para a verificação da integridade do RNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,2%. Foi aplicado no gel um volume de 2µL das amostras e utilizado como tampão de corrida o Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE). Para o preparo deste tampão, primeiramente foi preparado um tampão 10X concentrado contendo os

seguintes reagentes: 48,4g de Tris Base, 11,42ml de Ácido Acético Glacial e 3,72g de 0,5 M EDTA. Essa solução foi misturada em um Becker com o auxílio de um agitador. Preparada a solução 10X concentrada, foi coletado 100mL e colocado em 900ml de água destilada.

As condições utilizadas para a eletroforese foram: 80 V (Volts) e tempo de 30 minutos. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e visualizado em transiluminador sob luz UV (302 nm). As imagens foram obtidas com o sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus Biotecnologia).

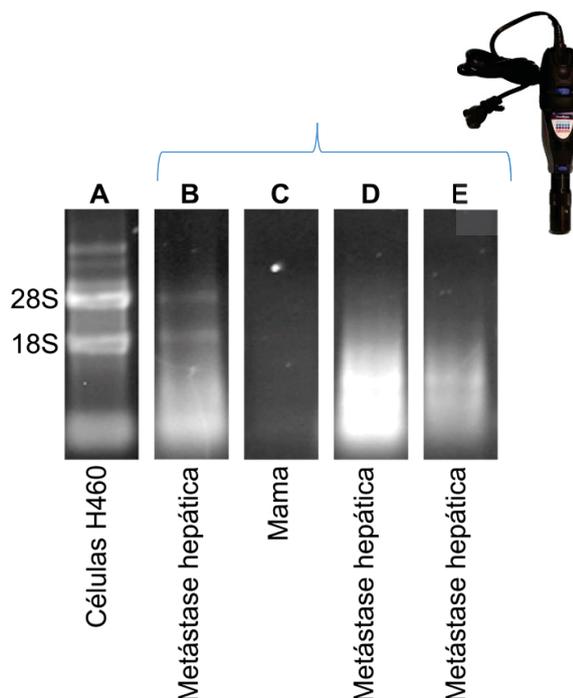
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas informações do produto TRIzol (THERMOFISHER, 2020) a abordagem recomendada começa com a homogeneização da amostra de tecido seguida de uma separação de fases do reagente após a adição de clorofórmio. Enquanto o RNA está na fase aquosa superior, o DNA e as proteínas estão na fase inferior orgânica de fenol-clorofórmio. O DNA pode ser, então, precipitado pela adição de etanol e as proteínas permanecem no sobrenadante fenol-etanol e podem ser precipitadas com isopropanol ou acetona.

Inicialmente, o protocolo de extração de RNA baseado no uso descrito em materiais e métodos foi aplicado em um pellet de células da linhagem H460 (câncer de pulmão). De acordo com os dados espectrofotométricos obtidos em NanoDrop™, o RNA total extraído desta amostra apresentou uma concentração de 1,68 µg/µL e razões $A_{260/280}$ de 1,99 e $A_{260/230}$ de 2,17, que sugerem a ausência de proteínas ou fenóis na amostra de RNA total. Além disso, conforme apresentado na figura 11A, duas bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S podem ser visualizadas no gel de agarose, confirmando que o procedimento foi eficiente.

Uma vez confirmado que o protocolo de extração baseado no uso de TRIzol foi efetivo em uma amostra de células H460, se iniciaram os testes de rompimento das biópsias. O primeiro teste realizado foi similar ao aplicado no pellet de células, incubando uma biópsia de metástase hepática em TRIzol e submetendo a homogeneização em um vórtex por 1 minuto. Infelizmente, visualmente não houve nenhum rompimento do tecido (resultado não mostrado). Em seguida, foi testado romper as biópsias de mama submersas em TRIzol utilizando uma agulha 25x7mm. Essa tentativa também foi falha, pois visualmente não foi possível romper o tecido (resultado não mostrado).

FIGURA 11 - GÉIS DE RNA DE CÉLULAS H460 E DIFERENTES TIPOS DE BIÓPSIAS



	A	B	C	D	E
[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	1,68	0,28	0,04	0,79	0,27
$A_{260/280}$	1,99	2,01	1,97	2,02	2,05
$A_{260/230}$	2,17	1,55	0,20	1,07	1,40

FONTE: O Autor, 2022

Nota: Géis de agarose com amostras de RNA extraído pelo protocolo de após corrida eletroforética de 80 V em 30 minutos em tampão TAE. Foram aplicados 2,0 μL da amostra e os géis corados em brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 10 minutos. **A)** Amostra de células H460. **B)** Amostra de metástase hepática. **C)** Amostra de mama. **D)** Amostra metástase hepática. **E)** Amostra de metástase hepática.

Utilizando um homogeneizador mecânico (BK-HG160-II da BIOBASE), modelo similar ao da foto apresentada na figura 6, foi realizado um novo teste utilizando uma amostra de tecido de metástase hepática. O fragmento de biópsia foi submerso em 1 mL de TRIzol e triturado durante 15 segundos. O material triturado foi submetido ao mesmo protocolo de extração de RNA utilizado com células H460. A concentração de RNA total foi de 0,28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, um valor 6 vezes inferior ao obtido com o pellet de células da linhagem H460. Apesar da menor concentração, o valor da razão $A_{260/280}$ foi de 2,01, sugerindo ausência de contaminação com proteínas. A razão

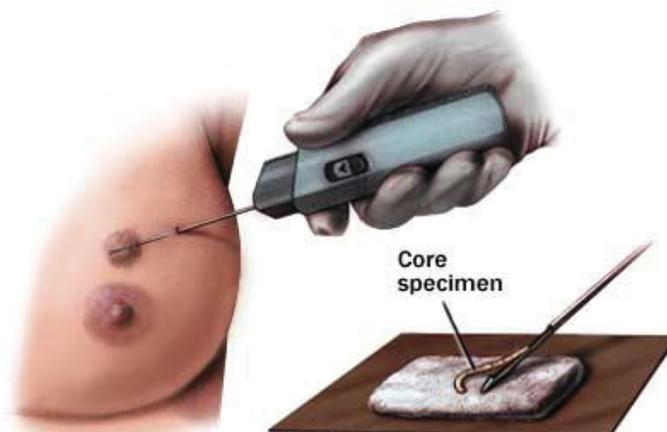
$A_{260/230}$ foi de 1,55, sugerindo uma leve contaminação com fenóis. Como pode-se observar na figura 11B, mesmo sendo possível visualizar as bandas 18S e 28S, estas são menos intensas quando comparado com as bandas visualizadas na figura 11A. Além disso, um arrastado mais intenso na parte inferior do gel também pode ser visualizado, sugerindo uma possível degradação do material.

Baseado neste resultado e com intuito de verificar se o tempo de homogeneização interfere na quantidade e qualidade do RNA obtido, dois tempos de homogeneização foram testados (1 minuto e 15 segundos). Uma biópsia de mama foi homogeneizada durante 1 minuto em TRIzol, enquanto uma amostra de metástase hepática foi homogeneizada durante 15 segundos. Uma concentração de 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi obtida para amostra de mama, com razões $A_{260/280}$ de 1,97 e $A_{260/230}$ de 0,20. Para a amostra de metástase hepática foi obtida uma concentração de 0,79 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e razões $A_{260/280}$ de 2,02 e $A_{260/230}$ de 1,07. As bandas de RNA ribossomais de ambas as amostras não foram visualizadas no gel (Fig.11C e 11D). No caso da amostra de metástase hepática, um arrastado no final do gel foi visualizado, provavelmente por causa da concentração 18 vezes maior quando comparado com a amostra de mama (0,787 *versus* 0,043 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Esses resultados sugerem que aumentar o tempo de trituração do tecido não melhorou a extração.

O procedimento de homogeneização no tempo de 15 segundos foi novamente repetido, com resultados ainda insatisfatórios: metástase hepática - concentração de 0,27 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e razões $A_{260/280}$ de 2,05 e $A_{260/230}$ de 1,40 (Fig. 11E) Também não foi possível visualizar as bandas correspondentes aos RNAs 18S e 28S.

Uma dificuldade observada com as amostras de mama, foi que as mesmas foram coletadas através de uma agulha chamada *core needle*, onde o tecido coletado é um tecido mais fibroso e de uma espessura fina (Figura 9). Devido a isso, a dificuldade de lise celular utilizando o homogeneizador foi maior, dificultando a extração de RNA das amostras.

FIGURA 12 - COLETA DE BIOPSIA DE MAMA

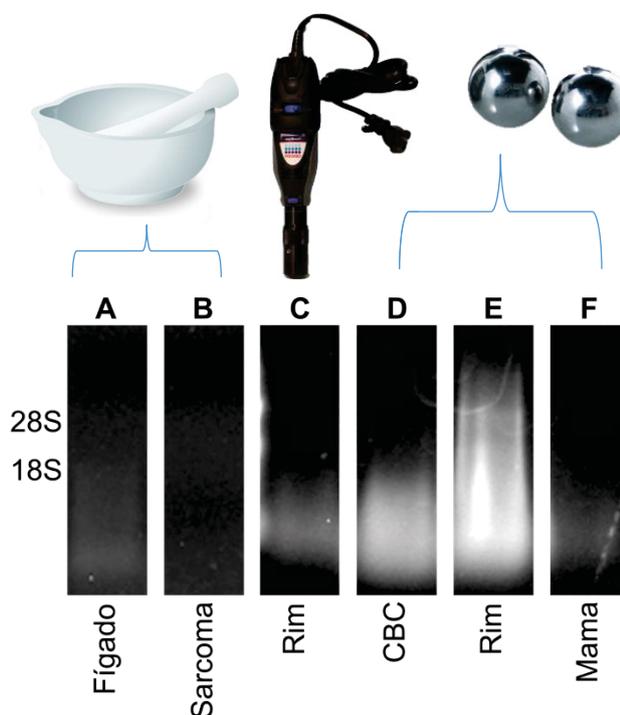


FONTE: Adaptado (Mayo Clinic, 2022)

Nota: Técnica de coleta de biópsia de mama, utilizando a core needle.

Considerando o insucesso do método baseado em homogeneizador, um novo teste foi realizado, agora macerando as amostras em gral (cadinho) com pistilo de porcelana. Neste experimento uma amostra de biópsia hepática foi macerada em nitrogênio líquido e uma amostra de sarcoma foi macerada em TRizol. Para a amostra de biópsia hepática processada por maceração em nitrogênio líquido foi obtida uma concentração de $0,06 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, com razões $A_{260/280}$ de 1,92 e $A_{260/230}$ de 1,12 (figura 13A). Com a amostra de sarcoma e o método de maceração em TRizol, foi obtido uma concentração de $0,04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, com razões $A_{260/280}$ de 1,87 e $A_{260/230}$ de 1,05 (figura 13B). Como pode ser observado no gel de agarose, em ambos os casos não foram visualizadas as bandas dos RNAs ribossomais 18S e 28S (figura 13A e 13B).

FIGURA 13 - GÉIS DE RNA UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS PARA A REALIZAÇÃO DA LISE CELULAR.



	A	B	C	D	E	F
[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	0,06	0,04	0,09	0,25	0,34	0,04
$A_{260/280}$	1,92	1,87	1,97	1,95	1,96	1,83
$A_{260/230}$	1,12	1,05	1,25	1,23	1,35	1,17

FONTE: O Autor, 2022

Nota: Géis de agarose com amostras de RNA extraído pelo protocolo de TRIzol após corrida eletroforética de 80V em 30 minutos em tampão TAE. Foram aplicados 2,0 μL da amostra e os géis corados em brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 10 minutos. **A)** Amostra hepática macerada com nitrogênio líquido. **B)** Amostra de sarcoma macerada apenas com TRIzol. **C)** Amostra de rim triturada com homogeneizador. **D)** Amostra de carcinoma basocelular (CBC) triturada com uma bead de 7 mm de diâmetro. **E)** Amostra de rim triturada com duas beads de 7 mm de diâmetro. **F)** Amostra de mama triturada com oito beads de 3 mm de diâmetro.

A próxima tentativa foi baseando-se no conceito do equipamento PowerLyzer 24 (figura 5), que utiliza esferas de aço inox de diferentes diâmetros (3 mm, 5 mm e 7 mm) para o processo de lise celular. Em nosso caso utilizamos esferas de aço inox e um vórtex para realizar a lise. Nesse teste foram utilizadas amostras de moela de frangos provenientes de um mercado local. Foi realizado primeiramente um teste com

16 combinações diferentes (Tabela 1), utilizando beads de 3, 5 e 7 mm e agitando em vortex em por tempos diferentes: 1, 2, 5 e 10 minutos. Baseado neste teste, as melhores combinações de beads/tempo que promoveram a lise dos tecidos foram: 1 bead de 7 mm, 2 beads de 7 mm, 4 beads de 5 mm, 6 beads de 3 mm, 8 beads de 3 mm e 10 beads de 3 mm. O melhor tempo de vórtex foi de 5 minutos para todos os casos (resultados não mostrados). Baseado nesse resultado, um teste com biópsias humanas foi feito utilizando essas combinações de beads. As amostras que possuíam 4 beads de 5 mm, 6 beads de 3 mm e 10 beads de 3 mm não apresentaram rompimento celular, não seguindo para as próximas etapas de extração de RNA (resultados não mostrados). As demais condições prosseguiram para o processo de extração de RNA.

TABELA 1 - DIFERENTES COMBINAÇÕES DE BEADS DE AÇO E TEMPO

Número de beads/diâmetro em milímetros	Tempo em minutos			
	1	2	5	10
1/7	-	-	+	+
2/7	-	-	+	+
1/5	-	-	-	-
2/5	-	-	-	-
3/5	-	-	-	-
4/5	-	-	+	+
1/3	-	-	-	-
2/3	-	-	-	-
3/3	-	-	-	-
4/3	-	-	-	-
5/3	-	-	-	-
6/3	-	-	+	+
7/3	-	-	-	-

8/3	-	-	+	+
9/3	-	-	-	-
10/3	-	-	+	+

FONTE: O Autor, 2022

Nota: Diferentes combinações de beads de aço inox com diferentes tempos de agitação. Foram utilizados fragmentos de moela de frango para avaliação de rompimento celular. Os resultados negativos (-) significam a ausência de rompimento, enquanto os resultados positivos (+) significam um rompimento efetivo avaliado a olho nu. A avaliação foi realizada após a agitação da mesma em vórtex (tubos na horizontal).

Um novo teste foi realizado comparando o homogeneizador e o uso das beads. Foi obtida uma concentração de 0,09 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a amostra de biopsia de rim processada com o homogeneizador ($A_{260/280}$: 1,97 e $A_{260/230}$: 1,25) (Fig. 13C).

O teste empregando uma 1 bead de 7 mm foi realizado na amostra de carcinoma basocelular (CBC). Foi obtida uma concentração de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($A_{260/280}$: 1,95 e $A_{260/230}$: 1,23) (Fig. 13D). Em uma amostra de rim foram testadas 2 beads de 7 mm, obtendo uma concentração de 0,34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($A_{260/280}$: 1,96 e $A_{260/230}$: 1,35) (Fig. 13E). Por fim, para a amostra de mama triturada com 8 beads de 3 mm foi obtida uma concentração de 0,043 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($A_{260/280}$: 1,83 e $A_{260/230}$: 1,17) (Fig. 13F). Como pode-se observar nas figuras 9D, E e F, não foi possível visualizar as bandas de RNAs ribossomais 18S e 28S em nenhuma das condições testadas. Dentre as condições, apenas um arrastado foi observado na condição aplicando 2 beads de 7mm (Fig. 13E).

Dentre todos os testes realizados, o mais promissor, ainda que com resultados insatisfatórios, foi obtido através do uso do homogeneizador comercial baseado no uso de rotor (Fig. 11B). Além do alto custo do rotor deste equipamento, que é acoplado a uma espécie de “mini retífica” de alta rotação, o processo de limpeza é complicado. Para uso em uma única amostra, o método é efetivo, porém, com o aumento do processamento de amostras diárias, um elevado risco de contaminação de material biológico se torna eminente. Para solucionar ambos os problemas, custo e contaminação cruzada, desenvolvemos nosso próprio triturador, chamado de “protótipo 1”, tendo como base a mecânica do homogeneizador comercial.

Para o desenvolvimento do equipamento, utilizamos uma mini retífica de alta rotação (até 13000 rpm), similar ao motor utilizado no homogeneizador comercial. Ao invés de um eixo rotor e um estator, utilizamos um eixo de aço inox de 3 mm contendo

em sua extremidade um fio de nylon de 0,90 mm (Fig. 14). A mecânica deste protótipo 1 é similar ao observado em cortadores de grama. A fixação do fio de nylon na extremidade do eixo foi realizada através de um nó e uma região escavada no aço para melhor fixação.

FIGURA 14 - PROTÓTIPO 1 PARA REALIZAÇÃO DA RUPTURA CELULAR



FONTE: O Autor (2022).

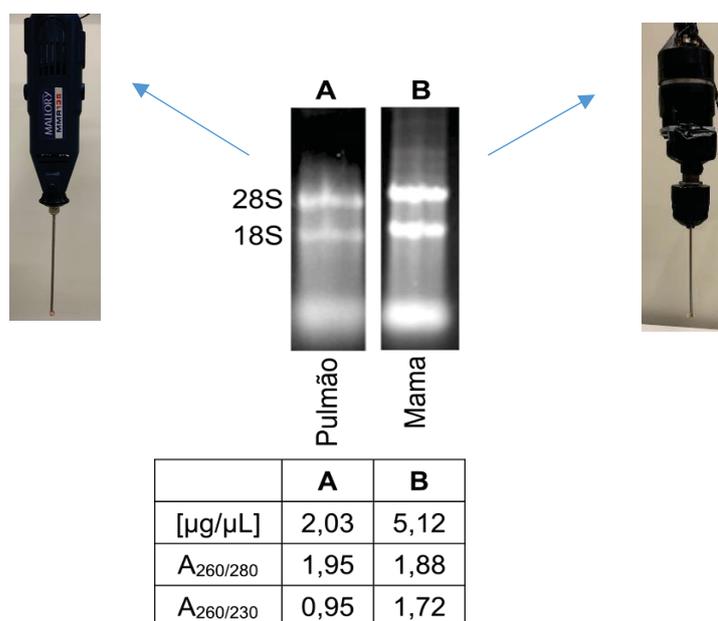
NOTA: Protótipo 1 desenvolvido pelo laboratório utilizando uma mini retífica de alta rotação, com eixo de aço inox de 3 mm contendo em sua extremidade um fio de nylon de 0,90 mm.

Com esse “protótipo 1” foi realizado um teste de rompimento com uma amostra de biopsia de pulmão, apresentando como resultado uma concentração de 2,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($A_{260/280}$: 1,95 e $A_{260/230}$: 0,95). Como pode-se observar no gel eletroforético da figura 15A, foi possível obter um RNA de boa qualidade, pois é possível visualizar as bandas características dos RNAs ribossomais 18S e 28S.

Outros testes foram realizados com esse protocolo e os resultados foram similares e promissores (resultados não mostrados). Contudo, um dos problemas detectados foi a alta rotação, que eventualmente arremessava a amostra para fora do tubo. Para solucionar esse problema, um segundo protótipo foi construído. Para o “protótipo 2” o motor de 13000 rpm de mini retífica foi substituído por um de 4500 rpm

de furadeira (Fig. 16). Ainda, foi acoplado um mandril de aperto rápido e manual, facilitando a troca dos eixos.

FIGURA 15 - GÉIS DE RNA EXTRAÍDO DE BIÓPSIAS LISADAS COM OS PROTÓTIPOS 1 E 2



FONTE: O Autor, 2022

Nota: Géis de agarose com amostras de RNA extraído pelo protocolo de TRIzol após corrida eletroforética de 80V em 30 minutos em tampão TAE. Foram aplicados 2,0 μL da amostra e os géis corados em brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 10 minutos. **A)** Amostra de Pulmão utilizando o protótipo 1. **B)** Amostra Mama processada com o protótipo 2.

Uma amostra de biópsia de mama foi submetida a extração utilizando o protótipo 2. A concentração de RNA obtida foi de 5,12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (razão $A_{260/280}$ de 1,88 e $A_{260/230}$ de 1,72). Conforme apresentado na figura 15B, os resultados obtidos com o protótipo 2 foram similares ou mesmo superiores aos obtidos no protótipo 1, com a vantagem de não perder amostra devido a velocidade de rotação. Esses resultados foram confirmados em outras amostras (resultados não mostrados).

FIGURA 16 - PROTÓTIPO 2 PARA REALIZAÇÃO DA RUPTURA CELULAR



FONTE: O Autor (2022)

NOTA: Protótipo 2, desenvolvido pelo laboratório, utilizando um motor de 4500 rpm, com eixo de aço inox de 3 mm contendo em sua extremidade um fio de nylon de 0,90 mm.

Com base em todos os resultados obtidos, foi possível realizar uma comparação das principais vantagens e desvantagens de cada método de lise utilizado neste projeto (Tabela 2). Com essa comparação, é possível comprovar que o melhor método foi utilizando o protótipo 2.

TABELA 2 - COMPARATIVO DOS METODOS DE LISE CELULAR

	Beads	Homogeneizador	Moagem manual	Protótipo 1	Protótipo 2
Vantagens	Diversas combinações de beads	Rapidez	Custo acessível	Alta eficiência	Alta eficiência
	Rapidez			Rapidez	Rapidez
	Custo acessível			Custo acessível	Custo acessível
	Processamento de amostras simultaneamente				
Desvantagens	Sem ruptura de tecidos finos	Alto custo	Uma amostra de cada vez	Uma amostra de cada vez	Uma amostra de cada vez

Alta agitação	Limpeza para cada processamento	Lento (aumenta a chance de degradação da amostra)	Motor com alta rotação
	Uma amostra de cada vez	Força manual	

FONTE: O Autor, 2022.

Carter et.al., (2012) utilizou um homogeneizador de tecidos e um equipamento de bead para a realização de lise celular dos tecidos ósseos em temperaturas próximas ao congelamento da amostra (-80°C), e utiliza o TRIzol para a extração de RNA. Através deste estudo de Carter, foi possível observar que realizar a homogeneização e todo o processo de extração em temperaturas de resfriamento, auxilia na obtenção de um RNA integro e em boa concentração. Em nosso estudo, todos os reagentes utilizados para extração foram mantidos à 4°C e durante a extração, exceto na etapa de incubação a temperatura ambiente, as amostras foram mantidas em gelo para manter a temperatura de 4°C e preservar a integridade do RNA. Assim como Carter e cols, obtivemos resultados com bom rendimento e uma boa integridade do RNA, mantendo as amostras resfriadas, pois dessa forma o processo de degradação do RNA pelas RNases é retardado.

Nouvel et. al. (2021) realizaram um processo similar em busca de métodos eficientes para romper diversas biópsias humanas. Um dos equipamentos utilizados foi o FrestPrep-24, que realiza a ruptura celular através da homogeneização do tecido com beads, um método similar ao teste realizado neste estudo com as esferas de aço, e o GentleMACS Dissociator, um homogeneizador de rotor, que realiza uma lise similar ao dos protótipos 1 e 2. Nos resultados obtidos nesse estudo de Nouvel, a técnica utilizando o homogeneizador GentleMACS dissociator, combinada com o reagente QIAzol (um reagente contendo fenol-guanidina da marca quiagem), foi o que apresentou melhor rendimento de RNA extraído das amostras, e preservou a integridade do RNA. Assim como o GentleMACS dissociator, os resultados mostrados nas figuras 11A e 11B mostram que nosso protótipo 2 combinado com o TRIzol, realiza uma lise celular eficaz, e um RNA dentro dos parâmetros esperados, com razões A260/A280 e A260/A230 dentro do esperado, uma boa concentração e bandas ribossomais características 18S/28S visíveis no gel eletroforético.

Os valores estimados dos equipamentos citados nesses estudos são de \$7800 Dólares (FestPrep-24) e \$15.000 Dólares (GentleMACS). Comparando com o valor

dos protótipos 1 e 2, temos uma diferença significativa, haja vista que gastamos em torno de R\$ 300 Reais para construção de cada um. Ainda, a maioria de protocolos encontrados nos artigos, são através de colunas comerciais, como no caso dos experimentos de Nance et.al. (2020) e Farrag et.al (2020), que utilizam o kit RNeasy da Qiagen. Esse kit custa \$493,00 Dólares para extração de 50 amostras. Comparando com o valor de um frasco de TRIzol de 100mL (\$228,00 Dólares), podemos observar que realizar a extração com o TRIzol é aproximadamente 80% mais barata.

No presente trabalho foi possível realizar diversos testes e desenvolver um protótipo adequado e de um custo acessível, para a obtenção de uma lise celular eficiente de diferentes tipos de biopsias. Os resultados demonstraram que o protótipo desenvolvido pelo grupo, juntamente com a extração realizada com TRIzol fornecem grandes rendimentos de RNA e dentro dos parâmetros de integridade necessários para a análise da expressão genica. O fluxograma da Figura 17 mostra o protocolo final estabelecido para prosseguir com a extração de RNA de células e tecidos com utilização de TRIzol.

FIGURA 17 - PROTOCOLO PADRONIZADO DE EXTRAÇÃO DE RNA DE AMOSTRAS DE CÉLULAS E TECIDOS COM TRIZOL.



Protocolo de extração de RNA total

- 1- Coleta da biópsia em nitrogênio líquido
PS: a amostra deve ficar armazenada em -80°C por no máximo 1 ano ou em nitrogênio líquido por tempo indeterminado
 - 2- Transferir a biópsia para um tubo falcon de 15 mL
PS1: colocar 1 a 2 mL de trizol no tubo antes de transferir a biópsia (depende do tamanho da biópsia)
 - 3- Incubar com trizol até descongelar a amostra em gelo (~15 min)
 - 4- Romper o tecido com o triturador
PS: ligar com a haste dentro do tubo, mas não imersa. Romper o mais rápido possível (1 min), como movimento p/ cima e p/ baixo.
 - 5- Passar o conteúdo para um tubo eppendorf de 2 mL - incubar 5 min em gelo - agitar por inversão umas 2 a 3 vezes
 - 6- Centrifugar ($12000\text{g}/5\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$)
 - 7- Transferir o sobrenadante para um novo tubo eppendorf de 2 mL
 - 8- Agitar vigorosamente por 15 seg
PS: usar um vortex no máximo de velocidade
 - 9- Incubar por 5 min em gelo
 - 10- Adicionar 200 μL de clorofórmio
PS: para cada 1 mL de trizol.
 - 11- Agitar vigorosamente por 15 seg
PS1: usar um vortex no máximo de velocidade
 - 12- Incubar por 3 min em gelo
 - 13- Centrifugar ($12000\text{g}/15\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$)
 - RNA - fase aquosa
 - DNA - fase leitosa
 - Proteína - fase fenólica
 - 14- Coletar a fase aquosa em um novo tubo
PS: inclinar o tubo em ângulo de 45° e não pegar ou tocar com a ponteira a fase leitosa
 - 15- Adicionar 500 μL de isopropanol
PS1: para cada 1 mL de trizol
PS2: misturar por inversão 10 vezes
 - 17- Centrifugar ($12000\text{g}/10\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$)
 - 18- Descartar o sobrenadante com micropipeta
PS: marcar o local do pellet (sempre do lado da "dobradiça" da tampa) e tocar com a ponteira no lado oposto
 - 19- Ressuspender o pellet em 1 mL de etanol 75%
PS: preparar o etanol com água livre de RNase
 - 20- Agitar vigorosamente por 15 seg
PS: usar um vortex no máximo de velocidade
 - 21- Centrifugar ($7500\text{g}/5\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$)
 - 22- Descartar o sobrenadante com micropipeta
PS1: ver etapa 18.
PS2: Retirar todo o líquido
 - 23- Secar o RNA no fluxo laminar de 5 a 10 min
PS: se precisar, aumentar o tempo
 - 24- Ressuspender o pellet em 40 μL de água RNase free
PS: pipetando up and down
 - 25- Separar uma alíquota de 5 μL (2 μL para o gel e 3 μL para leitura no nanodrop)
PS: no nanodrop usa apenas 1 μL
 - 26- Armazenar imediatamente os 35 μL de RNA em -80°C ou nitrogênio líquido
- PS1: Todos os materiais devem ser autoclavados 2 vezes
PS2: O material deve ser manuseado com luvas sem talco
PS3: Os materiais e reagentes devem ser exclusivos para RNA

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos desafios de trabalhar com amostras de RNA, que incluem sua rápida degradação e os custos elevados de equipamentos laboratoriais, no presente trabalho descrevemos um protótipo de baixo custo compatível com a obtenção de amostras de RNA total de alta qualidade obtidos de biópsias.

7. REFERÊNCIAS

ADACHI, Masashi et al. Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. **Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38998-39004, 2002.

AIKAWA, Tomonori; HOLM, Marie-Louise; KANEKIYO, Takahisa. ABCA7 and pathogenic pathways of Alzheimer's disease. **Brain Sciences**, v. 8, n. 2, p. 27, 2018.

AKIYAMA, Masashi et al. Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 7, p. 1777-1784, 2005.

ALLA, Vijay et al. E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry. **Cell cycle**, v. 11, n. 16, p. 3067-3078, 2012

.ARDEHALI, Hossein; O'ROURKE, Brian; MARBÁN, Eduardo. Cardioprotective role of the mitochondrial ATP-binding cassette protein 1. **Circulation research**, v. 97, n. 8, p. 740-742, 2005.

ARONSON, Jeffrey K.; FERNER, Robin E. Biomarkers—a general review. **Current protocols in pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 9.23. 1-9.23. 17, 2017.

AUNER, Veronika et al. ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. **Gynecologic oncology**, v. 117, n. 2, p. 198-201, 2010.

BAN, Nobuhiro et al. ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9628-9634, 2007.

BAO, Lingjie et al. ABCF2, an Nrf2 target gene, contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Molecular carcinogenesis**, v. 56, n. 6, p. 1543-1553, 2017.

BAR-ZEEV, Maya et al. β -Casein micelles for oral delivery of SN-38 and elacridar to overcome BCRP-mediated multidrug resistance in gastric cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 133, p. 240-249, 2018.

BARNOUIN, K. et al. Multidrug resistance protein-mediated transport of chlorambucil and melphalan conjugated to glutathione. **British journal of cancer**, v. 77, n. 2, p. 201-209, 1998

.BATES, Susan E. et al. Mitotane enhances cytotoxicity of chemotherapy in cell lines expressing a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) which is also expressed by adrenocortical carcinomas. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 73, n. 1, p. 18-29, 1991.

BEKRI, Soumeya et al. Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 96, n. 9, p. 3256-3264, 2000.

BENYAHIA, B. et al. Multidrug resistance-associated protein MRP1 expression in human gliomas: chemosensitization to vincristine and etoposide by indomethacin in human glioma cell lines overexpressing MRP1. **Journal of neuro-oncology**, v. 66, n. 1, p. 65-70, 2004.

BAGNOLI, Marina et al. Clinicopathological impact of ABCC1/MRP1 and ABCC4/MRP4 in epithelial ovarian carcinoma. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

BESSHO, Yuji et al. ABCC10/MRP7 is associated with vinorelbine resistance in non-small cell lung cancer. **Oncology reports**, v. 21, n. 1, p. 263-268, 2009.

BOONSTRA, Ronald et al. Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation. **British journal of cancer**, v. 90, n. 12, p. 2411-2417, 2004.

BOREL, Florie et al. Adenosine triphosphate-binding cassette transporter genes up-regulation in untreated hepatocellular carcinoma is mediated by cellular microRNAs. **Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 821-832, 2012.

BORST, Piet et al. The multidrug resistance protein family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1461, n. 2, p. 347-357, 1999.

BORST, P.; KOOL, M.; EVERS, R. Do cMOAT (MRP2), other MRP homologues, and LRP play a role in MDR?. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 1997. p. 205-213.

BORST, P.; ZELCER, N.; VAN HELVOORT, A. ABC transporters in lipid transport. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1486, n. 1, p. 128-144, 2000.

BORST, P.; ELFERINK, R. Oude. Mammalian ABC transporters in health and

disease. **Annual review of biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 537-592, 2002.

BORST, Piet. Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what?. **Open biology**, v. 2, n. 5, p. 120066, 2012.

BRODY, T. Chapter 19—Biomarkers. **Clinical Trials (Second Edition); Brody, T., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA**, p. 377-419, 2016.

BRYAN, Joseph; AGUILAR-BRYAN, Lydia. The ABCs of ATP-sensitive potassium channels: more pieces of the puzzle. **Current opinion in cell biology**, v. 9, n. 4, p. 553-559, 1997.

BURDEN, David W. Guide to the homogenization of biological samples. **Random Primers**, v. 7, p. 1-14, 2008.

BURDEN, David W. Guide to the disruption of biological samples-2012. **Random Primers**, v. 12, n. 1, p. 1-25, 2012.

BURGER, Herman et al. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. **Clinical cancer research**, v. 9, n. 2, p. 827-836, 2003.

BURKHART, Catherine A. et al. Small-molecule multidrug resistance-associated protein 1 inhibitor reversan increases the therapeutic index of chemotherapy in mouse models of neuroblastoma. **Cancer research**, v. 69, n. 16, p. 6573-6580, 2009.

CARTER, Lauren E. et al. An improved method for isolation of RNA from bone. **BMC biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2012.

CARINI, Claudio; FIDOCK, Mark; VAN GOOL, Alain (Ed.). **Handbook of biomarkers and precision medicine**. Taylor & Francis, 2019.

CARINI, Claudio et al. Definitions and Conceptual Framework of Biomarkers in Precision Medicine. In: **Handbook of Biomarkers and Precision Medicine**. Chapman and Hall/CRC, 2019. p. 2-7.

CHAPUY, Bjoern et al. ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. **haematologica**, v. 94, n. 11, p. 1528, 2009.

.CHEN, Jian-Hui et al. Valproic acid (VPA) enhances cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cells via HDAC2 mediated down regulation of ABCA1. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 7, p. 785-792, 2017.

CHEN, Jie-Ru et al. Timosaponin A-III reverses multi-drug resistance in human chronic myelogenous leukemia K562/ADM cells via downregulation of MDR1 and MRP1 expression by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway. **International journal of oncology**, v. 48, n. 5, p. 2063-2070, 2016.

CHEN, Yi-Hsien et al. ABCG1 maintains high-grade glioma survival in vitro and in vivo. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 23416, 2016.

CHEN, Yao-Li et al. ABCG2 overexpression confers poor outcomes in hepatocellular carcinoma of elderly patients. **Anticancer research**, v. 36, n. 6, p. 2983-2988, 2016.

CHEN, Zhang-qun et al. The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 11, p. 7452-7457, 2006.

CHEUNG, Siu Tim et al. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC) B5 regulate liver cancer cell chemoresistance. **Gastroenterology**, v. 140, n. 1, p. 344-355. e2, 2011.

CHIU, Ling-Yen et al. L-type calcium channel blockers reverse docetaxel and vincristine-induced multidrug resistance independent of ABCB1 expression in human lung cancer cell lines. **Toxicology letters**, v. 192, n. 3, p. 408-418, 2010.

CHO, Jae Hee et al. Suppression of pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) increases the sensitivity of pancreatic cancer to gemcitabine and 5FU, and inhibits the formation of pancreatic cancer stem like cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 44, p. 76398, 2017.

CHOU, Jian-Liang et al. Hypermethylation of the TGF- β target, ABCA1 is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. **Clinical epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2015.

CITTI, Arianna et al. Expression of multidrug resistance-associated proteins in paediatric soft tissue sarcomas before and after chemotherapy. **International journal of oncology**, v. 41, n. 1, p. 117-124, 2012.

COLE, S. P. C. et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. **Science**, v. 258, n. 5088, p. 1650-1654, 1992.

CONTE, Davilyn; FONSECA, Gisele da Silva. Os biomarcadores ideais para o rastreamento de câncer de mama e de pulmão: uma revisão da literatura. **Rev. bras. anal. clin.**, p. 41-44, 2021.

CONSOLI, Ugo et al. The novel anthracycline annamycin is not affected by P-

glycoprotein-related multidrug resistance: comparison with idarubicin and doxorubicin in HL-60 leukemia cell lines. 1996.

DABROWSKA, Magdalena; SIROTNAK, Francis M. Regulation of transcription of the human MRP7 gene: Characteristics of the basal promoter and identification of tumor-derived transcripts encoding additional 5' end heterogeneity. **Gene**, v. 341, p. 129-139, 2004.

DAI, C. L. et al. Huang Y, Robey RW, Liang YJ, Chen LM, Shi CJ, Ambudkar SV, Chen ZS, Fu LW. Lapatinib (Tykerb, GW572016) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2. **Cancer Res**, v. 68, p. 7905-7914, 2008.

DA GRAÇA ROCHA, Gleice et al. Effects of 3 β -acetyl tormentic acid (3ATA) on ABCC proteins activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 6757-6771, 2012.

DAVIS JR, Warren. The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) regulates cholesterol homeostasis and low-density lipoprotein receptor metabolism in N2a neuroblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 12, p. 1152-1164, 2011.

DAVIS JR, Warren. The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) regulates esterification of plasma membrane cholesterol by modulation of sphingolipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 1, p. 168-179, 2014.

DAVIS JR, Warren et al. Human ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) positively regulates low-density lipoprotein receptor expression and negatively regulates cholesterol esterification in Chinese hamster ovary cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1683, n. 1-3, p. 89-100, 2004.

DEAN, Michael; MOITRA, Karobi; ALLIKMETS, Rando. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Human Mutation**, v. 43, n. 9, p. 1162-1182, 2022. DEMIDENKO, Rita et al. Frequent down-regulation of ABC transporter genes in prostate cancer. **BMC cancer**, v. 15, 2015.

DE SOUZA, Raquel et al. Chemotherapy Dosing Schedule Influences Drug Resistance Development in Ovarian Cancer Chemotherapy Schedule Influences Drug Resistance. **Molecular cancer therapeutics**, v. 10, n. 7, p. 1289-1299, 2011.

DE WAARD, Nadine E. et al. Expression of multidrug resistance transporter

ABCB5 in a murine model of human conjunctival melanoma. **Ocular oncology and pathology**, v. 1, n. 3, p. 182-189, 2015.

DHARMAPURI, Gangappa et al. Celecoxib sensitizes imatinib-resistant K562 cells to imatinib by inhibiting MRP1–5, ABCA2 and ABCG2 transporters via Wnt and Ras signaling pathways. **Leukemia research**, v. 39, n. 7, p. 696-701, 2015.

DIESTRA, Julio E. et al. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. **The Journal of pathology**, v. 198, n. 2, p. 213-219, 2002.

DIXON, Peter H. et al. An expanded role for heterozygous mutations of ABCB4, ABCB11, ATP8B1, ABCC2 and TJP2 in intrahepatic cholestasis of pregnancy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

DOMANITSKAYA, N. et al. Abcc10 status affects mammary tumour growth, metastasis, and docetaxel treatment response. **British journal of cancer**, v. 111, n. 4, p. 696-707, 2014.

DOMENICHINI, Alice; ADAMSKA, Aleksandra; FALASCA, Marco. ABC transporters as cancer drivers: Potential functions in cancer development. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1863, n. 1, p. 52-60, 2019.

DUAN, Zhenfeng; BRAKORA, Katherine A.; SEIDEN, Michael V. Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 3, n. 7, p. 833-838, 2004.

DUAN, Zhenfeng et al. TRAG-3, a novel gene, isolated from a taxol-resistant ovarian carcinoma cell line. **Gene**, v. 229, n. 1-2, p. 75-81, 1999.

DUAN, Zhenfeng et al. Description of paclitaxel resistance-associated genes in ovarian and breast cancer cell lines. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 277-285, 2005.

DURAN, George E.; SIKIC, Branimir I. The Syk inhibitor R406 is a modulator of P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance. **Plos one**, v. 14, n. 1, p. e0210879, 2019.

EFFERTH, Thomas et al. Expression profiling of ATP-binding cassette transporters in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Molecular cancer therapeutics**, v. 5, n. 8, p. 1986-1994, 2006.

EGGEN, Tormod et al. Increased gene expression of the ABCC5 transporter

without distinct changes in the expression of PDE5 in human cervical cancer cells during growth. **Anticancer research**, v. 32, n. 8, p. 3055-3061, 2012.

EL-MASRY, Manal W. et al. Breast cancer resistance protein (BCRP) gene expression in a cohort of adult Egyptian patients with acute myeloid leukemia. **African Health Sciences**, v. 18, n. 4, p. 950-957, 2018.

ELLIOTT, Aaron M.; AL-HAJJ, Muhammad A. ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. 79-87, 2009.

ELSNEROVA, Katerina et al. Gene expression of membrane transporters: Importance for prognosis and progression of ovarian carcinoma. **Oncology reports**, v. 35, n. 4, p. 2159-2170, 2016.

FALASCA, Marco; LINTON, Kenneth J. Investigational ABC transporter inhibitors. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 21, n. 5, p. 657-666, 2012. FANELLI, Marilù et al. Targeting ABCB1 and ABCC1 with their specific inhibitor CBT-1® can overcome drug resistance in osteosarcoma. **Current cancer drug targets**, v. 16, n. 3, p. 261-274, 2016.

FARRAG, Mahmoud; ABRI, Shahrzad; LEIPZIG, Nic D. pH-dependent RNA isolation from cells encapsulated in chitosan-based biomaterials. **International journal of biological macromolecules**, v. 146, p. 422-430, 2020.

FASANO, Tommaso et al. Novel mutations of ABCA1 transporter in patients with Tangier disease and familial HDL deficiency. **Molecular genetics and metabolism**, v. 107, n. 3, p. 534-541, 2012.

FITZGERALD, M. L. et al. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. **Journal of lipid research**, v. 45, n. 2, p. 287-294, 2004.

FOJO, Antonio T. et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 1, p. 265-269, 1987.

FRANK, Natasha Y. et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. **Cancer research**, v. 65, n. 10, p. 4320-4333, 2005.

FUENTES-ARDERIU, Xavier. What is a biomarker? It's time for a renewed definition. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 51, n. 9, p. 1689-1690, 2013.

GAMBICHLER, T. et al. Expression of SOX10, ABCB5 and CD271 in melanocytic lesions and correlation with survival data of patients with melanoma. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 41, n. 7, p. 709-716, 2016.

GECIOVA, Jana; BURY, Dean; JELEN, Paul. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 6, p. 541-553, 2002.

GERMANN, Ursula A. et al. Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP. **Anti-cancer drugs**, v. 8, n. 2, p. 141-155, 1997.

GILLET, Jean-Pierre et al. Microarray-based detection of multidrug resistance in human tumor cells by expression profiling of ATP-binding cassette transporter genes. **Cancer research**, v. 64, n. 24, p. 8987-8993, 2004.

GOLDSTEIN, Lori J. et al. Expression of multidrug resistance gene in human cancers. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 81, n. 2, p. 116-124, 1989.

GREAVES, Wesley et al. Detection of ABCC1 expression in classical Hodgkin lymphoma is associated with increased risk of treatment failure using standard chemotherapy protocols. **Journal of hematology & oncology**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2012.

GREAVES, Wesley et al. Detection of ABCC1 expression in classical Hodgkin lymphoma is associated with increased risk of treatment failure using standard chemotherapy protocols. **Journal of hematology & oncology**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2012.

GÜNERKEN, EMRE et al. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 2, p. 243-260, 2015.

HARRISON, S. T. L. Cell Disruption. In *Comprehensive Biotechnology*; Moo-Young, M., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2011; p 5320

HLAVATA, I. et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. **Mutagenesis**, v. 27, n. 2, p. 187-196, 2012.

HLAVÁČ, Viktor et al. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 5, p. 515-529, 2013.

HEDDITCH, Ellen L. et al. ABCA transporter gene expression and poor outcome in epithelial ovarian cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 7, 2014.

HENDIG, Doris et al. Characterization of the ATP-binding cassette transporter gene expression profile in Y79: a retinoblastoma cell line. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 328, n. 1, p. 85-92, 2009.

HIGGINS, Christopher F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual review of cell biology**, v. 8, n. 1, p. 67-113, 1992.

HOOIJBERG, J. H. et al. Potent interaction of flavopiridol with MRP1. **British Journal of Cancer**, v. 81, n. 2, p. 269-276, 1999.

HOPKINS, T. R. Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. **Bioprocess Technol**, v. 12, p. 57-83, 1991.

HORIKAWA, Masato et al. The potential for an interaction between MRP2 (ABCC2) and various therapeutic agents: probenecid as a candidate inhibitor of the biliary excretion of irinotecan metabolites. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 17, n. 1, p. 23-33, 2002.

HOU, Youxiang et al. The FOXM1–ABCC5 axis contributes to paclitaxel resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. **Cell death & disease**, v. 8, n. 3, p. e2659-e2659, 2017.

HUANG, Jia-Feng et al. Overexpression of ABCB4 contributes to acquired doxorubicin resistance in breast cancer cells in vitro. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 82, n. 2, p. 199-210, 2018.

HUSS, Ralf. Biomarkers. In: Translational regenerative medicine. Academic Press, 2015. p. 235-241.

INGRAM, Wendy J. et al. ABC transporter activity linked to radiation resistance and molecular subtype in pediatric medulloblastoma. **Experimental hematology & oncology**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2013.

JANUCHOWSKI, Radosław et al. Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, n. 4, p. 447-453, 2014.

JAIN, Kewal K.; JAIN, Kewal K. **The handbook of nanomedicine**. Totowa:: Humana Press, 2008.

JAIN, Kewal K.; JAIN, Kewal K. **The handbook of biomarkers**. New York: Springer, 2010.

JEKERLE, Veronika et al. In vitro and in vivo evaluation of WK-X-34, a novel inhibitor of P-glycoprotein and BCRP, using radio imaging techniques. **International journal of cancer**, v. 119, n. 2, p. 414-422, 2006. JIA, Hui et al. Rhamnetin induces

sensitization of hepatocellular carcinoma cells to a small molecular kinase inhibitor or chemotherapeutic agents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 7, p. 1417-1430, 2016.

Ji, Ning et al. VS-4718 antagonizes multidrug resistance in ABCB1-and ABCG2-overexpressing cancer cells by inhibiting the efflux function of ABC transporters. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1236, 2018.

JONGKHAJORN PONG, Passara et al. Elevated expression of ABCB5 in ocular surface squamous neoplasia. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.

Li, Sen et al. Piperine, a piperidine alkaloid from *Piper nigrum* re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 83-87, 2011.

JIN, Guang-Zhi et al. The diagnostic and prognostic value of MRP8/MRP14 in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 36, p. 39357, 2015.

JULIANO, R. Lâ; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 455, n. 1, p. 152-162, 1976.

KAMINSKI, Wolfgang E. et al. ABCA6, a novel a subclass ABC transporter. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 285, n. 5, p. 1295-1301, 2001.

KARATAS, Omer F. et al. The role of ATP-binding cassette transporter genes in the progression of prostate cancer. **The Prostate**, v. 76, n. 5, p. 434-444, 2016.

KIM, Hee Joung et al. P-glycoprotein confers acquired resistance to 17-DMAG in lung cancers with an ALK rearrangement. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2015.

KIM, Woojin Scott et al. ABCA8 stimulates sphingomyelin production in oligodendrocytes. **Biochemical Journal**, v. 452, n. 3, p. 401-410, 2013.

KLEFFEL, Sonja et al. ABCB5-targeted chemoresistance reversal inhibits Merkel cell carcinoma growth. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 4, p. 838-846, 2016.

KLOKOUZAS, Antonios; BARRAND, Margery A.; HLADKY, Stephen B. Effects of clotrimazole on transport mediated by multidrug resistance associated protein 1 (MRP1) in human erythrocytes and tumour cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 24, p. 6569-6577, 2001.

KÖNIG, Jörg et al. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. **International journal of**

cancer, v. 115, n. 3, p. 359-367, 2005.

KOCH, Raphael et al. Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone. Inhibition of Exosomal Drug Export by Indomethacin. **Clinical cancer research**, v. 22, n. 2, p. 395-404, 2016.

KRIEBEL, Paul W. et al. Extracellular vesicles direct migration by synthesizing and releasing chemotactic signals. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 8, p. 2891-2910, 2018.

LAING, Naomi M. et al. Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells. **Cancer research**, v. 58, n. 7, p. 1332-1337, 1998.

LARBCHAROENSUB, Noppadol et al. Association between multidrug resistance-associated protein 1 and poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy and concurrent chemotherapy. **Human pathology**, v. 39, n. 6, p. 837-845, 2008.

LE BLEU, Heather K. et al. Extraction of high-quality RNA from human articular cartilage. **Analytical biochemistry**, v. 518, p. 134-138, 2017.

LI, Yan et al. Modulatory effects of curcumin on multi-drug resistance-associated protein 5 in pancreatic cancer cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 68, n. 3, p. 603-610, 2011.

LIESA, Marc; QIU, Wei; SHIRIHAI, Orian S. Mitochondrial ABC transporters function: the role of ABCB10 (ABC-me) as a novel player in cellular handling of reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 10, p. 1945-1957, 2012.

LITMAN, Thomas et al. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). **Journal of cell science**, v. 113, n. 11, p. 2011-2021, 2000.

LIU, Ke-Jun et al. Saracatinib (AZD0530) is a potent modulator of ABCB1-mediated multidrug resistance in vitro and in vivo. **International journal of cancer**, v. 132, n. 1, p. 224-235, 2013.

LIU, Liang; ZUO, Lian Fu; GUO, Jian Wen. ABCG2 gene amplification and expression in esophageal cancer cells with acquired adriamycin resistance. **Molecular medicine reports**, v. 9, n. 4, p. 1299-1304, 2014.

LI, Xiao-Rui et al. Effects of silencing the ATP-binding cassette protein E1 gene

by electroporation on the proliferation and migration of EC109 human esophageal cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 1, p. 837-842, 2015.

LI, Yaomin et al. miR-1268a regulates ABCB1 expression to mediate temozolomide resistance in glioblastoma. **Journal of neuro-oncology**, v. 138, n. 3, p. 499-508, 2018.

LOCHER, Kaspar P. Structure and mechanism of ABC transporters. **Current opinion in structural biology**, v. 14, n. 4, p. 426-431, 2004.

MA, Shao-lin et al. Lapatinib antagonizes multidrug resistance-associated protein 1-mediated multidrug resistance by inhibiting its transport function. **Molecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 390-399, 2014.

MASOODI, Khalid Z.; LONE, Sameena Maqbool; RASOOL, Rovidha Saba. **Advanced methods in molecular biology and biotechnology: a practical lab manual**. Academic Press, 2020.

MANCERA-MARTÍNEZ, Eder et al. ABCB1: A special factor that orchestrates translation at the crossroad between recycling and initiation. **RNA biology**, v. 14, n. 10, p. 1279-1285, 2017.

MARTINELLI, Fabio et al. Extracellular ATP regulates CD73 and ABCB6 expression in HepG2 cells. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 5, p. 75, 2018.

MENDONÇA-TORRES, Maria; ROBERTS, Stephen. The translocator protein (TSPO) ligand PK11195 induces apoptosis and cell cycle arrest and sensitizes to chemotherapy treatment in pre-and post-relapse neuroblastoma cell lines. **Cancer Biology & Therapy**, v. 14, n. 4, p. 319-326, 2013.

MEVADA, Jayeshkumar; DEVI, Sumedh; PANDIT, Aniruddha. Large scale microbial cell disruption using hydrodynamic cavitation: Energy saving options. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 151-160, 2019.

MILOŠEVIĆ, Zorica et al. Potential of the dual mTOR kinase inhibitor AZD2014 to overcome paclitaxel resistance in anaplastic thyroid carcinoma. **Cellular oncology**, v. 41, n. 4, p. 409-426, 2018.

MINAMI, Kentaro et al. Expression of ABCB6 is related to resistance to 5-FU, SN-38 and vincristine. **Anticancer research**, v. 34, n. 9, p. 4767-4773, 2014.

MINDERMAN, Hans et al. VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 5, p. 1826-1834, 2004.

MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Beatrice et al. Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. **Pancreas**, v. 42, n. 4, p. 707-716, 2013.

MOLDAY, Robert S.; ZHONG, Ming; QUAZI, Faraz. The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 7, p. 573-583, 2009.

MORITA, Shin-ya; TERADA, Tomohiro. Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

MURRAY, Jayne et al. Suppression of the ATP-binding cassette transporter ABCC4 impairs neuroblastoma tumour growth and sensitises to irinotecan in vivo. **European Journal of Cancer**, v. 83, p. 132-141, 2017.

NANCE, Rebecca et al. A method for isolating RNA from canine bone. **Biotechniques**, v. 68, n. 6, p. 311-317, 2020.

NARAYAN, Gopeshwar et al. Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: identification of candidate amplified and overexpressed genes. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 46, n. 4, p. 373-384, 2007.

NASIŁOWSKA-ADAMSKA, Barbara et al. BCRP mRNA and FLT3-ITD are independent poor risk factors in adult patients with acute myeloid leukemia and intermediate or normal karyotype. **European Journal of Haematology**, v. 99, n. 3, p. 255-261, 2017.

NISHIMURA, S. et al. Can ABCF2 protein expression predict the prognosis of uterine cancer?. **British journal of cancer**, v. 99, n. 10, p. 1651-1655, 2008.

NISHIMURA, Sadako et al. Differential expression of ABCF2 protein among different histologic types of epithelial ovarian cancer and in clear cell adenocarcinomas of different organs. **Human pathology**, v. 38, n. 1, p. 134-139, 2007.

NOOTER, Kees et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 1, n. 11, p. 1301-1310, 1995.

NOUVEL, Agathe et al. Optimization of RNA extraction methods from human metabolic tissue samples of the COMET biobank. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021. OGAWA, Yoshinari et al. Clinical role of ABCF2 expression in breast

cancer. **Anticancer research**, v. 26, n. 3A, p. 1809-1814, 2006.

OHTSUKI, Sumio et al. Correlation of induction of ATP binding cassette transporter A5 (ABCA5) and ABCB1 mRNAs with differentiation state of human colon tumor. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1144-1146, 2007.

ORAM, John F.; VAUGHAN, Ashley M. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. **Current opinion in lipidology**, v. 11, n. 3, p. 253-260, 2000.

OISO, Shigeru et al. Factors involved in the cisplatin resistance of KCP-4 human epidermoid carcinoma cells. **Oncology reports**, v. 31, n. 2, p. 719-726, 2014.

OVERBECK, Tobias R. et al. Intracellular ATP-binding cassette transporter A3 is expressed in lung cancer cells and modulates susceptibility to cisplatin and paclitaxel. **Oncology**, v. 84, n. 6, p. 362-370, 2013.

ÖZVEGY, Csilla et al. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 285, n. 1, p. 111-117, 2001.

PARIKH, Nisha I.; VASAN, Ramachandran S. Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. 2007.

PARK, Sarah et al. Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Breast cancer research and treatment**, v. 99, n. 1, p. 9-17, 2006.

PARTANEN, Laura et al. Amplification and overexpression of the ABCC3 (MRP3) gene in primary breast cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 51, n. 9, p. 832-840, 2012

.PAVLIKOVA, Lucia et al. The expression of P-gp in leukemia cells is associated with cross-resistance to protein N-glycosylation inhibitor tunicamycin. **Gen. Physiol. Biophys**, v. 35, p. 497-510, 2016.

PERRY, R. P. et al. On the lability of poly (A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 262, n. 2, p. 220-226, 1972.

PETERNEL, ŠPELA. Bacterial cell disruption: a crucial step in protein production. **New biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 250-254, 2013.

PIEHLER, Armin et al. Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. **Biochemical and biophysical research**

communications, v. 295, n. 2, p. 408-416, 2002.

PIÑEIRO, Roberto; FALASCA, Marco. Lysophosphatidylinositol signalling: new wine from an old bottle. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 4, p. 694-705, 2012.

RADY, Mona et al. Therapy-relevant aberrant expression of MRP3 and BCRP mRNA in TCC-/SCC-bladder cancer tissue of untreated patients. **Oncology Reports**, v. 38, n. 1, p. 551-560, 2017.

RAHGOZAR, Soheila et al. mRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. **Cancer biology & therapy**, v. 15, n. 1, p. 35-41, 2014.

REN, Yi; LI, Yinghui; TIAN, Dali. Role of the ABCE1 gene in human lung adenocarcinoma. **Oncology reports**, v. 27, n. 4, p. 965-970, 2012.

REUSTLE, Anna et al. Characterization of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in clear cell renal cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 143, n. 12, p. 3181-3193, 2018.

RIORDAN, J. R. et al. MC Iannuzzi, SF Collins and L.-C. Tsui. **Science**, v. 245, p. 1066-1073, 1989.

ROBEY, Robert W. et al. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. 145-152, 2001.

ROBEY, R. W. et al. Gottesman, structure of p-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. **Nat Rev Cancer**, v. 18, n. 7, p. 452-464, 2018.

SARMA, Aartik; CALFEE, Carolyn S.; WARE, Lorraine B. Biomarkers and precision medicine: state of the art. **Critical care clinics**, v. 36, n. 1, p. 155-165, 2020.

SAKIL, Habib AM et al. Δ Np73 regulates the expression of the multidrug-resistance genes ABCB1 and ABCB5 in breast cancer and melanoma cells-a short report. **Cellular Oncology**, v. 40, n. 6, p. 631-638, 2017.

SCHINKEL, Alfred H.; JONKER, Johan W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 138-153, 2012.

SCHUETZ, John D. et al. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. **Nature medicine**, v. 5, n. 9, p. 1048-1051, 1999. SHEN, Bin et al. Expression and function of ABCG2 in head and neck squamous

cell carcinoma and cell lines. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 2, n. 6, p. 1151-1157, 2011.

SHIOZAWA, Ken et al. Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic. **International journal of cancer**, v. 108, n. 1, p. 146-151, 2004.

SMITHERMAN, Pamela K. et al. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) in alkylating agent detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 1, p. 260-267, 2004.

STEINBACH, Daniel et al. ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. **Clinical cancer research**, v. 12, n. 14, p. 4357-4363, 2006.

STRAUTNIEKS, Sandra S. et al. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. **Gastroenterology**, v. 134, n. 4, p. 1203-1214. e8, 2008.

STRIMBU, K; TAVEL, J. A. What are biomarkers?. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463, 2010.

SUN, Yulin et al. ABCC4 copy number variation is associated with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 9, p. 1941-1950, 2014.

SZAKÁCS, Gergely et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 3, p. 219-234, 2006.

TANG, TINGTING et al. Effects of incorporating different kinds of peptides on the foaming properties of egg white powder. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 72, p. 102742, 2021.

THIELE, Juergen; KVASNICKA, Hans Michael; BOELTKEN, Barbara. Resident bone marrow macrophages in idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF): a histochemical and morphometric study on sequential trephine biopsies. **Leukemia research**, v. 23, n. 11, p. 983-985, 1999.

THEILE, Dirk et al. Evaluation of drug transporters' significance for multidrug resistance in head and neck squamous cell carcinoma. **Head & neck**, v. 33, n. 7, p. 959-968, 2011.

TIAN, Chunyan et al. ABCG1 as a potential oncogene in lung cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 6, p. 3189-3194, 2017.

TRASINO, Steven E.; KIM, Young S.; WANG, Thomas TY. Ligand, receptor, and cell type–dependent regulation of ABCA1 and ABCG1 mRNA in prostate cancer epithelial cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 8, n. 7, p. 1934-1945, 2009.

UEMURA, Takehiro et al. ABCC11/MRP8 confers pemetrexed resistance in lung cancer. **Cancer science**, v. 101, n. 11, p. 2404-2410, 2010.

VARGAS, Teodoro et al. ColoLipidGene: signature of lipid metabolism-related genes to predict prognosis in stage-II colon cancer patients. **Oncotarget**, v. 6, n. 9, p. 7348, 2015.

VAUGHAN, A. M. Oram JF. **ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. J Lipid Res**, v. 47, p. 2433-2443, 2006.

VAN DE VEN, Rieneke et al. A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 112, n. 6, p. 2353-2359, 2008.

VICKERS, Neil J. Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. **Current biology**, v. 27, n. 14, p. R713-R715, 2017

VOLPICELLI, Elgida R. et al. The multidrug-resistance transporter ABCB5 is expressed in human placenta. **International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists**, v. 33, n. 1, p. 45, 2014.

WAMUNYOKOLI, Fred W. et al. Expression profiling of mucinous tumors of the ovary identifies genes of clinicopathologic importance. **Clinical cancer research**, v. 12, n. 3, p. 690-700, 2006.

WANG, Jin et al. FL118, a novel survivin inhibitor, wins the battle against drug-resistant and metastatic lung cancers through inhibition of cancer stem cell-like properties. **American Journal of Translational Research**, v. 9, n. 8, p. 3676, 2017.

WANG, Lei; ZHANG, Mei; LIU, Dong-Xu. Knock-down of ABCE1 gene induces G1/S arrest in human oral cancer cells. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 9, p. 5495, 2014.

WEAVER, David A. et al. ABCC5, ERCC2, XPA and XRCC1 transcript abundance levels correlate with cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer cell lines. **Molecular cancer**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2005.

WEEN, M. P. et al. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 96, n. 2, p. 220-

256, 2015.

WENZEL, Jürgen J. et al. ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 306, n. 4, p. 1089-1098, 2003.

WHITT, Jason D. et al. Sulindac sulfide selectively increases sensitivity of ABCC1 expressing tumor cells to doxorubicin and glutathione depletion. **Journal of Biomedical Research**, v. 30, n. 2, p. 120, 2016.

WILSON, Brian J. et al. ABCB5 Maintains Melanoma-Initiating Cells through a Proinflammatory Cytokine Signaling Circuit ABCB5 Maintains Melanoma-Initiating Cells. **Cancer research**, v. 74, n. 15, p. 4196-4207, 2014.

WOODWARD, Owen M.; KÖTTGEN, Anna; KÖTTGEN, Michael. ABCG transporters and disease. **The FEBS journal**, v. 278, n. 18, p. 3215-3225, 2011.

XIONG, Jie et al. Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2015.

XU, Min et al. ABCB2 (TAP1) as the downstream target of SHH signaling enhances pancreatic ductal adenocarcinoma drug resistance. **Cancer letters**, v. 333, n. 2, p. 152-158, 2013.

XU, Qianqian; GUO, Junsong; CHEN, Weidong. Gambogic acid reverses P-glycoprotein mediated multidrug resistance in HepG2/Adr cells and its underlying mechanism. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 508, n. 3, p. 882-888, 2019.

YABUUCHI, Hikaru et al. ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 299, n. 3, p. 410-417, 2002.

YAMADA, Akimitsu et al. ABCC1-Exported Sphingosine-1-phosphate, Produced by Sphingosine Kinase 1, Shortens Survival of Mice and Patients with Breast Cancer Activated SPHK1 and S1P Export via ABCC1 Worsen Prognosis. **Molecular Cancer Research**, v. 16, n. 6, p. 1059-1070, 2018.

YANAMOTO, Souichi et al. Expression of the cancer stem cell markers CD44v6 and ABCG2 in tongue cancer: Effect of neoadjuvant chemotherapy on local recurrence. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 4, p. 1153-1162, 2014.

YANG, Xueying et al. The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits the migratory behaviour of 95-D lung carcinoma cells. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 58-62, 2010.

YASUI, Kohichiroh et al. Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. **Cancer research**, v. 64, n. 4, p. 1403-1410, 2004.

YOSHIDA, Makoto et al. Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycin exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin. **International journal of cancer**, v. 94, n. 3, p. 432-437, 2001.

YOUNG, Leah C. et al. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. 1798-1804, 2001.

YUAN, Zeting et al. Reversal of P-gp-mediated multidrug resistance in colon cancer by cinobufagin. **Oncology Reports**, v. 37, n. 3, p. 1815-1825, 2017.

ZAMAN, G. J. et al. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 17, p. 7690-7694, 1995.

ZHANG, Peng et al. Down-regulation of ABCE1 inhibits temozolomide resistance in glioma through the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 6, 2018.

ZHANG, Guangyu et al. Silencing of the ABCC4 gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer. **Oncology reports**, v. 33, n. 3, p. 1147-1154, 2015.

ZHAO, Hongbo et al. ABCC10 plays a significant role in the transport of gefitinib and contributes to acquired resistance to gefitinib in NSCLC. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1312, 2018.

ZHAO, Shi-Guang et al. Increased expression of ABCB6 enhances protoporphyrin IX accumulation and photodynamic effect in human glioma. **Annals of surgical oncology**, v. 20, n. 13, p. 4379-4388, 2013.

ZHAO, Xiaoting et al. ABCC4 is required for cell proliferation and tumorigenesis in non-small cell lung cancer. **OncoTargets and therapy**, v. 7, p. 343, 2014.

ZHAO, Yanbin et al. ABCC3 as a marker for multidrug resistance in non-small cell lung cancer. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2013.

ZHOU, Shu-Feng et al. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 20, p. 1981-2039, 2008

ZHOU, Zhi-yong et al. Nilotinib reverses ABCB1/P-glycoprotein-mediated

multidrug resistance but increases cardiotoxicity of doxorubicin in a MDR xenograft model. **Toxicology letters**, v. 259, p. 124-132, 2016.

ZHU, Xingang et al. Transport characteristics of tryptanthrin and its inhibitory effect on P-gp and MRP2 in Caco-2 cells. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 3, p. 325-335, 2011.

ZHU, Xue et al. The FoxM1-ABCC4 axis mediates carboplatin resistance in human retinoblastoma Y-79 cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 50, n. 9, p. 914-920, 2018.