

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELLE WATANABE DANIEL

AVALIAÇÃO DO USO DE EXTRAÇÃO DE RNA BASEADA NO MÉTODO DE
TRIZOL PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE
TRANSPORTADORES ABC EM TECIDOS DE MAMA

CURITIBA

2022

ISABELLE WATANABE DANIEL

AVALIAÇÃO DO USO DE EXTRAÇÃO DE RNA BASEADA NO MÉTODO DE TRIzol
PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES ABC
EM TECIDOS DE MAMA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Gláucio Valdameri
Co-orientadores: Prof. Dra. Vivian Rotuno Moure
Prof. Dra. Jeanine Marie Nardin

CURITIBA

2022

Daniel, Isabelle Watanabe
Avaliação do uso de extração de RNA baseada no método de TRIzol para
determinação da expressão gênica de transportadores ABC em tecidos de mama
[recurso eletrônico] / Isabelle Watanabe Daniel. – Curitiba, 2022.
1 arquivo (139 p.) : PDF.

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

Orientadora : Prof. Dr. Gláucio Valdameri
Coorientadores : Profa. Dra. Vivian Rotuno Moure
Profa. Dra. Jeanine Marie Nardin

1. Transportadores de Cassetes de Ligação de ATP. 2. Neoplasias da Mama.
3. Expressão Gênica. 4. Resistência a Medicamentos Antineoplásicos. I. Valdameri,
Gláucio. II. Moure, Vivian Rotuno. III. Nardin, Jeanine Marie. IV. Universidade
Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.7

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 **ISABELLE WATANABE DANIEL** intitulada: **Avaliação do uso de extração de RNA baseada no método de TRIZOL para determinação de expressão gênica de transportadores ABC em tecidos de mama**, 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, 01 de Novembro de 2022.



GLAUCIO VALDAMERI

Presidente da Banca Examinadora



FABIANE GOMES DE MORAES REGO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento primeiramente à Deus por sempre ter me guiado e Se mostrado presente em todos os momentos.

Meu agradecimento à minha mãe Edna, que sempre foi meu maior exemplo de força, meu porto seguro, meu acolhimento. Obrigada por sempre acreditar em mim, por me apoiar em todas minhas decisões e me ensinar a nunca desistir do que eu acredito.

Minha família – meu pai Jaime, meu padrasto Eraldo e meus avós, José, Tereza e Maria, que compreenderam todas as minhas ausências e sempre me apoiaram.

Aos meus amigos – da infância, da universidade, do mestrado, do trabalho, da vida – por todos os momentos de distração tão necessários na correria do dia a dia e no meio de uma pandemia, por todas as risadas, por toda a paciência, por também entenderem minhas ausências e por me incentivarem a continuar.

Aos colegas de laboratório, Júlia, Manoela, Diogo, Isadora e Giovana – tivemos poucos momentos no laboratório, mas foram suficientes para aprender muito com vocês.

Para minha dupla preferida, Kelly Karoline – dupla de faculdade, de Nissei, de residência, de congressos e apresentações em congressos, de festas, de desabafos, de risos e choros, de plantões e de mestrado. Sua amizade e toda essa parceria durante todos esses anos, principalmente no mestrado, foram fundamentais para chegar até aqui!

À Prof. Dra. Jeanine Nardin, que foi uma grande professora na residência e uma inspiração como profissional. Obrigada por me fazer enxergar o mestrado e a paixão pela pesquisa (tanto a acadêmica quanto a clínica).

Aos orientadores Prof. Dr. Gláucio Valdameri e Prof. Dra. Vivian Moure por todo o apoio, paciência e compreensão pelas ausências por trabalho, por todo suporte quando precisei de uma pausa. Vocês foram peças essenciais para que eu conseguisse concluir esse trabalho e me inspiram muito como pessoa e profissional.

As instituições de fomento CAPS, CNPq, PPSUS, Fundação Araucária.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Universidade Federal do Paraná por me permitir ser cientista em um país no qual a educação e ciência são cada dia mais sucateadas e ainda assim continua fazendo pesquisa de qualidade. Espero que muitos alunos ainda possam ter essa oportunidade única.

*"Many places I have been
Many sorrows I have seen
But I don't regret, nor will I forget
All who took the road with me"*

Billy Boyd

RESUMO

O câncer é a segunda causa de mortes no Brasil e no mundo, sendo considerado um problema de saúde pública mundial. Dentre os tipos de câncer mais incidentes, encontra-se o câncer de mama. Os medicamentos antineoplásicos compõem uma grande classe de agentes farmacológicos que podem ser utilizados no tratamento de diversos tumores, porém, a falha terapêutica continua sendo um dos maiores problemas para o paciente oncológico. Inúmeros mecanismos estão envolvidos na falha da terapêutica, entre eles diferenças farmacocinéticas entre os pacientes, a localização do tumor em locais do organismo onde as drogas não conseguem penetrar facilmente, alterações no microambiente tumoral e, o mais comum, correspondendo a 90% dos mecanismos de falha, o desenvolvimento de mecanismos de resistência à quimioterapia. Dentre os mecanismos de resistência, um dos principais é a superexpressão de transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*). Esses transportadores realizam o efluxo de drogas através de membranas, diminuindo sua concentração intracelular, o que leva à falha terapêutica e a indução do fenômeno de multirresistência às drogas. Desse modo, a identificação do nível de expressão desses transportadores em diferentes tipos de tumores permite caracterizar o papel dessas proteínas na resposta ao tratamento e também permite prever a resistência, uma vez que sua expressão pode estar aumentada antes mesmo do tratamento, podendo até mesmo caracterizar essas proteínas como biomarcadores para avaliar a resposta ao tratamento. Além disso, a caracterização dos transportadores pode possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, incluindo o desenvolvimento de fármacos, que possam inibir a atividade desses transportadores, com o objetivo de sensibilizar as células tumorais ao tratamento e, conseqüentemente, prolongar a sobrevida e qualidade de vida do paciente oncológico. Nesse trabalho, RNA total foi extraído de 90 amostras de tecidos de mama normal e tumoral com a utilização de TRIzol. Análises espectrofotométricas foram realizadas para determinação de concentração e qualidade do RNA total extraído e eletroforese em gel de agarose permitiu a avaliação da integridade. Para a grande maioria das amostras, a concentração de RNA total variou de 0,10 a 5,13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, com $A_{260}/_{280} \geq 1,8$. A expressão de transcritos de 20 proteínas ABC além de 3 genes normalizadores foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Os resultados sugerem que o método de extração de RNA total é eficiente a partir de amostra de tecido de mama humanos e que trabalhos futuros com número de coorte maior permitirão a análise de alteração de nível de expressão como preditor da resistência ao tratamento farmacológico clínica.

Palavras-chave: Transportadores ABC. Mecanismos de resistência. Câncer de mama. Resistência a antineoplásicos.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death in Brazil and worldwide, and it has been considered a worldwide public health problem. Breast cancer is one of the most incident types of cancer worldwide. Antineoplastic drugs comprise a large class of pharmacological agents which can be used to treat a large range of tumors, however, therapeutic failure remains one of the biggest problems for cancer patients. Several mechanisms are involved in therapeutic failure, including pharmacokinetic differences between patients, location of the tumor at places in the body where drugs cannot easily penetrate, changes in the tumor microenvironment and, most commonly, corresponding to 90% of the mechanisms of failure, the development of mechanisms of resistance to chemotherapy. Regarding the mechanisms of resistance, overexpression of ABC family transporters (ATP-Binding Cassette), has been one of the main mechanisms that lead to therapeutic failure. These transporters are responsible for efflux of drugs through membranes, decreasing intracellular concentration of drugs, which leads to the development of multidrug resistance phenome. Therefore, characterization of transporters' expression in different types of tumors allows the identification of the role that these proteins might have on treatment and also allows to predict resistance to drugs, once overexpression of these transporters may be increased before treatment and may even characterize these proteins as biomarkers to assess the response to treatment. In addition, characterization of transporters enables the development of new therapeutic strategies, including the development of new drugs, which can inhibit the activity of these transporters, sensitizing cancer cells to treatment and, consequently, prolonging survival and improving life's quality for cancer patients. In this work, total RNA was extracted from 90 samples of normal and tumor breast tissue using TRIzol. Spectrophotometric analyzes were performed to determine the concentration and quality of the total RNA extracted and agarose gel electrophoresis allowed the integrity assessment. For the vast majority of samples, the total RNA concentration ranged from 0.10 to 5.13 g/L, with $A_{260/280} \geq 1.8$. The expression of transcripts of 20 ABC proteins in addition to 3 normalizing genes was evaluated by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). The results suggest that the total RNA extraction method is efficient from human breast tissue samples and that future studies with larger cohort numbers will allow the analysis of expression level changes as a predictor of resistance to clinical pharmacological treatment.

Key words: ABC transporters. Mechanisms of resistance. Breast cancer. Resistance to antineoplastic drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mecanismos e moléculas envolvidos no processo de resistência às drogas em tecidos de câncer de mama	26
Figura 2:	Vias e mecanismos de resistência às drogas	28
Figura 3:	Os papéis dos transportadores ABC nas funções fisiológicas das células	32
Figura 4:	O mecanismo pelo qual os transportadores ABC participam da proteção das células através do efluxo de xenobióticos e drogas	33
Figura 5:	Topologia dos transportadores ABC	35
Figura 6:	mRNA ratio por RT-PCR das amostras de mama saudáveis	100
Figura 7:	mRNA ratio por RT-PCR das amostras de câncer de mama	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Características e localizações das proteínas ABC	39
Tabela 2:	Desenho dos normalizadores utilizados na RT-qPCR	62
Tabela 3:	Sequência dos primers dos genes que codificam para proteínas ABC	62
Tabela 4:	Preparo dos controles positivo e negativo para síntese do cDNA	68
Tabela 5:	Condições do termociclador para síntese do cDNA	69
Tabela 6:	Condições da RT-qPCR	70
Tabela 7:	Amostras de mama coletadas e processadas	71
Tabela 8:	Características clínicas dos pacientes.....	72
Tabela 9:	Resultados quantitativos e qualitativos das extrações das amostras de mama.....	77

LISTA DE SIGLAS

ABC	- ATP binding cassette
ATP	- Adenosina trifosfato
BCRP	- Breast Cancer Resistance Protein
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	- Deoxyribonucleic acid – ácido desoxirribonucleico
HER-2	- Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 – Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
MDR	- Multidrug Resistance – Resistência a múltiplas drogas
MRP	- Multidrug Resistance Protein – Proteína de resistência à múltiplas drogas
NBD	- Nucleotide Binding Domain – Domínio de ligação de nucleotídeos
OMS	- Organização Mundial da Saúde
P-gp	- Glicoproteína P
RE	- Receptor de estrogênio
RNA	- Ribonucleic acid – ácido ribonucleico
RP	- Receptor de progesterona
RT-qPCR	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
TMD	- Transmembrane Binding Domain – Domínio de ligação transmembrana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CÂNCER.....	15
2.2	CÂNCER DE MAMA	20
2.3	RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS	26
2.4	TRANSPORTADORES ABC	31
2.4.1	Subfamília ABCA	40
2.4.2	Subfamília ABCB	43
2.4.3	Subfamília ABCC	49
2.4.4	Subfamília ABCE	55
2.4.5	Subfamília ABCF	56
2.4.6	Subfamília ABCG	56
3	OBJETIVOS	59
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL	59
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
4	MATERIAIS	60
4.1	EXTRAÇÃO DE RNA	60
4.2	GEL DE AGAROSE	60
4.3	SÍNTESE DE cDNA E RT-qPCR	60
5	METODOLOGIA	65
5.1	COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS	65
5.2	EXTRAÇÃO DE RNA	65
5.3	ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DO RNA EM NANODROP	67
5.4	SÍNTESE DO cDNA	67
5.5	PCR EM TEMPO REAL	69
6	RESULTADOS	71
7	DISCUSSÃO	102
8	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS	109
	APÊNDICE 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA UFPR	129

APÊNDICE 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA HOSPITAL E MATERNIDADE	
ANGELINA CARON	135

1. INTRODUÇÃO

O câncer é definido como um conjunto de doenças no qual células anormais começam a se proliferar descontroladamente, podendo invadir outros tecidos e órgãos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2022), o câncer é a segunda causa de mortes no mundo e a doença continua a crescer globalmente, sendo considerado o principal problema de saúde pública mundial nos dias atuais. As opções de tratamento envolvem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, podendo ser utilizados isoladamente ou em combinação, conforme o tipo de tumor e estadiamento (Organização Mundial da Saúde – OMS, 2022).

Os medicamentos utilizados para o tratamento do câncer, classificados como agentes antineoplásicos, geralmente são administrados sistemicamente (intravenoso ou oral) e, conseqüentemente, podem sofrer alterações na absorção, no metabolismo e na distribuição dessas drogas, variando de indivíduo para indivíduo (SZAKACS et al., 2006).

Mesmo com inúmeras drogas sendo desenvolvidas e comercializadas para o tratamento do câncer, a falha terapêutica continua sendo um dos maiores problemas na sobrevida a longo prazo do paciente oncológico (XIAO et al., 2020). Dentre os mecanismos que levam a falha no tratamento, podem-se citar as diferenças farmacocinéticas entre os pacientes, a localização do tumor em locais do organismo onde as drogas não conseguem penetrar facilmente, alterações no microambiente tumoral, como aumento da pressão hidrostática ou alterações na vascularização e o desenvolvimento de mecanismos de resistência à quimioterapia (SZAKACS et al., 2006), sendo esse último correspondente a cerca de 90% dessas falhas (XIAO et al., 2020). A resistência a quimioterapia pode ser tanto intrínseca ou extrínseca (adquirida) e tem um importante papel no tratamento do câncer, interferindo no tratamento adequado e nos desfechos clínicos dos pacientes (PARK et. al, 2006; LONGLEY e JOHNSTON, 2005).

Diversos mecanismos celulares de resistência podem ser encontrados na literatura (PARK et al., 2006). A superexpressão dos transportadores ABC tem sido descrita como um dos principais mecanismos no qual agentes antineoplásicos sofrem efluxo e são eliminados das células tumorais, reduzindo as concentrações intracelulares desses agentes e tornando o tumor resistente à droga (PARK et al., 2006; SZAKACS et al., 2006; XIAO et al., 2020). Dentre os agentes antineoplásicos que sofrem efluxo pelas

células, estão os taxanos, inibidores da topoisomerase, alcaloides de vinca e os antimetabólitos (XIAO, et al., 2020).

Os transportadores ABC (ATP-binding cassette) compõem uma família de transportadores envolvidos no efluxo e resistência às drogas, mediando o transporte do citosol para o meio extracelular (XIAO, et al., 2020) e induzindo a falha terapêutica (PARK et al., 2006). Devido a sua capacidade de se ligar a mais de 100 drogas diferentes, os transportadores ABC podem influenciar a farmacocinética e farmacodinâmica desses fármacos (XIAO, et al., 2020) incluindo a resistência, cujo impacto é muito importante no tratamento do paciente oncológico (PARK et al., 2006). Além disso, os transportadores ABC também estão envolvidos no processo de multirresistência à droga, também denominado de resistência à múltiplas drogas (MDR), nas hepatites e no HIV (MOHAMMAD, HE e YIN, 2018).

A caracterização da expressão dos transportadores ABC em tecidos tumorais pode permitir estabelecer uma relação com a resposta clínica desses pacientes e as drogas utilizadas. Uma vez estabelecida essa relação, seria possível analisar o perfil de expressão gênica de cada paciente e escolher um tratamento mais específico, baseado nos transportadores expressos e desfechos clínicos desejados, de modo a garantir uma terapia mais efetiva e evitando efeitos adversos desnecessários (PARK et al., 2006). Além disso, identificar os mecanismos que levam um tumor a se tornar resistente aos tratamentos farmacológicos permite a elaboração de estratégias de tratamento para contornar esses mecanismos, o que teria um impacto clínico significativo para os pacientes (LONGLEY e JOHNSTON, 2005).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O câncer, também conhecido como neoplasia ou tumor maligno, é composto por um conjunto de doenças nas quais células anormais começam a se proliferar descontroladamente, podendo invadir outros tecidos e órgãos (OMS, 2022). Esse descontrole na proliferação celular pode ocorrer em qualquer tecido e sua apresentação, desenvolvimento e desfechos clínicos variam de acordo com cada organismo (OMS, 2022; IARC, 2008). O processo de invadir outros tecidos e se espalhar pelo organismo é conhecido como metástase, sendo esta a maior causa de mortes por câncer (OMS, 2022; IARC, 2008).

O surgimento do câncer se dá através do processo de carcinogênese. A carcinogênese pode ser dividida em três etapas principais, denominadas iniciação, promoção e progressão. Durante a iniciação, células normais e saudáveis sofrem alguma mutação no DNA e são transformadas em células cancerosas através de inúmeras mudanças metabólicas, resultando em uma proliferação celular excessiva (IARC, 2008). O desenvolvimento do tumor também depende da combinação da susceptibilidade genética de cada indivíduo com agentes externos, denominados carcinógenos. Os carcinógenos são distribuídos em 3 categorias principais: agentes físicos (radiação ultravioleta e ionizante), agentes químicos (componentes do cigarro, aflatoxinas, arsênio, etc) e agentes biológicos (vírus Epstein-Barr, HIV, HPV, bactérias, parasitas) (OMS, 2022). Inúmeros agentes carcinógenos têm a capacidade causar alterações no DNA, induzindo modificação na sua sequência e levando a mutações. Em um organismo saudável, esse processo é altamente controlado através de mecanismos de reparo de dano do DNA, o qual consegue identificar mutações e danos no DNA de uma célula iniciada e induzir a célula ao reparo desse dano ou a apoptose (IARC, 2008). Quando a célula iniciada consegue escapar dos mecanismos de reparo do organismo e continua se proliferando, temos a segunda etapa do processo de carcinogênese, denominado promoção. A partir do momento que essas células iniciadas começam acumular inúmeras mutações e a invadir tecidos adjacentes e distantes, temos a terceira etapa, denominada progressão, na qual é possível observar a formação das metástases (IARC, 2008).

Além do escape da apoptose, as células cancerosas também desenvolvem outros mecanismos, conhecidos como “hallmarks” (marcas), característicos de células tumorais, entre eles a sinalização sustentada de proliferação, o escape dos mecanismos supressores/controladores de crescimentos, o escape da destruição pelo sistema imune, a capacidade de se proliferar de modo imortal, a inflamação promovida pelo tumor, indução dos mecanismos de angiogênese, ativação da invasão de tecidos e metástases, mutações e instabilidade no genoma e alteração do metabolismo energético da célula (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Considerando a complexidade das células cancerosas, acredita-se que combinações de agentes que atuem em diferentes mecanismos característicos dessas células seja uma boa estratégia terapêutica para conseguir uma terapia mais efetiva e com maior período de remissão para o paciente (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Assim como a complexidade e heterogeneidade das células cancerosas, o tratamento do câncer também pode ser complexo, sendo dependente principalmente de um diagnóstico precoce e adequado. O tratamento do câncer pode ser multimodal, abrangendo a cirurgia, a radioterapia e a terapia sistêmica farmacológica, a qual envolve uma ampla classe de agentes antineoplásicos (quimioterapia, hormonioterapia, terapia alvo e imunoterapia) (OMS, 2022; INCA, 2020).

Os agentes antineoplásicos podem ser classificados em agentes convencionais e terapias alvo. Os agentes convencionais englobam os antimetabólitos (análogos do folato, análogos das pirimidinas, análogos das purinas), agentes alquilantes (mostardas nitrogenadas, derivados das platinas), inibidores da topoisomerase, antraciclinas, alcaloides da vinca e taxanos, enquanto as terapias alvo incluem os inibidores de tirosina quinase, inibidores de proteossoma, inibidores das vias de sinalização, inibidores de receptores de fatores de crescimento, entre outros (GUICHARD et al., 2017).

A resposta a terapias antineoplásicas pode ser avaliada de diversas maneiras, entre elas pela presença de biomarcadores ou marcadores tumorais. De acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA), biomarcadores são classificados como componentes biológicos que podem ser quantificados de modo reprodutível, podendo ser um preditivo das taxas de sobrevivência ou um indicativo de resposta a tratamentos, além de serem utilizados no diagnóstico precoce de doenças e monitoramento de tratamentos (FDA-NIH *Biomarker Working Group*, 2016). Na literatura podem ser encontradas

diversas definições de biomarcadores, porém, a grande maioria se referindo a uma substância ou componente que pode ser mensurado e relacionado como um indicador de algum processo natural do organismo, algum processo patológico ou como uma resposta a alguma intervenção terapêutica, podendo influenciar ou prever o desfecho de uma doença (STRIMBU e TAVEL, 2011; ARONSON e FERNER, 2017). Dentre os componentes que podem ser classificados como biomarcadores encontram-se as proteínas, ácidos nucleicos, anticorpos, peptídeos, além de alterações características em estruturas moleculares, como alterações na expressão genética, proteômica e genômica de uma célula. Os biomarcadores genéticos ainda podem ser hereditários e identificados em células germinativas, ou somáticos e identificados em mutações genéticas em tecidos alterados, como os tecidos tumorais (HENRY e HAYES, 2012).

Os biomarcadores podem ser utilizados para rastreamento e caracterização de doenças, diagnóstico e estadiamento de patologias, indicativo de prognóstico, identificação de tipos celulares, preditivo para avaliação de eventos adversos e resposta a um determinado tratamento, alvo terapêutico para terapias individualizadas, entre outros (ARONSON e FERNER, 2017). Os biomarcadores também podem ser classificados conforme o seu alvo, como por exemplo, biomarcadores moleculares, celulares, teciduais, entre outros. A vantagem da utilização dos biomarcadores na clínica se dá pelo fato de os mesmos poderem ser analisados repetidamente, em um curto período de tempo e com custos acessíveis. Além dos usos já mencionados, os biomarcadores podem auxiliar em diversas etapas durante o desenvolvimento de novas drogas e alvos terapêuticos, como por exemplo, desfecho em estudos de farmacodinâmica, em estudos de análise de concentração de drogas e seus efeitos terapêuticos, avaliação da eficácia clínica de estudos clínicos através das alterações dos biomarcadores antes e depois de um procedimento do estudo clínico (como por exemplo, administração da droga em estudo), determinação de eventos adversos de novas drogas, entre outros (ARONSON e FERNER, 2017).

Na oncologia, o uso de biomarcadores tem sido utilizado para avaliar a carga tumoral, avaliar o risco de desenvolver tumores, determinar o prognóstico do câncer, além de servirem como marcadores para prever e avaliar a resposta do tumor a determinados tratamentos, incluindo tratamento medicamentoso e avaliar a progressão da doença.

(HENRY e HAYES, 2012; ARONSON e FERNER, 2017). Além disso, na oncologia, os biomarcadores podem ser classificados como prognóstico ou preditivos. Os marcadores de prognóstico na oncologia são utilizados como um indicador clínico do percurso natural e desfecho da doença, ou seja, um indicador de como essa doença se desenvolve, sua probabilidade de recidivar ou progredir, independentemente do tratamento que o paciente receba (DE ROOCK et al., 2009; CESANO e WARREN, 2018). Por outro lado, os biomarcadores preditivos são um indicativo de como um paciente poderá responder a um determinado tratamento, ou seja, a presença ou não desse biomarcador influencia a resposta e desfecho da doença à um determinado tratamento, sendo utilizado para avaliar a escolha terapêutica para os pacientes, proporcionando uma terapia mais direcionada e minimizando os riscos de toxicidade (DE ROOCK et al., 2009; CESANO e WARREN, 2018).

Alguns exemplos de marcadores usados na oncologia são CA125 (marcador de câncer de endométrio, ovário e câncer de próstata,), CA 19.9 (câncer de fígado, pâncreas, colorretal), gene BRCA1 e BRCA2 (mutações nesses genes estão associados ao desenvolvimento de câncer de mama e ovário), gene *KRAS* (mutações nesse gene em tumores de colorretal influenciam a escolha do tratamento antineoplásico, sendo indicado o tratamento com cetuximabe ou panitumumabe apenas quando esse gene não é mutado, ou seja, quando o gene é selvagem), gene *BRAF V600E* e *V600K* (influenciam a escolha do tratamento de melanoma), receptor de membrana HER-2 (a superexpressão dessa proteína na membrana das células cancerosas também influencia a escolha do tratamento de pacientes com câncer de mama), gene *BCR-ABL* (a translocação de genes *BCR* e *ABL* resulta a formação do gene *BCR-ABL*, caracterizando o cromossomo como “cromossomo Filadélfia”, altamente associado a leucemia mielóide crônica e a escolha do seu tratamento) (DE ROOCK et al., 2009; KALIA, 2015; ARONSON e FERNER, 2017; CESANO e WARREN, 2018). Na prática clínica, muitos dos marcadores são utilizados tanto análise de prognóstico como preditiva, como por exemplo, a superexpressão de HER-2 nos tumores de mama – como marcador prognóstico, a superexpressão possui um prognóstico negativo, porém um preditivo positivo para resposta ao tratamento com terapia alvo, como trastuzumabe (DE ROOCK et al., 2009).

Em relação aos mecanismos de resistência às drogas, inúmeros biomarcadores preditivos e prognósticos têm sido avaliados como marcadores de resistência às drogas para auxiliar na melhor escolha terapêutica para os pacientes e para compreender os mecanismos de progressão dos tumores (FONTANA, ANSELMi e LIMONTA, 2022; ABERUYI, RAHGOZAR, GHODOUSI e GHAEDI, 2020; KUMAR e MISHRA, 2022). Esses biomarcadores podem identificar ácidos nucleicos, alterações epigenéticas, expressão de proteínas e até mesmo alterações metabólicas. Um exemplo de marcador de resistência é a mutação no domínio da tirosina quinase da proteína codificada pelo gene *BCR-ABL* nas leucemias mielóides crônicas, fazendo com que as proteínas não sejam mais inibidas pelos inibidores de tirosina quinase (KUMAR e MISHRA, 2022). Os transportadores ABC também têm sido reportados como possíveis biomarcadores de resistência em diversos tumores, incluindo tumores de mama (FONTANA, ANSELMi e LIMONTA, 2022; ABERUYI, RAHGOZAR, GHODOUSI e GHAEDI, 2020; KUMAR e MISHRA, 2022).

Tanto a incidência quanto a mortalidade do câncer vêm crescendo rapidamente no mundo inteiro. Tal crescimento tem sido associado a diversos fatores, como o envelhecimento da população mundial, crescimento populacional, mudanças na prevalência e distribuição dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer, muito associados ao desenvolvimento socioeconômico e hábitos de vida (alimentação, sedentarismo, estresse, poluição, etc) (BRAY et al., 2018).

Dentre os fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer estão aumento da massa corpórea, baixo consumo de frutas e vegetais, sedentarismo, consumo de cigarro e bebida alcoólica. O cigarro é o fator de risco mais importante, responsável por aproximadamente 22% das mortes por câncer (OMS, 2022). No Brasil e no mundo, o câncer é a segunda maior causa de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) (INCA, 2020; OMS, 2022).

Em 2020, houve cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo, sendo os mais comuns o câncer de mama (2,26 milhões de novos casos), câncer de pulmão (2,21 milhões de novos casos), cólon e reto (1,93 milhões), próstata (1,41 milhões), pele não-melanoma (1,2 milhões) e estômago (1,09 milhões). Em relação a mortalidade, no mesmo ano, cerca de 10 milhões de pessoas no mundo morreram por

câncer, sendo que os tumores com maior taxa de mortalidade foram os cânceres de pulmão (1,8 milhões de mortes), cólon e reto (916.000 mortes), fígado (830.000 mortes), estômago (769.000 mortes) e mama (685.000). Para o ano de 2040, são estimados 30,2 milhões de novos casos de câncer no mundo com cerca de 16,3 milhões de morte por essa doença (IARC, 2021).

2.2 CÂNCER DE MAMA

No Brasil e no mundo, o câncer de mama é o segundo tumor mais comum, sendo o mais incidente nas mulheres, exceto pelos tumores de pele não melanoma. Para 2022 estimam-se cerca de 66.280 casos novos no Brasil. O câncer de mama tem sua incidência aumentada de acordo com a idade, sendo raro em mulheres jovens e apresentando uma maior incidência em mulheres acima de 50 anos (INCA, 2019). Além disso, países desenvolvidos possuem uma maior incidência desse tipo de tumor (MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019)

Apesar das inúmeras opções terapêuticas para o tratamento do câncer de mama, em 2012, o câncer de mama foi a quinta causa de morte no mundo, correspondente a 324.000 mortes e segue sendo a segunda causa de morte por tumores no mundo e a principal causa de mortes por tumores em mulheres (ARMSTRONG et. al., 2019). Apesar de mais incidente em países desenvolvidos, a mortalidade é mais elevada em países subdesenvolvidos (MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019). Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama encontram-se a idade, menopausa tardia, uso de contraceptivos hormonais, fatores hereditários (inclusive histórico familiar de câncer de mama), obesidade e sobrepeso, consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo, diabetes, exposição à radiação, exposição a poluição, condições socioeconômicas, entre outros. Além disso, alguns estudos relatam que determinados fatores podem exercer um perfil protetor no desenvolvimento de câncer de mama, como atividades físicas, vitamina D e gravidez (MOMENIMOVAHED e SALEHINIYA, 2019). Fatores hereditários não são tão comuns mas desempenham um papel importante no desenvolvimento dos tumores de mama, sendo que apenas 5 a 6% dos tumores de mama possuem algum fator hereditário. Dentre esses fatores, os genes *BRCA-1* e *BRCA-2*

correspondem a 80% dos casos de câncer de mama hereditário, sendo que a positividade de *BRCA-1* e *BRCA-2* nas mulheres aumenta de 50 a 85% o risco de desenvolvimento de câncer de mama e 15 a 65% do risco de desenvolvimento de câncer de ovário, principalmente em pacientes mais jovens (a partir de 25 anos) (RICHIE e SWANSON, 2003).

Em homens o câncer de mama é raro, correspondendo a cerca de 1% dos tumores de mama no mundo. O risco de um homem desenvolver um câncer de mama é de 1:1000 enquanto nas mulheres é de 1:8. Nos homens, os fatores de risco são idade, etnia (homens negros tem mais chances de desenvolver tumores de mama), histórico familiar de câncer de mama, fatores genéticos e fatores hormonais (síndrome de Klinefelter – caracterizada por hipogonadismo e baixos níveis séricos de testosterona - ginecomastia, doenças de fígado, obesidade). O câncer de mama em homens está mais associado a um risco aumentado de mutações nos genes *BRCA* comparado com o risco no câncer de mama em mulheres (GIORDANO, 2018).

O câncer de mama se caracteriza por ser uma doença altamente heterogênea, apresentando uma variedade de características biológicas e morfológicas, e, seus subtipos moleculares influenciam desde o prognóstico da doença até as escolhas de tratamento. (CIRQUEIRA et. al., 2011; TSANG e TSE, 2020; YIN et al., 2020). Em relação a classificação histológica, o câncer de mama pode ser dividido em diversas classes, sendo as mais comuns o carcinoma ductal ou lobular, sendo que o carcinoma ductal invasivo ou infiltrante corresponde a mais de 70% dos tumores de mama, e o carcinoma lobular invasivo corresponde a cerca de 10% dos carcinomas de mama invasivo. Outras classificações são os carcinomas mucinosos, cribiforme, micropapilar, papilar, tubular, medular, metaplásico e carcinoma apócrino, porém, são tumores menos comuns (TSANG e TSE, 2020). A classificação histológica leva em consideração inúmeros aspectos das células tumorais, incluindo o tipo celular (características apócrinas ou não), capacidade de secreção extracelular, características da estrutura da célula e perfil imunohistoquímico (TSANG e TSE, 2020).

Tumores de mama com a mesma classificação histológica podem ter perfis biológicos completamente diferentes, consequência da ampla variedade molecular entre eles (TSANG e TSE, 2020). Em relação a classificação molecular, os tumores são

classificados conforme a expressão ou não de receptores hormonais (receptor de estrogênio RE e receptor de progesterona RP), expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (*human epidermal growth factor receptor-2* – HER-2) e expressão do marcador de proliferação celular Ki-67. O Ki-67 é um antígeno utilizado como marcador nuclear que se encontra expresso no núcleo das células em todas as fases da proliferação celular, sendo muito utilizado para avaliar a proliferação das células tumorais de mama e diferenciar a classificação molecular (NIELSEN et al., 2021; HARBECK et al., 2019; DOWSETT, et al., 2011). Desse modo, os tumores podem ser classificados em 5 diferentes categorias: luminal A, luminal B HER-2 negativo, luminal B HER-2 positivo, HER-2 positivo (ou superexpressão de HER-2) e triplo negativo (HARBECK et al., 2019).

A presença de receptores hormonais – RE e RP – classifica os tumores como tumores luminais e caracterizam um tumor menos agressivo e com boa resposta a terapias hormonais. A grande maioria dos tumores classificados como luminais (cerca de 75%) expressam receptores hormonais, sendo que, a expressão de apenas um desses receptores hormonais configuram um perfil mais agressivo ao tumor e com uma baixa resposta a terapia hormonal. A presença desses receptores é fundamental na escolha do tratamento do paciente e também influenciam no prognóstico do paciente (TSANG e TSE, 2020).

Os tumores classificados como luminal A e luminal B possuem expressão dos receptores hormonais RP e RE. Por outro lado, a diferença entre luminal A e luminal B é possibilidade de expressão de HER-2 pelos tumores luminal B, enquanto o luminal A não expressam HER-2. Além disso, os tumores luminais A apresentam um índice de Ki-67 menor que 14%. O subtipo luminal A chega a representar 60% dos tumores de mama e, geralmente, possuem um melhor prognóstico. Terapias hormonais como tamoxifeno e anastrozol geralmente são drogas utilizadas no tratamento desse tipo molecular (CIRQUEIRA et. al., 2011; TSANG e TSE, 2020)

Como mencionado, o subtipo luminal B classifica-se pela presença dos receptores hormonais RP e RE, podem ou não expressar HER-2 e possuem alto índice proliferativo (índice de Ki-67 superior a 14%). Por essas características, o subtipo luminal B apresenta um pior prognóstico quando comparado ao luminal A, apresentando maior risco de

recidiva, menor sobrevida livre de doença e maior risco de resistência às terapias hormonais, sendo seu tratamento na grande maioria das vezes associado a agentes antineoplásicos citotóxicos (CIRQUEIRA et. al., 2011).

Tumores HER-2, *basal-like* e *normal-like* não expressam receptores hormonais. Tumores HER-2 são caracterizados pela alta expressão da proteína HER-2, sendo que, para classificar um tumor como HER-2 positivo, mais de 10% das células devem apresentar a superexpressão desse receptor em uma análise por imunohistoquímica. A superexpressão de HER-2 está associada com um tumor de perfil mais agressivo e com um pior prognóstico, porém, pode ser altamente responsivo a tratamentos inibidores do receptor HER-2, como por exemplo, tratamento com trastuzumabe, o que melhora o prognóstico dessa doença (TSANG e TSE, 2020). Terapias alvo para o receptor HER-2 melhora o prognóstico da doença por melhorar as taxas de resposta ao tratamento, reduzir o risco de recidiva, reduzir a progressão de doença e melhorar a sobrevida, podendo ser utilizado de forma isolada ou associado à terapia antineoplásica citotóxica (CIRQUEIRA et. al., 2011).

Os subtipos *basal-like* e *normal-like* também podem ser chamados de triplo negativo e são caracterizados por não expressarem receptores de estrogênio e progesterona e não expressarem o receptor de fator de crescimento epidérmico-2 (HER-2 - human epidermal growth factor receptor-2). O subtipo basalóide, ou basal-like, caracteriza-se também pela expressão de genes comuns nas células basais e mioepiteliais, enquanto o mama-normal símile, ou normal-like, apresenta elevada expressão de genes comumente presentes nas células epiteliais normais, células adiposas e células estromais da mama (CIRQUEIRA et. al. 2011). Além disso, algumas literaturas subdividem os tumores de mama triplo negativo em: imunomodulatório, luminal receptor de androgênio, mesenquimal-like e basal-like imunossuprimido, porém, essa classificação não é tão comum na prática clínica (YIN et al., 2020).

Câncer de mama triplo negativo costuma ser mais invasivo, sendo que 46% das pacientes vão apresentar metástase, com menor taxa de sobrevida quando comparado aos outros subtipos e com alta taxa de mortalidade, chegando a 40% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico. Após o diagnóstico de metástase, que costuma ocorrer em média após 3 anos do diagnóstico inicial, o tempo de sobrevida é em torno de 13 meses,

sendo que as metástases geralmente ocorrem no sistema nervoso, pulmão e fígado. O tempo de recidiva para pacientes com tumor de mama triplo negativo geralmente varia entre 19 a 40 meses, comparado com 35 a 67 meses para outros subtipos de tumores de mama. Após recidiva, a mortalidade das pacientes em 3 meses é maior que 75% (YIN et. al., 2020; SILVA et. al., 2020). Câncer de mama triplo negativo geralmente atinge mulheres pré menopausa, com menos de 40 anos de idade, correspondendo a 15-20% dos tumores de mama (YIN, et. al., 2020). Devido às suas características moleculares, tumores de mama triplo negativo não costumam responder a terapia hormonal ou terapia alvo, como inibidores HER-2, sendo os agentes antineoplásicos convencionais (agente citotóxicos) as principais drogas de escolha, porém, com baixa eficácia terapêutica (YIN, et. al., 2020)

A determinação do subtipo molecular dos tumores ainda é baseada na técnica de imunohistoquímica, que avalia a expressão proteica *in situ* nas células cancerosas. A imunohistoquímica permite avaliar a expressão das proteínas em diferentes tipos de amostras, de diversos tamanhos, com baixos custos e com rápida execução quando comparados a análise de expressão gênica (CIRQUEIRA et. al., 2011). A determinação de cada tipo histológico e molecular é essencial para analisar o perfil do tumor, seu prognóstico e também direcionar as linhas de tratamento (TSANG e TSE, 2020).

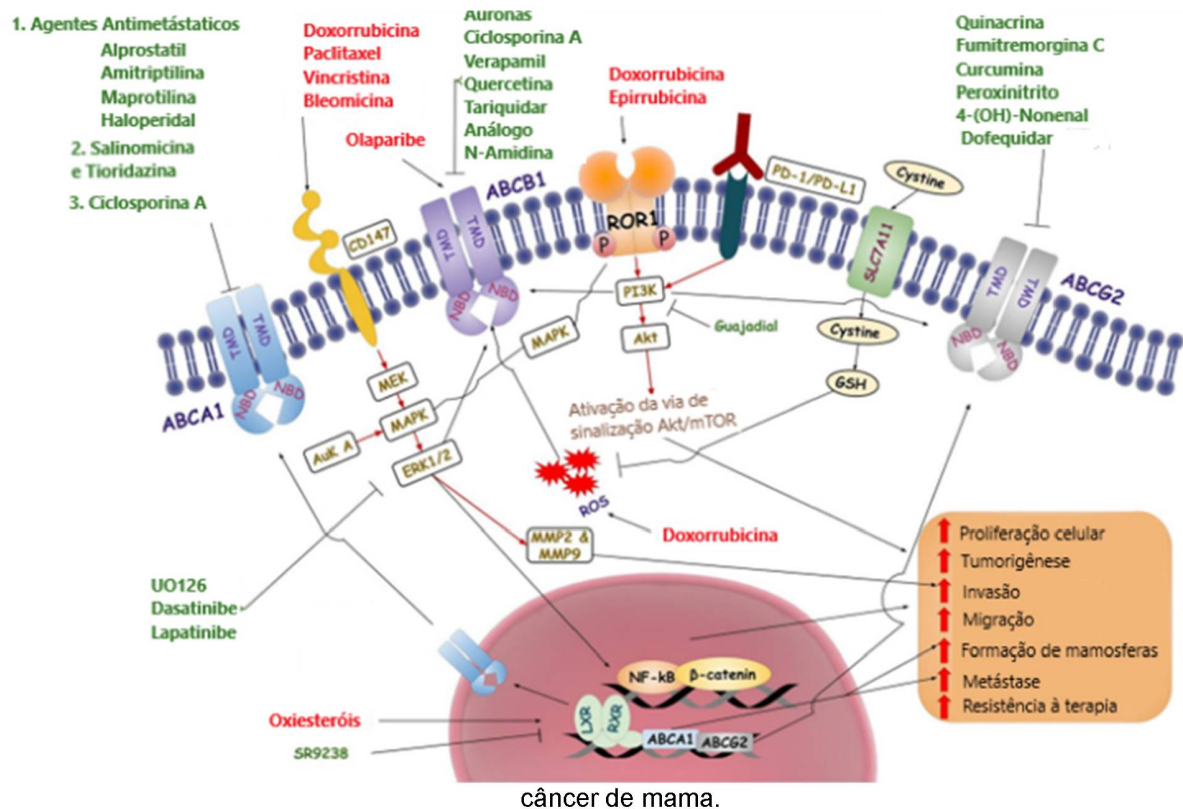
O estadiamento do tumor de mama é baseado na classificação TNM, onde T leva em consideração o tamanho do tumor, N se refere ao acometimento de linfonodos e M se refere a presença ou não de metástases distantes (TSANG e TSE, 2020). Com base nisso, os tumores podem ser estratificados em 5 diferentes estadiamentos – estadiamento 0, I, II, III e IV (TSANG e TSE, 2020). O estadiamento do tumor também é baseado em fatores prognósticos e preditivos, sendo que os fatores prognósticos costumam ser características mensuráveis e que permitem avaliar a evolução clínica do paciente. Por outro lado, os fatores preditivos influenciam na classificação desses tumores e estão geralmente relacionados a classificação histológica e molecular, influenciando a resposta às terapias (CIRQUEIRA et. al., 2011).

Em relação ao tratamento dos tumores de mama, vários fatores são levados em consideração no momento do seu diagnóstico, desde o estadiamento e subtipo molecular, como já mencionados, como a avaliação da condição clínica do paciente.

Durante essa avaliação, são identificados critérios como a inflamação do tumor, aderência do tumor a tecidos adjacentes (parede torácica), envolvimento neurovascular das estruturas axilares, linfedema, envolvimento do tecido epitelial e avaliação de ulcerações, entre outros. Essa avaliação pode ser feita através de exames físicos e exames de imagem e ajudam a definir se o tumor é operável, se necessita de um tratamento neoadjuvante (tratamento medicamentoso com intuito de reduzir o tamanho do tumor antes de um tratamento definitivo, como cirurgia ou radioterapia), se necessita tratamento adjuvante (indicado quando o objetivo do tratamento é curativo) ou se possui uma indicação paliativa (quando não há mais chances de cura e o tratamento visa garantir conforto, qualidade de vida e prolongar a sobrevivência do paciente). Além das cirurgias (como mastectomia, cirurgia realizada para retirada de um ou ambas as mamas) e radioterapia, um dos principais tratamentos para cânceres de mama é o tratamento farmacológico, com uso de quimioterapia (agentes antineoplásicos citotóxicos), terapias alvo, imunoterapias e terapias hormonais (MOO et. al., 2018).

Apesar do grande número de drogas existentes e das inúmeras opções de tratamento (combinados ou não), a grande maioria dos pacientes com câncer metastático morrem pelo fato do câncer desenvolver o mecanismo de MDR (ROBEY et al., 2018). Nos tumores de mama, diversos mecanismos podem ser associados ao desenvolvimento de resistência às drogas, inclusive a presença dos transportadores ABC, conforme mostra figura 1. O perfil de expressão das proteínas ABC varia conforme a localização no tecido de mama. Nas células epiteliais luminais é possível encontrar as proteínas ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA5, ABCA9, ABCA10, ABCB1, ABCB2, ABCB3, ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB9, ABCC3, ABCC4, ABCC8, ABCC10, ABCD3, ABCE1, ABCF1, ABCF2, ABCF3, ABCG1, ABCG2 e ABCG8. Já nas células mioepiteliais encontramos as proteínas ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA5, ABCA9, ABCB2, ABCB3, ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB9, ABCC10, ABCD3, ABCF1, ABCF2, ABCF3, ABCG1 e ABCG8. Nos adipócitos do tecido mamário encontram-se as proteínas ABCA1, ABCA5, ABCA9, ABCB7, ABCB9, ABCD3 e ABCG8 (MODI et al., 2022). Em relação aos tumores de mama, observa-se que, além das proteínas já expressas, outras proteínas da família ABC também podem ser encontradas, como ABCA6, ABCA13, ABCB4, ABCC1, ABCC2, ABCC5, ABCD1E ABCD4 (MODI et al., 2022).

FIGURA 1: Mecanismos e moléculas envolvidos no processo de resistência às drogas em tecidos de



FONTE: adaptada de MODI et al., 2022

2.3 RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

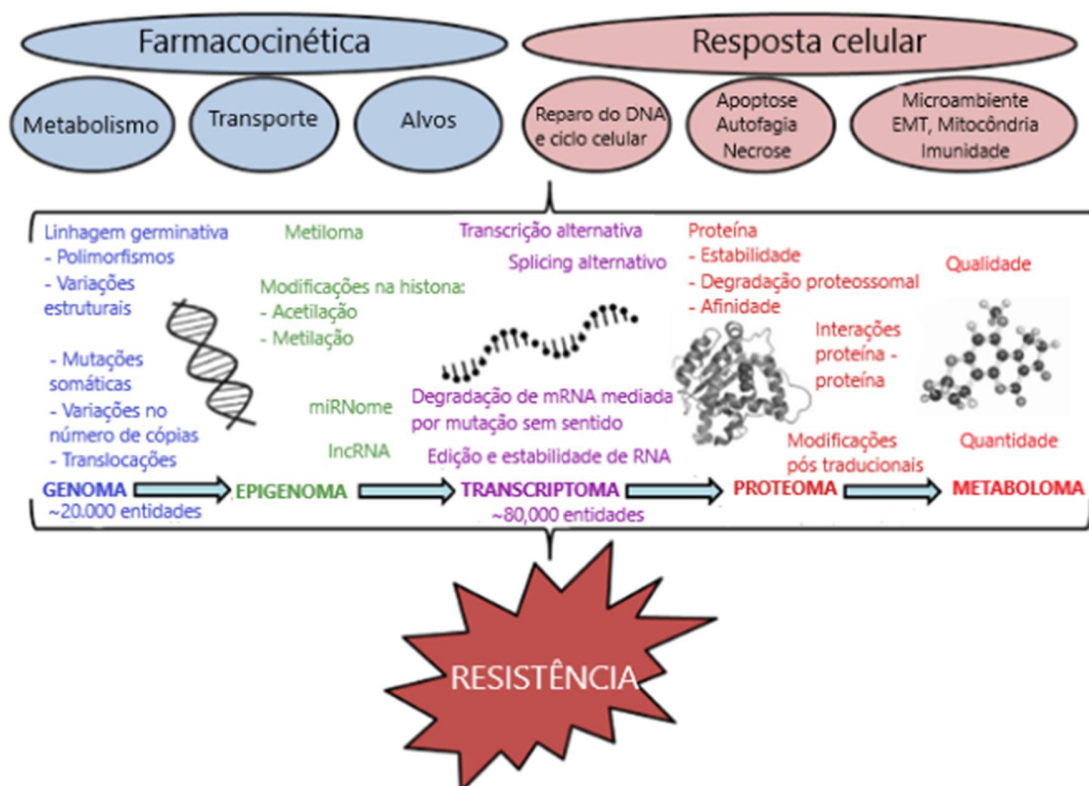
O fenômeno de multirresistência às drogas ou resistência à múltiplas drogas (*multidrug resistance* – MDR) em oncologia é definida como um processo complexo e multifatorial, no qual as células tumorais se tornam irresponsivas ou insensíveis à inúmeros agentes antineoplásicos, que podem ou não ter uma relação funcional ou estrutural, se tornando resistentes a essas drogas (WEEN et al., 2015; TIWARI, et al., 2011). O processo de multirresistência pode ocorrer até mesmo com drogas as quais o paciente ainda não foi exposto (WEEN et al., 2015).

A resistência à quimioterapia é um processo multifatorial e pode ser tanto intrínseca quanto adquirida, como mostrado na figura 2 (WEEN et al., 2015; VRANA et

al., 2018). Em relação a resistência intrínseca, a literatura relata que alguns tumores, após um tratamento antineoplásico, possuem a capacidade de se proliferar novamente devido à presença de um pequeno número de células tumorais resistentes e com características de células tronco, cuja resistência às drogas já está presente nessas células, induzindo a recidiva do tumor após um tratamento (ZATTONI et al., 2022). Outros fatores que podem influenciar a resistência intrínseca são mutações genéticas, microambiente tumoral e a própria natureza das células tumorais (MOHAMMAD, HE e YIN, 2018). Já a resistência adquirida, muitas vezes ocorre após um tratamento antineoplásico que induz alterações nas células. Dentre as alterações, encontram-se as mudanças no mecanismo de reparo de dano celular, aumento do reparo do DNA, alterações no mecanismo de apoptose e autofagia, mecanismos epigenéticos como aumento ou redução da expressão das enzimas do metabolismo, mutações e alterações nas enzimas envolvidas nos processos de biotransformações das drogas, alterações no microambiente tumoral, aumento da expressão ou aumento da atividade das bombas de efluxo de drogas, alteração nos mecanismos de captação das drogas, os quais resultam em uma redução nas concentrações intracelulares dos agentes antineoplásicos (WEEN et al., 2015; VRANA et al., 2018; YASUI et al., 2004).

Um dos mecanismos para analisar a resistência de células cancerosas à agentes antineoplásicos se dá através da seleção de células cancerosas que sobrevivem a um meio contendo drogas citotóxicas e, posteriormente, analisando as alterações dessas células por técnicas de biologia celular e molecular. Esses estudos mostram que os principais mecanismos de resistência a drogas nas células são: redução na absorção de drogas hidrossolúveis que necessitam de transportadores (observado com antifolatos, análogos dos nucleosídeos e cisplatina), mudanças celulares que alteram a capacidade dos agentes citotóxicos de induzir a morte das células (como por exemplo, alterações no ciclo celular, aumento no reparo do DNA, redução na apoptose, alteração no metabolismo das drogas) e aumento do efluxo dependente de energia de drogas hidrofóbicas que entram nas células por difusão passiva (SZAKACS et al., 2006).

FIGURA 2: Vias e mecanismos de resistência às drogas.



FONTE: adaptada de VRANA et al., 2018

Dentre os mecanismos descritos na literatura, a modificação na absorção dos agentes antineoplásicos pelas células é um dos mecanismos responsáveis pela resistência a drogas, especialmente dos antifolatos, como metotrexato (LONGLEY e JOHNSTON, 2005). Apesar de os mecanismos de absorção de agentes antineoplásicos pelas células não serem bem elucidados, observa-se que a absorção de metotrexato é dependente de transportadores de folato e a alteração na expressão desses receptores tem um papel importante na resposta e nos mecanismos de resistência a esses agentes (LONGLEY e JOHNSTON, 2005).

Além da alteração da absorção das drogas pelas células, a inativação enzimática também se apresenta como mecanismo de resistência, diminuindo a concentração de drogas no meio intracelular disponível para atingir seu alvo terapêutico. A inativação das

drogas por enzimas se dá através do aumento da expressão de enzimas responsáveis por converter os agentes antineoplásicos em seus metabólitos inativos, como ocorre com a fluoruracila e a enzima dihidropirimidina-desidrogenase (DPYD). Outro mecanismo, é a formação de complexo com a forma reduzida de glutatona (GSH), o qual é catalizado pela enzima glutatona S-transferase (GST) e facilita o efluxo de drogas pelas células, diminuindo a concentração intracelular e induzindo a resistência. Um terceiro mecanismo que envolve a metabolização das drogas, é a redução das enzimas que transformas as drogas em seus metabólitos ativos, como ocorre com o irinotecano. Uma vez que há uma redução na metabolização do irinotecano em seu metabólito ativo, SN-38, há uma diminuição na quantidade de metabólito ativo dentro das células, o que também induz a uma menor resposta ao agente antineoplásico (LONGLEY e JOHNSTON, 2005).

A alteração dos mecanismos epigenéticos, como por exemplo, a redução na expressão de enzimas ou receptores que geralmente são inibidos pelas drogas, também são descritos como mecanismos de resistência. Um exemplo desse mecanismo de resistência é o aumento da expressão da enzima timidilato sintase (TS), alvo da droga fluoruracila (5-FU). Por se tratar de uma inibição competitiva entre droga e substrato pelo sítio ativo da enzima, um aumento na expressão da TS faz com que essa enzima se torne resistente a droga – há mais enzima disponível e a droga não é suficiente para inibir. Outro exemplo, é a alteração da atividade das enzimas topoisomerase I (alvo do irinotecano e seu metabólito ativo, SN-38) e topoisomerase II (alvo das antraciclinas e epipodofilotoxinas) (LONGLEY e JOHNSTON, 2005). Alterações nos níveis de expressão da proteína topoisomerase, diferenças nas distribuições das isoformas da topoisomeras II (isoformas 170-kDa e 180-kDa), e alterações pós-traducionais (como fosforilação das enzimas) são alguns dos mecanismos envolvidos na resistência aos antineoplásicos (GANAPATHI e GANAPATHI, 2013). Alcalóides da vinca (vincristina, vimblastina) e taxóis (paclitaxel, docetaxel) são agentes que agem na polimerização e despolimerização dos microtúbulos, cujo papel é essencial para a divisão das células durante a mitose. Alteração nos níveis de expressão das isoformas das tubulinas (que compõem os microtúbulos) e diminuição nos níveis intracelulares das tubulinas totais também são mecanismos de resistência identificados nas células neoplásicas expostas aos alcaloides da vinca e taxóis (LONGLEY e JOHNSTON, 2005).

Considerando que a grande maioria dos agentes antineoplásicos atuam causando danos no DNA e induzindo a célula à apoptose, observa-se também uma alteração nos mecanismos de reparo celular, fazendo com que as células sejam mais facilmente reparadas por proteínas intracelulares e consigam escapar da apoptose. A proteína p53 é uma das proteínas responsáveis pelo reparo dos danos celulares, induzindo a célula a um reparo ou a morte celular. Mutações no gene que codifica a proteína p53 resulta em alterações na atividade da mesma, consequentemente, interferindo na ação de agentes antineoplásicos, como doxorrubicina e cisplatina, influenciando a sensibilidade das células a esses agentes. Outras enzimas envolvidas nos processos de reparo dos danos celulares também podem sofrer alterações em suas expressões e influenciar a resposta aos agentes quimioterápicos. Além disso, enzimas que participam da cascata de sinalização intracelular que induz a proliferação celular, assim como as proteínas de membrana que desencadeiam essa cascata de sinalização, podem apresentar mutações que as tornam constitutivamente ativas, induzindo a proliferação descontrolada das células e reduzindo a resposta dessas células a agentes antineoplásicos (LONGLEY e JOHNSTON, 2005).

Outro mecanismo de resistência, sendo esse um dos mais conhecidos e estudado, é o aumento do efluxo das drogas pela superexpressão de genes que codificam transportadores da família ABC (*ATP-binding cassette transporters*) (WEEN et al., 2015; GILLET et al., 2004; SZAKACS et al., 2004; GOTTESMAN, FOJO e BATES, 2002). O mecanismo de multirresistência às drogas induzido por transportadores ABC é complexo, podendo estar associado à inúmeras vias de sinalização e controlado por inúmeras proteínas, incluindo proteínas proto-oncogênicas e proteínas supressoras de tumor (VRANA et al., 2018). A expressão dos genes dos transportadores ABC está relacionada a resistência à agentes antineoplásicos por dificultar a infiltração das drogas nas células (KARATAS et al., 2016) e por reduzir o acúmulo intracelular das drogas, especialmente em células com uma expressão elevada dos genes ABC (SZAKACS et al., 2004). Em tumores de ovário, a presença de 20 transportadores ABC está associada a uma redução nos níveis intracelulares de agentes antineoplásicos e estudos mostram que essa expressão dos transportadores aumenta após a exposição a agentes antineoplásicos (WEEN et al., 2015).

2.4 TRANSPORTADORES ABC

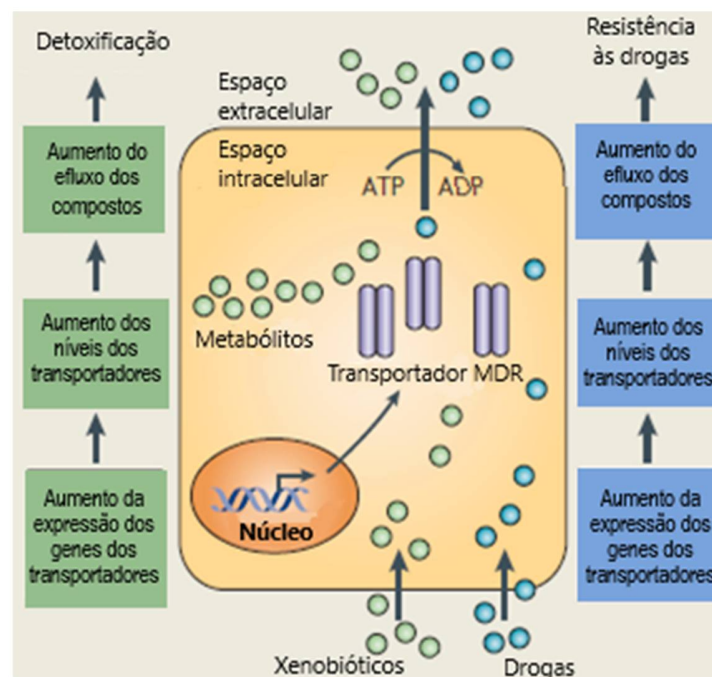
Os transportadores de efluxo ABC (*ATP-binding cassette transporters*) são transportadores dependentes de energia (SZAKACS et al., 2006) e pertencem à uma extensa família de proteínas de membrana, codificadas por 48 genes e um pseudogene (KARATAS et al., 2016; PARK et al., 2006; GILLET et al., 2006; GOTTESMAN, FOJO e BATES, 2002). Esse pseudogene codifica a proteína ABCC13, sendo essa uma proteína não funcional e por isso, muitas vezes, não mencionada como parte da família ABC (SZAKACS et al., 2004). Sendo assim, no genoma humano, apenas 48 genes codificam proteínas ABC funcionais e nem todas possuem função de transportador (XIAO et al., 2020).

A família ABC pode ser dividida em 7 subgrupos, ou subfamílias, nomeadas ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF e ABCG (PARK et al., 2006). A classificação dos transportadores nas respectivas subfamílias é com base na sequência de aminoácidos, principalmente no domínio citoplasmático que se liga ao ATP (KARATAS, et al., 2016). Os transportadores ABC podem ser encontrados em bactérias, plantas, fungos, insetos, peixes e mamíferos, incluindo os seres humanos (TARLING e EDWARDS, 2011). Allikmets, em 1996, relata que praticamente todos os cromossomos humanos carregam algum gene que codifica um transportador ABC (ALLIKMETS et al., 1996). Aumento no número de cópias dos genes que codificam transportadores ABC pode resultar no desenvolvimento de resistência a drogas e, consequentemente, células multirresistentes (YASUI et al., 2004).

Os transportadores ABC estão envolvidos em diversos processos fisiológicos nas células, conforme demonstrado na figura 3. Dentre os papéis fisiológicos, encontram-se o transporte de inúmeras substâncias endógenas, incluindo aminoácidos, lipídeos, nucleosídeos, sais biliares, vitaminas, polissacarídeos e toxinas, detoxificação das células e processamento de antígenos (MODI et al., 2022; XIAO et al., 2020; KARATAS et al., 2016). Assim sendo, esses transportadores também são capazes de atuar no efluxo de um grande número de substâncias com diferentes estruturas (GAO et al., 2020). Os transportadores ABC não possuem afinidades idênticas pelos substratos, porém,

genes que codificam essas proteínas estão associadas a um grande número de doenças, incluindo fibrose cística (ABCC7/CFTR), doença de Stargardt (ABCA4/ABCR), síndrome de Zellweger (ABCD3/PMP70), colestase intra-hepática familiar progressiva (PFIC) (ABCB11/SPGP), entre outros (GRAF et al., 2004). Nas células tumorais, a presença de genes dos transportadores ABC está associada com o efluxo de agentes antineoplásicos, o que causa uma redução na concentração intracelular e uma redução na toxicidade causada por esses agentes e, conseqüentemente, induzindo a resistência (ZHANG, YOU e ZHU, 2017), conforme mostra a figura 4. Além do papel no efluxo de drogas e desenvolvimento de MDR, os transportadores ABC parecem apresentar envolvimento no processo de carcinogênese, atuando no transporte ativo de substratos endógenos importantes para o desenvolvimento dos tumores (KARATAS et al., 2016), influenciando a susceptibilidade individual, a iniciação, promoção e progressão do tumor, a resposta do sistema imune e a sensibilidade das células tumorais aos agentes antineoplásicos (MOHELNIKOVA-DUCHONOVA et al., 2013).

FIGURA 4: O mecanismo pelo qual os transportadores ABC participam da proteção das células através do efluxo de xenobióticos e drogas.



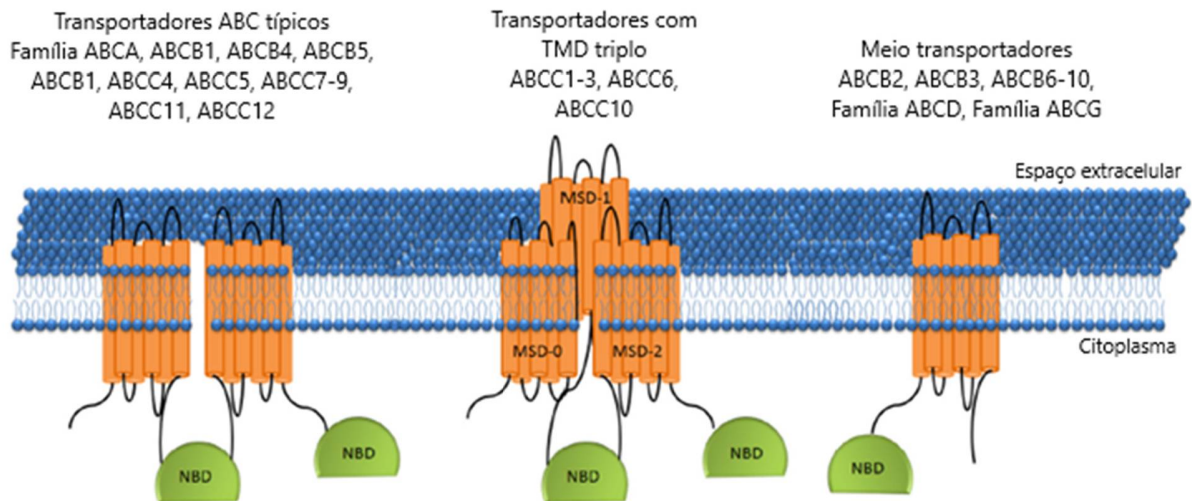
FONTE: adaptado de FLETCHER et al., 2010

Em relação a estrutura, alguns dos transportadores ABC já possuem sua estrutura determinada. Os transportadores ABC podem ser classificados como transportadores completos ou meio-transportadores (figura 5), sendo que os transportadores completos compõem a maior parte dos transportadores da família ABC. Transportadores completos são aqueles que apresentam dois domínios hidrofílicos de ligação a nucleotídeos (*nucleotide binding domains* – NBD) com motivos de sequência conservados, denominados motivos “Walker A” e “Walker B”, separados por uma sequência de 90 a 120 aminoácidos, e dois domínios transmembranas hidrofóbicos (*transmembrane domains* – TMD) (BARBET et al., 2012; GOTTESMAN, FOJO e BATES, 2002). Alguns transportadores da subfamília ABCC possuem um terceiro domínio transmembrana (domínio amino-terminal extra) sem função definida. A presença desse terceiro domínio transmembrana faz com que os mesmos possuam 17 segmentos transmembranas ao invés de 12 segmentos transmembranas observados nos demais transportadores completos, conforme observado na figura 5 (XIAO et al., 2020; OGURI et al., 2007; HOPPER-BORGE et al., 2004; DEELEY, WESTLAKE e COLE, 2006). Por outro lado, os meio-transportadores são aqueles que apresentam apenas um NBD e um TMD (KAMINSKI et al., 2001; ALLIKMETS et al., 1996). Os meio-transportadores necessitam dimerização entre dois monômeros (proteínas) para que possam ter funcionalidade. Essa dimerização pode ser homodimerização, onde os dois monômeros são idênticos, ou heterodimerização, com dois monômeros não idênticos (GRAF et al., 2004; ZHAO et al., 2000).

Os NBDs também são conhecidos como domínios de ligação a adenosina trifosfato (ATP), sendo responsável pela hidrólise da ATP e, portanto, responsável por fornecer energia para o transporte através da membrana (HENDIG et al., 2009; KAMINSKI et al., 2001). Além disso, a classificação dos domínios de ligação a nucleotídeos é baseada na presença de 3 motivos de sequência: Walker A e Walker B, os quais são estruturas altamente conservadas em todas as proteínas ABC presentes em eucariotos, e Walker C, encontrado próximo ao Walker B (HENDIG et al., 2009). A presença de um espaço conservado entre Walker A e B e a presença do Walker C, são características típicas dos transportadores ABC, diferenciando-os de outras proteínas que se ligam e hidrolisam o ATP (ALLIKMETS et al., 1996). Já o domínio transmembrana

é responsável por garantir a especificidade entre transportador e substratos (KAMINSKI et al., 2001).

FIGURA 5: Topologia dos transportadores ABC



FONTE: adaptado de WEEN, ARMSTRONG, OEHLER e RICCIARDELLI, 2015.

LEGENDA: A – Transportador completo; B – transportador completo com um domínio transmembrana extra; C – Meio transportador.

Os transportadores ABC podem ser encontrados em diversas localizações dentro das células, como membrana plasmática, membrana mitocondrial, retículo endoplasmático, peroxissomos e membrana nuclear (SEBOROVA et al., 2019), podendo estar presente em todos os tipos celulares ou serem expressos somente em determinados tipos de células (SZAKACS et al., 2004). Estudos mostram que tecidos envolvidos na secreção de substâncias (como, por exemplo, as glândulas adrenais), tecidos do sistema reprodutor, tecidos com função de barreira (pulmão, intestino) e tecidos envolvidos em atividades metabólicas (fígado, rim) são os tecidos que geralmente tem uma grande expressão dos genes *ABC* (LANGMANN et al., 2003). Os transportadores ABC ainda podem ser encontrados expressos no sistema nervoso central, estômago, intestino e pâncreas (MOHAMMAD, HE e YIN, 2018). Em relação aos tumores, os níveis de expressão dos transportadores ABC também parecem influenciar

os diferentes parâmetros de análise de desfecho clínico do paciente, incluindo a sobrevida do paciente e a progressão do tumor (KARATAS et al., 2016).

A literatura relata que das 48 proteínas ABC em humanos, 20 são capazes de transportar agentes antineoplásicos, sendo eles o ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA8, ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCB8, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC10, ABCC11, ABCE1, ABCG1 e ABCG2 (WEEN et al., 2015; HLAVATA, et al., 2012). Dentre os transportadores ABC, ABCB1, também conhecido como MDR-1 ou P-gp (codificado pelo gene *ABCB1*), ABCC1 ou MRP1 (gene *ABCC1*) e ABCG2 ou BCRP (gene *ABCG2*) são os mais conhecidos (XIAO et al., 2020). Esses transportadores são conhecidos pelo efluxo ativo de drogas do interior das células tumorais, conferindo resistência as mesmas, além de reconhecer e remover, através de um transporte dependente de energia, substâncias tóxicas para as células (SZAKACS et al., 2004). Dentre os medicamentos conhecidos como substratos desses transportadores estão o paclitaxel, inibidores da topoisomerase, antraciclinas e inibidores da tirosina quinase (PARK et al., 2006).

As diferentes variantes dos transportadores ABC também podem influenciar a farmacocinética dos medicamentos – absorção, distribuição e excreção (SZAKACS et al., 2004), alterando sua resposta, sua taxa de depuração e até mesmo sua toxicidade (XIAO et al., 2020), podendo resultar em alterações nos efeitos adversos das drogas (SONE et al., 2019). Estudos mostram que polimorfismos em *ABCB1* influenciam a farmacocinética do imatinibe, alterando sua resposta e toxicidade (*ABC1* 1236C>T, 2677G>T/A e 3435C>T) (DULUCQ et al., 2008), depuração de metotrexato (*ABCB1* 3435 C>T) (KIM et al., 2012), respostas da doxorrubicina, vincristina e prednisolona (*ABCB1* 1199G>A) (GREGERS et al., 2015). Polimorfismos no gene *ABCG2* estão associados com toxicidade pelo gefitinibe (*ABCG2* 15622C>T) (LE MOS et al., 2011) e alteração das respostas das antraciclinas (*ABCG2* 34G>A/G, rs2231137(G34A)) (HAMPRAS et al., 2010) e inibidores de tirosina quinase (TKI) (*ABCG2* 34G>A, *ABCG2* 1143C>T e *ABCG2* 421C>A) (TANDIA et al., 2017), enquanto variantes de *ABCC1* influenciam a toxicidade hematológica causada por fluoruracila, epirrubicina e ciclofosfamida (*ABCC1* 108 G>T, rs4148350g.16170477G>T N/A; *ABCC1* 113 G>T, rs45511401 c.2012G>T Val671Gly; *ABCC1* 444 T>C, rs246221 c.825T>C Val275Val) (VULSTEKE, et al., 2013).

Além da presença dos genes que codificam para os transportadores ABC nos tecidos tumorais, alterações no próprio transportador podem influenciar os mecanismos de resistência às drogas. Estudos mostram que a variabilidade de resposta de cada indivíduo à quimioterapia é influenciada pela variabilidade genética, epigenética e pós-transcricionais dos transportadores ABC, incluindo polimorfismos genéticos (polimorfismo de nucleotídeo único – SNPs) (não necessariamente na região codificadora), mudanças estruturais, alterações no número de cromossomos, translocações nos cromossomos, metilação do DNA e acetilação ou deacetilação de histonas (que altera expressão gênica), recombinação somática, reorganização da cromatina e hipometilação dos promotores da codificação dos genes *ABC*, regulações pós-transcricionais através de miRNAs, estabilização pós-traducional das proteínas transportadoras, entre outros (XIAO et al., 2020; VRANA et al., 2018). Observa-se que a expressão de transportadores ABC geralmente está aumentada em pacientes que apresentam resistência a quimioterapia e, futuramente, pode servir como biomarcador para a escolha de uma terapia mais adequada (VRANA et al., 2018).

O processo de resistência à múltiplas drogas geralmente envolve a expressão de inúmeros transportadores ABC, não podendo ser restrita a somente um transportador. Um tecido pode ter expresso na membrana de suas células diversos transportadores e todos eles podem estar, de algum modo, envolvidos com o desenvolvimento de resistência à quimioterapia. Por isso, a expressão de inúmeros transportadores em um mesmo tecido pode dificultar a determinação do papel de um transportador específico no mecanismo de resistência às drogas. Além disso, observa-se que a supressão da expressão de um transportador pode ser compensada pela expressão de outro transportador, como observado em células de leucemia linfocítica aguda (LLA). Nesse tipo de neoplasia hematológica, a supressão da expressão do gene *ABCA2* é compensada pela expressão do gene *ABCA3* e vice-versa (LITMAN et al., 2000; TSYGANOV et al., 2017; RAO et al., 2005; KNUTSEN et al., 2000; KLEFFEL et al., 2016; EFFERTH et al., 2006).

O desenvolvimento de drogas que inibem os transportadores ABC tem surgido como uma alternativa para reverter o processo de resistência mediado por esses transportadores. No entanto, inibidores de primeira geração, como ciclosporina, tem

apresentado uma toxicidade inaceitável, enquanto inibidores de segunda geração, como vaslapodar, tem apresentado interações farmacocinéticas imprevisíveis, além de inibirem outros transportadores e proteínas não pertencentes a família ABC. Inibidores de terceira geração, como tariquidar e zosuquidar, apresentam maior potência e especificidade para o transportador ABCB1 ou glicoproteína P (P-gp), porém, ainda estão em fase de testes clínicos (LONGLEY e JOHNSTON, 2005).

Apesar dos transportadores ABCB1, ABCC1 e ABCG2 serem os mais conhecidos e descritos na literatura e serem os principais transportadores associados à MDR, estudos têm mostrado que outros transportadores ABC também podem influenciar a absorção, distribuição e excreção de agentes antineoplásicos e, conseqüentemente, alterar a resposta à quimioterapia (PARK et al., 2006). Atribui-se esse papel de resistência à quimioterapia aos outros transportadores ABC devido sua similaridade estrutural e similaridade de sequência (PARK et al., 2006). Para esse trabalho, foram selecionadas 20 proteínas ABC com base na revisão de literatura realizada pelo Laboratório de Cancer and Drug Resistance (LCDR), onde os critérios para seleção dos transportadores foram: genes da família ABC que codificam para proteínas da família ABC e que possuem dois ou mais artigos em literatura sobre ensaios *in vitro* relacionados à superexpressão e resistência aos agentes antineoplásicos; dois ou mais estudos sobre superexpressão do gene em tecidos tumorais e dois ou mais estudos que contendo os agentes antineoplásicos como substrato ou associado à resistência por expressão desses genes. Na tabela 1, características principais de cada subfamília das proteínas ABC clinicamente relevantes na MDR em câncer serão abordadas. A única subfamília não presente é a ABCD, uma vez que muito pouco é conhecido sobre os transportadores ABCD em câncer (HLAVAC et al., 2013) e nenhum quimioterápico é reconhecido como substrato (WEEN et al., 2015).

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS E LOCALIZAÇÕES DAS PROTEÍNAS ABC

Proteína	Tipo de transportador ¹	Cromossomo ²	Massa (Da) ³	Nº de aa ^{*3}	Localização celular ^{2, 3}	Tecidos ^{2, 3, 4}
ABCA1	Transportador Completo	9q31.1	254.302	2.261	Membrana endossomos, membrana plasmática	Placentas, adrenal, bexiga
ABCA2	Transportador Completo	9q34.3	269.833	2435	Membrana lisossomos, membrana endossomos	Cérebro, tireóide, baço, fígado, rim
ABCA3	Transportador Completo	16p13.3	191.362	1704	Membrana plasmática	Pulmão, cérebro, tireóide, testículos, pâncreas, músculo esquelético
ABCA7	Transportador Completo	19p13.3	234.350	2146	Membrana plasmática, endossomos, complexo de Golgi, citoplasma	Baço, medula óssea, cérebro, linfonodos, pele, pulmão
ABCB1	Transportador Completo	7q21.12	141.479	1280	Membrana plasmática	Adrenal, fígado, intestino
ABCB2	Meio transportador	6p21.32	80.965	748	Membrana retículo endoplasmático	Baço, apêndice, linfonodos, cólon, intestino delgado, pele
ABCB4	Transportador Completo	7q21.12	141.523	1286	Membrana plasmática, citoplasma	Fígado, adrenal, baço, linfonodos
ABCB5	Transportador Completo	7p21.1	138.641	1257	Membrana plasmática	Vesículas, tecido adiposo, cólon, bexiga endométrio
ABCB6	Meio Transportador	2q35	93.886	842	Membrana plasmática, endossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi	Retina, testículos, ovário, próstata, cérebro
ABCC1	Transportador Completo	16p13.11	171.591	1531	Membrana plasmática	Pulmão, testículos, esôfago, tireóide, baço, próstata, bexiga
ABCC2	Transportador Completo	10q24.2	174.207	1545	Membrana plasmática	Fígado, rim, intestino, vesícula, duodeno
ABCC3	Transportador Completo	17q21.33	169.343	1527	Membrana plasmática	Fígado, intestino delgado, cólon, próstata, testículo, cérebro, rim, adrenal, estômago, vesícula, bexiga

ABCC4	Transportador Completo	13q32.1	149.527	1325	Membrana plasmática	Próstata, fígado, bexiga, rim, tireóide, testículo
ABCC5	Transportador Completo	3q27.1	160.660	1437	Membrana plasmática, endossomos, complexo de Golgi	Estômago, baço, cérebro, endométrio, esôfago, pele, próstata, bexiga
ABCC10	Transportador Completo	6p21.1	161.629	1492	Membrana plasmática	Baço, ovário, medula óssea, placenta, endométrio, pulmão, linfonodos, próstata, testículos, pele.
ABCC11	Transportador Completo	16q12.1	154.301	1382	Membrana plasmática	Mama, testículos, próstata, fígado, cérebro
ABCE1	Não é transportador	4q31.21	67.314	599	Citoplasma, mitocôndria	Linfonodos, esôfago, testículos, tireóide, bexiga, vesícula, cérebro
ABCF2	Não é transportador	7q36.1	71.290	623	Membrana plasmática	Testículo, cérebro, apêndice, linfonodos, esôfago, tireóide, coração, endométrio
ABCG1	Meio transportador	21q22.3	75.592	678	Membrana plasmática, complexo de Golgi, retículo endoplasmático	Baço, adrenal, pulmão, cérebro, cólon, intestino
ABCG2	Meio transportador	4q22.1	72.314	655	Membrana plasmática, mitocôndrias	Placenta, intestino delgado, fígado, cólon, cérebro, endométrio

FONTES: ¹ WEEN et al.; 2015; ²NCBI – 2020; ³UNIPROT, 2022 (Disponível em: <https://www.uniprot.org/>).

⁴ Modi et. al. 2022.

LEGENDA: *aa = aminoácidos

2.4.1 Subfamília ABCA

A subfamília ABCA é composta por 12 transportadores, sendo eles ABCA1-ABCA10, ABCA12 e ABCA13 (HLAVATA et al., 2012), todos transportadores completos (ANILLO et al., 2002).

Os transportadores ABCA, em sua grande maioria, são encontrados na membrana plasmática e estão envolvidos no transporte de lipídeos (incluindo o colesterol). Mutações nos genes de 7 dos 12 transportadores da subfamília ABCA resultam no desenvolvimento de doenças genéticas (BARBET et al., 2012). Já em relação a resistência aos agentes antineoplásicos em células tumorais, *ABCA1*, *ABCA2*, *ABCA3* e *ABCA7* são os genes capazes de codificar os transportadores envolvidos na resistência.

A proteína ABCA1, também conhecida como ABC1, é codificada pelo gene *ABCA1*, localizado no cromossomo 9q31.1 (LANGMANN et al., 2003; NCBI, 2020). Em células normais, o transportador ABCA1 está envolvido na manutenção do colesterol intracelular, no metabolismo de lipoproteína de alta densidade (através da combinação de fosfolipídeos e colesterol com a proteína ApoA1) e no transporte de fosfolipídeos (HEDDTICH et al., 2014; OISO et al., 2014). Devido ao seu papel no transporte e metabolismo de lipídeos, a expressão de *ABCA1* pelas células pode influenciar a morfologia e mobilidade das membranas celulares, uma vez que esses aspectos são dependentes da quantidade de colesterol e lipídeos que compõem essas membranas, influenciar o crescimento das células e sua divisão e também agir sobre a sinalização entre células (HEDDTICH et al., 2014). Mutações no gene *ABCA1* estão associados com síndromes severas, como doença de Tangier e hipoalfalipoproteinemia familiar (WANG e ORAM, 2007; ANILLO et al., 2002).

Dentre os tumores que expressam *ABCA1* estão tumor epitelial de ovário, tumor de próstata, carcinoma epidermóide, câncer de pulmão, câncer de mama, tumor hepatocelular e mesoteliomas (HEDDTICH et al., 2014; LEE et al., 2013; OISO et al., 2014, PROCHAZKA et al., 2013). Em tumores de ovário, a expressão de *ABCA1* está associada com um fenótipo mais agressivo, apresentando menor sobrevida livre de progressão, sobrevida global e pior prognóstico (HEDDTICH et al., 2014). Já nos tumores de próstata, os transportadores ABCA1 também estão envolvidos na regulação intracelular de colesterol das células neoplásicas, sendo que o acúmulo de colesterol nessas células tem sido associado a um fenótipo mais agressivo e também com a progressão da doença (LEE et al., 2013). No carcinoma de células epidermóides, *ABCA1* pode conferir resistência à cisplatina, enquanto nos tumores de mama, a expressão de

ABCA1 está associada com uma baixa resposta à quimioterapia neoadjuvante (OISO et al., 2014; PROCHAZKA et al., 2013).

Um segundo transportador da subfamília ABCA envolvido no processo de multirresistência a drogas é o ABCA2, também conhecido como ABC2 (LANGMANN et al., 2003). O transportador ABCA2 também está envolvido no processo de controle do colesterol, sendo expresso em células e tecidos que necessitam de altos níveis de colesterol ou hormônios esteroidais, como sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, neurônios, próstata, ovário, útero e macrófagos (MACK et al., 2007). Os transportadores também são expressos no cérebro, rim e coração (SZAKACS et al., 2004, KAMINSKI et al., 2001). A proteína ABCA2 é composta por cerca de 2435 aminoácidos, com peso molecular de 270 kDa, sendo codificado pelo gene *ABCA2* localizado no cromossomo 9q34.3 (MACK et al., 2007; BOONSTRA et al., 2004, NCBI, 2020; KAMINSKI et al., 2001).

Em relação as células tumorais, *ABCA2* pode ser encontrado em células de leucemia linfoblástica e câncer de pulmão de pequenas células (EFFERTH et al., 2006; RAHGOZAR et al., 2014; BOONSTRA et al., 2004). Nas células leucêmicas, a presença dos transportadores ABCA2 podem causar resistência a metotrexato, vimblastina e doxorubicina, agentes antineoplásicos muito utilizados no tratamento das leucemias (EFFERTH et al., 2006; RAHGOZAR et al., 2014). Estudos também mostram que expressão de *ABCA2* pode estar relacionada com resistência a mitotano, tamoxifeno, daunorrubicina, estramustina, mitoxantrona, entre outras (LAING et al., 1998; EFFERTH et al., 2006).

O transportador ABCA3, ou ABC3, é codificado pelo gene *ABCA3*, localizado no cromossomo 16p13.3, resultando em uma proteína com cerca de 1704 aminoácidos (LANGMANN et al., 2003; ANILLO et al., 2002; NCBI, 2020). ABCA3 geralmente é encontrada em membranas intracelulares, entre elas os lisossomos e corpos multivessiculares, e é altamente expresso em células pulmonares (STEINBACH et al., 2006; EFFERTH et al., 2006; OISO et al., 2014; STAHLMAN et al., 2007). Assim como outros transportadores ABCA, ABCA3 está envolvido no transporte de lipídeos. Devido sua grande expressão em células pulmonares, especialmente nas epiteliais, *ABCA3* tem sido associado com o metabolismo de surfactantes pulmonares e com o desenvolvimento

de corpos lamelares (BAN et al., 2007; STAHLMAN et al., 2007). A mutação nos genes *ABCA3* tem sido relacionada com doenças respiratórias letais, especialmente em recém-nascidos (STAHLMAN et al., 2007).

ABCA3 pode ser encontrado expresso em leucemias, linfomas, neuroblastoma, câncer de mama, carcinoma epidermóide e tumor de pulmão (CHAPUY et al., 2008). Nas células leucêmicas, a expressão de *ABCA3* está relacionada com a resistência a metotrexato, antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, mitoxantrona), alcalóides da vinca (vimblastina), imatinibe, lomustina (OVERBECK et al., 2013; EFFERTH et al., 2006; STEINBACH et al., 2006; CHAPUY et al., 2009). Além disso, a presença de transportadores ABC nas células de leucemia aguda (tanto mielóide quando linfocítica) parece influenciar no prognóstico da doença, conferindo pior prognóstico (CHAPUY et al., 2008; RAHGOZAR et al., 2014). No carcinoma epidermóide, a expressão de *ABCA3* está envolvida com a resistência a cisplatina (OISO et al., 2014), enquanto nas células de tumores de pulmão, a presença de *ABCA3* também parece influenciar a resistência a cisplatina e paclitaxel (OVERBECK et al., 2013).

Outro membro da subfamília ABCA que parece estar relacionado com o mecanismo de multirresistência é o transportador *ABCA7*, composto por 2146 aminoácidos e codificado pelo gene *ABCA7*, localizado no cromossomo 19p13.3 (ANILLO et al., 2002; NCBI, 2020; BROCCARDO, et al., 2001). *ABCA7* também é um transportador completo e, em tecidos normais, pode ser encontrado expresso no baço, timo e traqueia (BROCCARDO et al., 2001; LANGMANN et al., 2003). Assim como o transportador *ABCA3*, a expressão de *ABCA7* em carcinomas epidermóides parece conferir resistência à cisplatina (OISO et al., 2014). No câncer colorretal, a presença de *ABCA7* está associado a um maior risco de progressão de doença e pior desfecho clínico (LIU et al., 2018). *ABCA7* também pode ser encontrado superexpresso em tumores de ovário, sendo observado uma expressão ainda maior nas metástases e conferindo também um pior prognóstico para esse tipo de tumor (LIU et al., 2018).

2.4.2 Subfamília ABCB

A subfamília ABCB é uma das mais conhecidas devido à presença de um dos transportadores mais conhecidos e caracterizados no mecanismo de resistência – o transportador ABCB1, também chamado de glicoproteína P (HANKE et al., 2018). A subfamília ABCB também é conhecida como TAP ou MDR e é composta por 11 transportadores (FRANK et al., 2005; CHEN et al., 2005). Cinco dos onze transportadores são classificados como meio transportador, sendo eles ABCB2 (KOCH et al., 2004), ABCB3 (KOCH et al., 2004), ABCB8 (ELLIOT e AL-HAJJ, 2009), ABCB9 e ABCB10 (ELLIOT e AL-HAJJ, 2009); os demais transportadores são classificados como transportadores completos.

O mais conhecido e um dos principais transportadores envolvidos no fenômeno de multirresistência, o transportador ABCB1, também conhecido como MDR-1 (*multidrug resistance 1 protein*) ou P-gp, foi descrito pela primeira vez em 1976, onde foi detectado superexpresso em células de ovário de camundongos chineses que apresentavam resistência a droga colchicina. O nome de “glicoproteína P” se deu pelo fato de as células apresentarem uma alteração na permeabilidade às drogas devido à presença dessa glicoproteína (JULIANO e LING, 1976; DALTON et al., 1986; LEVATIC et al., 2013; KARATAS et al., 2016). A P-gp é composta por 1280 aminoácidos, com uma massa 142 kDa, codificada pelo gene *ABCB1* ou *MDR-1*, localizado no cromossomo 7q21.12, sendo um transportador completo por possuir dois domínios transmembrana e dois NBDs e ativa na sua forma glicosilada na membrana (NCBI, 2020; PRAJATI, e SANGAMWAR, 2014; ZHANG, YOU e ZHU, 2017; SHIRAKI et al., 2002). Dentre os transportadores ABC, o transportador ABCB1 foi o primeiro a possuir sua estrutura tridimensional determinada. Os dois domínios transmembrana formam uma cavidade hidrofóbica, no qual se ligam uma grande variedade de substratos (PRAJAPATI e SANGAMWAR, 2014). Os substratos do transportador ABCB1 variam de íons a carboidratos e macromoléculas, sendo que muitos dos compostos transportados por ABCB1 não possuem relação química ou estrutural (LAWLOR et al., 2014; LEVATIC et al., 2013). Apesar de transportar um grande número de substâncias que não possuem relação química ou estrutural entre si, observou-se que pode ocorrer uma resistência cruzada entre agentes que possuem estrutura semelhante com compostos que são substratos do ABCB1 (HANKE et al., 2018; SHIRAKI et al., 2002).

O transportador ABCB1 é classificado como “onipresente”, uma vez que pode ser encontrado em inúmeros tecidos e células, sendo localizado principalmente na membrana plasmática, citoplasma, mitocôndrias e retículo endoplasmático de diversos tecidos, entre eles glândulas adrenais, rins, epitélio do cólon, útero, pulmão (COLE et al., 1992; ZUTZ et al., 2009; NCBI, 2020). Além disso, ABCB1 pode ser encontrado em importantes tecidos de proteção, como barreira hemato-placentária, barreira hemato-testicular e barreira hematoencefálica, onde encontra-se principalmente na membrana apical das células, desempenhando um papel importante na proteção das mesmas, participando na absorção e no efluxo de substratos e na eliminação de compostos danosos ou tóxicos (CHEN et al., 2005; KORT et al., 2015; LEVATIC et al., 2013). Nos tecidos tumorais, *ABCB1* pode ser encontrado superexpresso em carcinoma de ovário, tumores renais, tumores de mama, osteossarcoma, câncer de pulmão, carcinoma de células de Merkel, câncer de cólon e leucemias (ESKILLER et al., 2020; GAO et al., 2020; ROUNDHILL, JABRI e BURCHILL, 2019; HANKE et al., 2018; KLEFFEL et al., 2016; EFFERTH et al., 2006; MCDEVITT et al., 2006; SZAKACS et al., 2004; DALTON et al., 1986)

Nos tumores de ovário, a superexpressão de *ABCB1* está relacionada com a resistência a vincristina, doxorrubicina e paclitaxel, sendo que os tumores de ovário resistentes a paclitaxel e que superexpressam *ABCB1* também estão relacionados a um pior prognóstico, com piores respostas ao tratamento e desfecho clínico (JANUCHOWSKI et al., 2013; SEBOROVA et al., 2019). Tumores de mama triplo negativo que apresentam um aumento na expressão da P-gp parecem apresentar resistência aos inibidores enzima poli ADP-ribose polimerase (PARP), especialmente o olaparibe (ESKILLER et al., 2020). A superexpressão de *ABCB1* em tumores ósseos (osteossarcoma) induz à resistência as drogas utilizadas na primeira linha de tratamento dessa neoplasia, entre elas a doxorrubicina, vincristina, etoposídeos, cisplatina, actinomicina d (também conhecida como dactinomicina) e metotrexato (ROUNDHILL, JABRI e BURCHILL, 2019). Nas células de adenocarcinoma pulmonar, um aumento na expressão de *P-gp* pode induzir a resistência a agentes inibidores do proteossoma, como por exemplo, o carfilzomibe (HANKE et al., 2018), enquanto nas células de carcinoma de Merckell, a presença desses transportadores está relacionado com resistência à

carboplatina e etoposídeo (KLEFFEL et al., 2016). Drogas utilizadas no tratamento de câncer de cólon, como a oxaliplatina, capecitabina e fluoruracila, podem induzir a superexpressão do gene *ABCB1* nessas células neoplásicas (GAO et al., 2020).

Dentre os agentes antineoplásicos que são classificados como substratos do transportador *ABCB1* estão as antraciclinas (doxorrubicina), os taxanos (paclitaxel), derivados das epipodofilotoxinas (etoposídeo), alcaloides da vinca (vimblastina, vincristina), inibidores da PARP (olaparibe), cisplatina, actinomicina, metotrexato, carboplatina, fluoruracila, carfilzomibe, entre outros (ESKILLER et al., 2020; ROUNDHILL, JABRI e BURCHILL, 2019; ZHANG, YOU e ZHU, 2017; CHRISTIE et al., 2019; LANG et al., 2006; KLEFFEL et al., 2016; GAO et al., 2020; HANKE et al., 2018). Além disso, polimorfismo genéticos no gene *ABCB1* podem resultar em alterações na farmacocinéticas de diversos agentes antineoplásicos, incluindo imatinibe, metotrexato, doxorrubicina e vincristina (XIAO et al., 2020). O transportador *ABCB1* também pode influenciar a farmacodinâmica de outras drogas, além das antineoplásicas, entre elas antirretrovirais, bloqueadores do canal de cálcio, neurolépticos, antiarrítmicos, antifúngicos, entre outros (LANG et al., 2006; PRAJAPATI e SANGAMWAR, 2014).

Um segundo membro da subfamília ABCB que está envolvido no processo de MDR é o *ABCB2*, cujo gene de mesmo nome se localiza no cromossomo 6p21.32. *ABCB2* também é conhecido como TAP1 (transportador associado ao processo de antígeno – *transporter associated with antigen process*) (DE LA SALLE et al., 2002; NCBI, 2020). *ABCB2* ou TAP1 é um meio transportador, o qual dimeriza com o transportador *ABCB3* no retículo endoplasmático para participar do processo de apresentação de antígeno do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do tipo I (KOCH et al., 2004; HEIMERL et al., 2007; SZAKACS et al., 2004). Devido a essa função, a expressão de *ABCB2* e *ABCB3* são coordenadas (SZAKACS et al., 2004). Em tecidos saudáveis, *ABCB2* pode ser encontrado expresso em células do pulmão e baço (LANGMANN et al., 2003). Já em tecidos neoplásicos, *ABCB2* é encontrado superexpresso em adenocarcinoma ductal do pâncreas, carcinoma gástrico e melanoma (XU et al., 2013; BOONSTRA et al., 2004; HEIMERL et al., 2007). Nos tumores gástricos, a expressão de *ABCB2* está relacionado com a resistência a mitoxantrona (BOONSTRA et al., 2004).

A proteína ABCB4 é muito similar ao transportador ABCB1, sendo que a sequência de aminoácidos possui similaridade de 82%. ABCB4 é uma glicoproteína transmembrana que age como um transportador transmembrana e é codificada pelo gene *ABCB4*, também conhecido como *MDR3* ou *MDR2*, localizado no cromossomo 7q21.12 (SMITH et al., 2000; GILLET et al., 2004; NCBI, 2020; DUAN, BRAKORA e SEIDEN, 2004). ABCB4 é encontrada principalmente no fígado, especificamente nas membranas dos hepatócitos do canículo biliar, onde parece ter um papel no transporte de fosfatidilcolina (CHEN et al., 2005; HEIMERL et al., 2007). Diferentemente dos outros transportadores ABC, ABCB4 atua no transporte de fosfatidilcolina através da translocação dessa substância por um movimento conhecido como “flipase” (LANG et al., 2006). Por ser altamente expresso no fígado, mutações no gene *MDR3* resultam em doenças hereditárias, como colestase intra-hepática progressiva (subtipos 2 e 3) e colestase intra-hepática da gravidez (LANG et al., 2006; SMITH et al., 2000). Além disso, a deficiência de expressão do transportador ABCB4 também pode causar sérios danos hepáticos nos humanos, sendo necessário transplante de fígado quando a ausência do transportador é completa (SMITH et al., 2000).

Devido à similaridade de sequência de resíduos de aminoácidos com ABCB1, ABCB4 possui afinidades por substratos que também são transportados por ABCB1, como a digoxina, ivermectina, daunorrubicina, paclitaxel e vimblastina (LANG et al., 2006; DUAN, BRAKORA e SEIDEN, 2004; SMITH et al., 2000). A superexpressão de *ABCB4* em células de câncer de ovário parece causar resistência à vincristina e doxorrubicina (JANUCHOWSKI et al., 2013). Já nas células leucêmicas do tipo B, a presença de *ABCB4* parece influenciar o transporte de daunorrubicina (SMITH et al., 2000).

Assim como ABCB4, ABCB5 também possui alta similaridade estrutural com ABCB1, cerca de 70%. Codificado pelo gene *ABCB5*, localizado no cromossomo 7p.21.1, o transportador ABCB5 parece atuar na manutenção da hiperpolarização das membranas celulares e também no processo de melanogênese (NCBI, 2020; CHEN et al., 2005; FRANK et al., 2005). Nos tecidos saudáveis, *ABCB5* pode ser encontrado expresso no sistema nervosa, testículos, retina, cólon, estômago e glândulas mamárias (FRANK et al., 2005). Nos tumores, *ABCB5* pode estar superexpresso e induzir multiressistência em melanoma, câncer colorretal, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células Merkel

(KLEFEL et al., 2016). Nas células de melanoma, a expressão de *ABCB5* está relacionado com a resistência à doxorrubicina, sendo que o bloqueio de *ABCB5* faz com que haja um aumento nas concentrações intracelulares da droga (HEIMERL et al., 2007; FRANK et al., 2005). Por outro lado, nas células de carcinoma de Merkel, a expressão de *ABCB5* confere resistência aos agentes antineoplásicos utilizados como primeira linha de tratamento, dentre eles a carboplatina e o etoposídeo (KLEFEL et al., 2016). Além disso, o transportador *ABCB5* também é responsável pelo transporte e resistência à mitoxantrona, fluoruracila e camptotecinas (FRANK et al., 2005)

Outro membro da subfamília ABCB, é o transportador *ABCB6*, ou MTABC3, uma proteína de 93 kDa, localizada principalmente na membrana mitocondrial (CHEN et al., 2005; ELLIOT e AL-HAJJ, 2009; HEIMERL et al., 2007). Codificada pelo gene *ABCB6* localizado no cromossomo 2q35, *ABCB6* também pode ser expresso na membrana plasmática das células e participa do processo de homeostase do ferro intracelular, evitando o acúmulo de ferro nas mitocôndrias (HELIAS et al., 2013; CHEN et al., 2005). O transportador *ABCB6* está envolvido no transporte de porfirinas, participando da biossíntese e diferenciação dos eritrócitos (HELIAS et al., 2013; MINAMI et al., 2014; HEIMERL et al., 2007). Mutações no gene que codifica esse transportador nos eritrócitos estão associadas com uma perda anormal de potássio por essas células, podendo resultar na pseudo hipercalemia familiar (ANDOLFO et al., 2012). Além disso, o gene *ABCB6* também está relacionado com a expressão de um antígeno presente nos eritrócitos, que confere um tipo sanguíneo extremamente raro no mundo, conhecido como LAN. O tipo sanguíneo LAN geralmente é identificado quando há alguma investigação sobre incompatibilidade entre mãe e feto (HELIAS et al., 2013).

Em tecidos saudáveis, *ABCB6* encontra-se expresso nos eritrócitos, músculo cardíaco, músculo esquelético, testículos e no olho (CHEN et al., 2005; LANGMANN et al., 2003; WANG et al., 2012). Nos tecidos tumorais, a expressão de *ABCB6* é identificada em células de melanoma, tumor hepatocelular, câncer de mama e câncer de pulmão não pequenas células (HELIAS et al., 2013; HEIMERL et al., 2007; PARK et al., 2006). Nos tumores de mama, observa-se que a expressão de *ABCB6* aumenta após algum tratamento neoadjuvante com agentes como paclitaxel, fluoruracila, epirrubicina e ciclofosfamida, tornando essas células resistentes à quimioterapia (HEIMERL et al.,

2007; MINAMI et al., 2014). A expressão de *ABCB6* também está relacionada com a resistência à fluoruracila, vincristina e campotecina (MINAMI et al., 2014; HELIAS et al., 2013).

2.4.3 Subfamília ABCC

Os transportadores da subfamília ABCC, também denominada subfamília MRP (*multidrug resistance-associated protein* – proteína associada a multirresistência a drogas), estão envolvidos no transporte de uma grande quantidade de ânions e conjugados orgânicos, como sulfatos, fosfatos, glutatona e glutamato, além de estarem envolvidos no transporte de inúmeras drogas (SZAKACS et al., 2004; CHEN et al., 2003; WIELINGA et al., 2005). A subfamília ABCC é composta por 12 proteínas, incluindo a 49^o proteína da subfamília ABC (ABCC13), o qual parece ser uma proteína não funcional e, por isso, não é considerada um transportador (ZHANG et al., 2018a; YABUUCHI et al., 2002; SZAKACS et al., 2004). A maioria dos transportadores ABCC possuem um terceiro domínio transmembrana, presente na região amino-terminal, que não possui função definida. Devido à presença desse terceiro domínio, os transportadores MRP-1, 2, 3, 6 e 7 possuem 17 segmentos transmembrana, enquanto os demais transportadores (MRP-4, 5, 8 e 9) possuem a típica estrutura de um transportador ABC completo, com 2 domínios transmembranas, 12 segmentos transmembranas e dois NBDs, sendo denominados como “MRP’s curtos” (XIAO et al., 2020; OGURI et al., 2007; HOPPER-BORGE et al., 2004; DEELEY, WESTLAKE e COLE, 2006).

O primeiro membro da subfamília ABCC é o transportador ABCC1, uma proteína de aproximadamente 171 kDa, o qual é codificada pelo gene *ABCC1*, também conhecido como MRP-1 (*multidrug resistance-associated protein 1*), localizado no cromossomo 16p13.1 (COLE et al., 1992; NCBI, 2020; GAO et al., 2016). O transportador ABCC1 é um transportador completo, possui 2 domínios transmembrana (*transmembrane domains* – TMD) e dois domínios NBDs, além do terceiro TMD sem função definida, característico da subfamília ABCC (XIAO et al., 2020). Os TMDs são responsáveis pelo transporte dos substratos através da formação de um canal. Já os domínios citoplasmáticos são responsáveis pela hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) (XIAO et al., 2020). Em relação

a sua localização intracelular, ABCC1 pode ser encontrado no citoplasma, no núcleo, no complexo de golgi, nos lisossomos, na membrana plasmática e também na membrana mitocondrial, onde parece desempenhar um papel na proteção do DNA contra danos, além do seu papel no efluxo de toxinas e xenobióticos, como os demais transportadores ABC (ROUNDHILL, TURNBULL e BURCHILL, 2016; ROUNDHILL e BURCHILL, 2012; PIATKOV et al., 2017).

O transportador ABCC1 pode ser encontrado em um grande número de tecidos saudáveis, entre eles, pulmão, bexiga, baço, rim, glândulas tireóide, glândulas adrenais, placenta, barreira hematoencefálica e células endoteliais (PIATKOV et al., 2017). Nos tecidos neoplásicos, a expressão de *ABCC1* pode se encontrar aumentada em carcinomas hepatocelulares, adenocarcinoma colorretal, câncer de bexiga, câncer de pulmão de pequenas células e de não pequenas células, sarcoma de Ewing, melanoma, tumores de ovário e tumores de mama (BOREL et al., 2012; GAO et al., 2019; LI, XIE e ZHANG, 2019; PIATKOV et al., 2017; ROUNDHILL, TURNBULL e BURCHILL, 2016; HEIMERL et al., 2007; SEBOROVA et al., 2019; YAMADA et al., 2013; PARK et al., 2006)

ABCC1 tem a capacidade de transportar substratos conjugados com grandes grupos aniônicos (XIAO et al., 2020), sendo que drogas conjugadas com glutationa, glucuronato e sulfato parecem ter maior afinidade pelo transportador ABCB1 quando comparado a outros transportadores (HIPFNER et al., 1999; BORST et al., 2000). Em relação aos agentes antineoplásicos, *ABCC1* está envolvido no transporte e resistência de agentes antifolatos (como metotrexato), ciclofosfamida, doxorrubicina, docetaxel e fluoruracila, enquanto a exposição a agentes como doxorrubicina e etoposídeo parecem influenciar a superexpressão desse transportador (WIELINGA et al., 2005; ROUNDHILL e BURCHILL, 2012; XIAO et al., 2020; YAN et al., 2019). Além disso, polimorfismos genéticos no gene que codifica *ABCC1* está associado a toxicidade hematológica causada por drogas antineoplásicas, como fluoruracila, epirrubicina e ciclofosfamida (XIAO et al., 2020).

No adenocarcinoma colorretal e no carcinoma hepatocelular, a superexpressão de *ABCC1* está relacionada com a resistência a oxaliplatina, além de conferir um fenótipo mais agressivo para carcinomas hepatocelulares e influenciar a metástase e prognóstico nos adenocarcinomas colorretais (HUANG et al., 2018; GAO et al., 2019; YAN et al.,

2019). Em tumores de bexiga, *ABCC1* confere resistência a gencitabina, enquanto a superexpressão desses transportadores em sarcoma de Ewing e câncer de ovário está associado a um desfecho clínico desfavorável (LI, XIE e ZHANG, 2019; SEBOROVA et al., 2019; ROUNDHILL, TURNBULL e BURCHILL, 2016). A superexpressão nos tumores de mama confere resistência a ciclofosfamida, metotrexato, fluoruracila, doxorubicina, docetaxel e talazoparibe (ESKILLER et al., 2020; YAN et al., 2019; XIAO et al., 2020; GAO et al., 2016).

O transportador *ABCC2*, também conhecido como MRP2 ou cMOAT (*canalicular multispecific organic anion transporter*) é codificado pelo gene *ABCC2*, localizado no cromossomo 10q24.2 e está envolvido no transporte fisiológico de ânions orgânicos, como a bilirrubina conjugada, e na excreção hepatobiliar de alguns componentes, incluindo drogas (KNUTSEN et al., 2000; SZAKACS et al., 2004; SUROWIAK et al., 2006; BURGER et al., 2003; NCBI, 2020). Devido sua função, em condições fisiológicas, os transportadores *ABCC2* podem ser encontrados principalmente na membrana plasmática das células do fígado, nas membranas das células dos túbulos proximais no rim, mas também no intestino, vesícula biliar e pulmão (SUROWIAK et al., 2006).

Nos tecidos tumorais, *ABCC2* pode ser encontrado superexpresso no carcinoma hepatocelular, melanoma e carcinoma de ovário (BOREL et al., 2012; HEIMERL et al., 2007; SUROWIAK et al., 2006). A superexpressão desse transportador está associado a resistência aos agentes antineoplásicos derivados da platina, como cisplatina e carboplatina, sendo que o tratamento com cisplatina pode induzir um aumento na expressão dos transportadores *ABCC2* em tumores de ovário (SUROWIAK et al., 2006). Tanto o melanoma quanto tumores de ovário que são resistentes à cisplatina estão fortemente associados a uma superexpressão de *ABCC2*, além de influenciar o desfecho clínico do paciente (HEIMERL et al., 2007; SUROWIAK et al., 2006; ELSNEROVA et al., 2016). Além da carboplatina e cisplatina, outros agentes que são substratos do transportador *ABCC2* são oxaliplatina, vimblastina, derivados da camptotecina e antifolatos, entre eles o metotrexato e alimta (BURGER et al., 2003; WIELINGA et al., 2005; BISWAS et al., 2019).

Outro representante da subfamília *ABCC* envolvido nos mecanismos de resistência à quimioterapia, é o transportador *ABCC3*. Também conhecido como MRP3,

o transportador é codificado pelo gene de mesmo nome, localizado no cromossomo 17q21.33 (GILLET et al., 2004; HUANG et al. 2004; NCBI, 2020). *ABCC3* pode ser localizado nas membranas plasmáticas das células do fígado, intestino delgado, cólon, próstata, testículo, rim, adrenal, bexiga, estômago, entre outros e está envolvido no transporte de compostos conjugados a glucuronato e glutathione, além de participar no transporte de ácidos biliares (BOREL, et al., 2012; CHEN et al., 2003; NCBI, 2020; UNIPROT, 2022c). Nos tumores, observa-se uma expressão aumentada de *ABCC3* em tumores de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Merkel, câncer de mama, adenocarcinoma ductal de pâncreas e tumor de pulmão de não pequenas células (BOREL et al., 2012; ELSNEROVA et al., 2016; KLEFFEL et al., 2016; ADAMSKA et al., 2019; WANG et al., 2020). No adenocarcinoma ductal de pâncreas, a superexpressão de *ABCC3* está relacionado com a regulação da cascata de sinalização celular que atua no crescimento e progressão das células neoplásicas (ADAMSKA et al., 2019). Além disso, tanto nos tumores de pâncreas quanto nos tumores de pulmão de não pequenas células, o aumento do número de transportadores *ABCC3* está associado a um mau prognóstico para essas doenças (ELSNEROVA et al., 2016; ADAMSKA et al., 2019). No carcinoma de células de Merkel, a superexpressão de *ABCC3* confere resistência à carboplatina e etoposídeo, sendo essas as drogas indicadas no tratamento de primeira linha dessa patologia (KLEFFEL et al., 2016). Outros agentes antineoplásicos que são substratos do transportador *ABCC3* são antifolatos (metotrexato), teniposídeo e etoposídeo (HUANG et al., 2004; WIELINGA et al., 2005; WANG et al., 2020).

O transportador *ABCC4*, também nomeado de *MRP4*, diferentemente da grande maioria dos transportadores pertencentes a subfamília *ABCC*, é um transportador completo que não possui um terceiro TMD N-terminal (GUO et al., 2003). Localizado no cromossomo 13q32.1, o gene *ABCC4* codifica o transportador *ABCC4* que está envolvido no transporte de xenobióticos e no transporte de moléculas que participam de sinalizações intracelulares (RUSSEL, KOENDERINK e MASEREEUW, 2008; ZHU et al., 2018; NCBI, 2020). *ABCC4* pode ser encontrado na membrana das células dos túbulos proximais nos rins, nas membranas das células epiteliais, nas membranas das células dendríticas e nas plaquetas (VAN AUBEL et al., 2002 LAI e TAN, 2002; VAN DE VEN et al., 2008; JEDLITSCHKY et al., 2004). Além disso, observa-se a expressão de *ABCC4*

nas membranas das células endoteliais dos capilares do cérebro, onde conferem proteção contra citotoxinas e drogas, como o topotecano (LEGGAS et al., 2004).

Em relação as células neoplásicas, *ABCC4* pode ser encontrado expresso em células de leucemia e linfomas, células de adenocarcinoma ductal de pâncreas, tumores gástricos, retinoblastoma, tumores de mama, tumores de próstata, osteossarcomas e neuroblastomas (CAROZZO et al., 2019; ZHANG et al., 2015a; ZHANG et al., 2015b; ZHU et al., 2018; HU et al., 2019; LANGMANN et al., 2003; HE et al., 2015; MURRAY et al., 2017; DRENBURG et al., 2016). Dentre os agentes antineoplásicos que são substratos de *ABCC4* estão os análogos das purinas (mercaptopurina, tioguanina), antifolatos (metotrexato), citarabina (DEAN et al., 2002; CHEN et al., 2002; WIELINGA et al., 2005; GUO et al., 2003; WIELINGA et al., 2002). Nas células de retinoblastoma, a superexpressão de *ABCC4* está relacionada com a resistência a carboplatina (ZHU et al., 2018), enquanto nas células de neuroblastoma, o transportador confere resistência ao irinotecano (MURRAY et al., 2017). Nas células de leucemia linfóide aguda, a expressão de *ABCC4* é descrita como um dos mecanismos de resistência para os antimetabólitos (DRENBURG et al., 2016).

O transportador *ABCC5* é outro transportador ABCC que é completo, porém não possui o TMD N-terminal extra como outros transportadores da subfamília. Codificado pelo gene *ABCC5*, localizado no cromossomo 3q27.1, a proteína *ABCC5* também é chamada de MRP-5 e é um transportador aniônico anfipático, estando presente em quase todos os tecidos do corpo humano, participando no transporte de nucleotídeos e nas cascatas de sinalizações intracelulares (GILLET et al., 2004; NCBI, 2020; WIELINGA et al., 2002; GUO et al., 2003; CHEN et al., 2003). Em tecidos saudáveis, *ABCC5* pode ser encontrado na membrana plasmática, no complexo de golgi, e nos endossomos de células da traqueia, pulmão, próstata, testículos, baço e útero (LANGMANN et al., 2003; UNIPROT, 2022c). Nos tumores, observa-se uma superexpressão do gene *ABCC5* em tumores de próstata e carcinomas hepatocelulares (BOREL et al., 2012; ZHANG et al., 2018a). No carcinoma hepatocelular, a presença do transportador *ABCC5* parece causar resistência a metotrexato e alimta (WIELINGA et al., 2005). Nos tumores de próstata, o transportador está envolvido no processo de metástase, conferindo um mau prognóstico e pior sobrevida global dos pacientes (ZHANG et al., 2018a). Dentre os agentes

antineoplásicos transportados por ABCC5 estão os análogos dos nucleotídeos (como mercaptopurina, tioguanina, antimetabólitos (como metotrexato, raltitrexato, fluoruracila) e paclitaxel, (ZHANG et al., 2018a; PARK et al., 2006; GUO et al., 2003).

Outro representante da subfamília ABCC é o transportador ABCC10, ou MRP7 (KATHWALA et al., 2014). Identificado pela primeira vez em 2001, o transportador ABCC10 funciona como transportador aniônico anfipático, com 161 kDa de peso molecular e o gene que o codifica está localizado no cromossomo 6p21.1 (GILLET et al., 2004; NCBI, 2020; HOPPER-BORGE et al., 2004; HOOPER et al., 2001). Em células humanas saudáveis, é possível identificar a presença de ABCC10 na membrana plasmática de células da traqueia, pulmão e útero (LANGMANN et al., 2003; UNIPROT, 2022c), onde parece participar do transporte de substâncias conjugadas a glucuronato e glutatona (CHEN et al., 2003). Nos tumores, observa-se uma superexpressão de *ABCC10* em tumores de pulmão de não pequenas células e carcinoma hepatocelular, sendo que nos tumores de pulmão, a expressão dos receptores está associada a alterações na farmacocinética e toxicidade de docetaxel (BOREL et al., 2012; SONE et al., 2019). Outros agentes antineoplásicos que podem desenvolver resistência por serem substratos de ABCC10 são os taxanos (paclitaxel, docetaxel), alcaloides da vinca (vincristina, vimblastina e vinorelbina), antraciclinas (doxorrubicina) e análogos dos nucleotídeos (gencitabina, citarabina) (SONE et al., 2019; ZHANG, YOU e ZHU, 2017; KATHWALA et al., 2014; HOPPER-BORGE et al., 2004).

Um último transportador da subfamília ABCC que parece estar envolvido nos mecanismos de multirresistência é ABCC11. Também descrito pela primeira vez em 2001, ABCC11, ou transportador MRP8, é uma proteína glicosilada de 154 kDa que funciona como uma bomba de efluxo aniônica lipofílica e cujo gene, de mesmo nome que a proteína, localiza-se no cromossomo 16q21.1 (GILLET et al., 2004, NCBI, 2020, GUO et al., 2003; BERA et al., 2001). Assim como ABCC4 e ABCC5, ABCC11 também não possui o terceiro TMD N-terminal extra e pode ser expresso no testículo, útero, fígado, mama e próstata (GUO et al., 2003; LANGMANN et al. 2003; OGURI et al., 2007). Em condições fisiológicas normais, ABCC11 está envolvido no efluxo de segundos mensageiros intracelulares, influenciando a cascata de sinalização intracelular (GUO et al., 2003). ABCC11 está envolvido no transporte de inúmeros agentes antineoplásicos,

sendo que os análogos dos nucleotídeos parecem possuir uma maior afinidade por esse receptor (PARK et al., 2006; SZAKACS et al., 2004). Outros agentes que são transportados por ABCC11 são o metotrexato, pemetrexede, análogos das purinas e fluoropirimidinas, incluindo fluoruracila e seus metabólitos ativos e inativos (OGURI et al., 2007; YAMADA, et al. 2013; UEMURA et al., 2019; GUO et al., 2003). Células de hepatocarcinoma celular, câncer de pulmão de não pequenas células e tumores de mama parecem superexpressar *ABCC11*, sendo que nos tumores de mama essa superexpressão está relacionada a um fenótipo mais agressivo e mau prognóstico (BOREL et al., 2012; OGURI et al., 2007; YAMADA et al., 2013).

2.4.4 Subfamília ABCE

A subfamília ABCE é composta por somente um membro, ABCE1, o qual foi primeiramente descrito como inibidor da atividade da RNase L (KARCHER, SCHELE e HOPFNER, 2008; ZHANG et al., 2018a). A proteína ABCE1 é composta por 599 aminoácidos e possui massa de 68 kDa (QU e ZHANG, 2015). Codificado pelo gene *ABCE1* localizado no cromossomo 4q31.21, a proteína ABCE1 contém somente NBDs, o qual dimeriza com a RNase L e interfere em inúmeras atividades biológicas (CHEN et al., 2006; SEBOROVA et al., 2019, ZHANG et al., 2018a; NCBI, 2020). Sua atividade está relacionada com a tradução de proteínas, biossíntese de ribossomos e inibição da atividade ribonuclease L intracelular, sendo essa última responsável por agir na inibição da apoptose e induzir a proliferação e diferenciação celular (SEBOROVA et al., 2019; QU e ZHANG, 2015). Em tecidos saudáveis, *ABCE1* é encontrada no cérebro, rins, pulmões, fígado, baço, coração, pâncreas, traqueia, próstata e testículos (HUANG et al., 2014; LANGMANN et al., 2003). Já em relação a sua localização intracelular, ABCE1 está presente predominantemente no citoplasma, mas pode ser localizado nas mitocôndrias e participar do rearranjo do citoesqueleto das células (HAN, TIAN e TIAN, 2016; HUANG et al., 2014).

A expressão de ABCE1 nas células neoplásicas está relacionada tanto com o processo de carcinogênese (proliferação, migração e invasão das células tumorais) quando no processo de resistência a agentes antineoplásicos (ZHANG et al., 2018a; YU,

HAN e TIAN, 2017; SHICHIJO et al., 2005). A superexpressão de *ABCE1* foi identificada em inúmeros tumores, entre eles melanoma, retinoblastoma, câncer colorretal, câncer de mama, câncer de esôfago, carcinoma hepatocelular, câncer de próstata, glioma e câncer de pulmão (HAN, TIAN e TIAN, 2016; ZHANG et al., 2018a). A presença de *ABCE1* nos gliomas parece estar relacionado com a resistência à temozolamida, principal droga utilizada no tratamento dessa patologia (ZHANG et al., 2018a). Além disso, tumores de mama apresentaram um aumento na expressão de *ABCE1* após tratamento com agentes antineoplásicos quando comparados com tecidos saudáveis (HLAVAC et al., 2013).

2.4.5 Subfamília ABCF

A subfamília ABCF é composta por 3 membros (ABCF1, ABCF2 e ABCF3), sendo que somente o ABCF2 está envolvido com o processo de multirresistência às drogas em células tumorais (BAO et al., 2017). As proteínas ABCF contêm NBDs, porém, não possuem TMD. Devido à sua estrutura, os membros da subfamília ABCF possuem um papel no processo síntese de proteínas, especialmente na tradução e no alongamento das mesmas (BAO et al., 2017; SEBOROVA et al., 2019; OGAWA et al., 2006).

O gene que codifica para proteína ABCF2 encontra-se no cromossomo 7q36.1. Nas células neoplásicas, a proteína ABCF2 encontra-se no citoplasma ou no núcleo das células (GILLET et al., 2004; NCBI, 2020; TSUDA et al., 2005; NISHIMURA et al., 2007). Dentre os tumores que superexpressam *ABCF2* estão os tumores de mama, melanoma, tumores de ovário e tumores gástricos, nos quais essas proteínas parecem conferir resistência a agentes antineoplásicos (ZHANG, et al., 2018b; OGAWA et al., 2006; HENDIG et al., 2009). Nos tumores de mama, observou-se um aumento na expressão de *ABCF2* após tratamento (HLAVAC et al., 2013). Já em relação aos tumores gástricos, a superexpressão de *ABCF2* parece conferir resistência a oxaliplatina, enquanto nos tumores de ovário confere resistência a cisplatina, além de um prognóstico desfavorável (HENDIG et al., 2009; ZHANG, et al., 2018b).

2.4.6 Subfamília ABCG

A subfamília ABCG é composta por meio transportadores que, assim como outros membros da família ABC, estão envolvidos no transporte de lipídeos (TARLING e EDWARDS, 2011). Composta por 5 membros (ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 e ABCG8), as proteínas ABCG possuem um TMD e NBD, sendo necessário dimerização (tanto homodímeros quanto heterodímeros) para que os membros funcionem como transportadores (ENGEL et al., 2001; TARLING e EDWARDS, 2011). Esses transportadores são amplamente distribuídos nas células, podendo ser encontrados na membrana plasmática, retículo endoplasmático, mitocôndrias, corpos lamelares e peroxissomos (TARLING e EDWARDS, 2011). ABCG1 e ABCG2 são os transportadores da subfamília ABCG envolvidos nos mecanismos de resistência a drogas.

O transportador ABCG1 é codificado pelo gene *ABCG1*, também conhecido como ABC8, localizado no cromossomo 21q22.3, e está envolvido no transporte de lipídeos, incluindo a regulação do colesterol intracelular (ZHAN et al., 2019; CHEN et al., 2016a; GILLET et al., 2004, NCBI, 2020; KLUCKEN et al., 2000). *ABCG1* é amplamente distribuído em células saudáveis, podendo ser encontrado em células mielóides, células linfocíticas, células endoteliais, entre outros (SAG et al., 2015). Em relação a sua localização celular, o transportador *ABCG1* pode ser encontrado na membrana plasmática, complexo de golgi e retículo endoplasmático (UNIPROT, 2022g).

Em células tumorais, *ABCG1* parece desempenhar um papel no microambiente tumoral, sendo que sua ausência resulta em um acúmulo de colesterol, desenvolvimento de uma cascata de reações inflamatórias que previnem o crescimento do tumor e induzem a apoptose (SAG et al., 2015). Estudos mostram que *ABCG1* está super expresso em tumores de ovário, câncer de pulmão e glioblastoma (ZHAN et al., 2019, HUSSAIN et al., 2018; CHEN et al., 2016a). A superexpressão de *ABCG1* em células de glioblastoma está associado com um pior prognóstico (CHEN et al., 2016a). Já no câncer de pulmão, além de participar no processo de proliferação e invasão das células cancerosas, ABCG1 também parece conferir resistência a cisplatina nesse tipo de tumor (ZHAN et al., 2019).

O segundo transportador da subfamília ABCG envolvido nos mecanismos de resistência a quimioterapia é o transportador ABCG2, sendo este um dos transportadores mais conhecidos e estudados, juntamente com ABCB1 e ABCC1 (XIAO et al., 2020).

ABCG2 também é conhecido como proteína de resistência do câncer de mama (*breast cancer resistance protein* – BCRP) ou proteína resistente a mitoxantrona (*mitoxantrone resistance-associated gene* – MXR), sendo que em 1998, Allikmets et. al descreveram a proteína ABCG2 como ABCP1 (GOSE et al., 2020; LITMAN et al., 2000). Essa proteína é composta por 655 aminoácidos, possui 72 kDa, 16 exons e 15 introns, é codificada pelo gene *ABCG2*, localizado no cromossomo 4q22.1 e possui sua estrutura tridimensional determinada (LITMAN et al., 2000; RAO et al., 2005; CANDEIL et al., 2004; NCBI, 2020). Assim como outros membros da subfamília ABCG, ABCG2 é um meio transportador que necessita de dimerização para funcionar, sendo a homodimerização a mais comum de ocorrer para essa proteína (LITMAN et al., 2000; CANDEIL et al., 2004).

ABCG2 pode ser expresso por inúmeros tecidos, entre eles placenta, enterócitos, membrana canalicular do hepatócito, ductos e lóbulos da mama, veias e capilares dos vasos sanguíneos, linfócitos, células tronco hematopoiéticas, barreira hematoencefálica, próstata e útero (WEISS et al., 2007; LANGMANN et al., 2003). A presença desse transportador em importantes tecido de barreira são indicativos de um papel importante de ABCG2 na proteção desses tecidos através da absorção e eliminação de xenobióticos (KORT et al., 2015). Em relação a localização intracelular, o transportador ABCG2 pode ser encontrado, em grande maioria, no citoplasma e na membrana plasmática (LITMAN et al., 2000), podendo também ser encontrado no núcleo de células de carcinoma hepatocelular, tumores de cabeça e pescoço, tumores de pulmão e células de glioblastoma (CHEN, et al, 2016b; LIANG et al., 2015). Em tecidos saudáveis, a disfunção de ABCG2 está relacionado com alterações no transporte de ácido úrico, ocasionando a hiperuricemia e, conseqüentemente, pode estar envolvido no desenvolvimento de gota, doenças renais e hipertensão (GOSE et al., 2020).

A superexpressão do transportador *ABCG2* foi identificada em um grande número de tumores, entre eles: câncer de cólon, tumor de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas de laringe, tumores de cabeça e pescoço, glioblastoma, câncer de pulmão, tumores agressivos de mama e câncer de próstata (XIE et al., 2014; HUSSAIN et al., 2018; CHEN, et al, 2016b; LIANG et al., 2015; YAMADA et al., 2013; SABNIS et al., 2017). Devido à sua vasta expressão em tumores, ABCG2 pode influenciar a resistência à diversos agentes antineoplásicos e, em alguns tumores, sua expressão

elevada pode estar associada a um pior desfecho clínico (GOSE et al., 2020). A expressão de *ABCG2* em células tronco de câncer também está associado ao processo de multirresistência a drogas, recaída do tumor e invasão das células tumorais (XIE et al., 2014). Nas células tronco de câncer de colon, a superexpressão de *ABCG2* parece induzir a resistência a fluoruracila, cisplatina, oxaliplatina e paclitaxel, sendo que essa superexpressão pode ser induzida pela exposição ao irinotecano (XIE et al., 2014; CANDEIL et al., 2004).

Tumores de ovário resistentes a doxorrubicina, cisplatina e paclitaxel estão associados com uma superexpressão de *ABCG2* (SEBOROVA et al., 2019; COLCAGNO et al., 2008). Já nos carcinomas hepatocelulares, o aumento da expressão de *ABCG2* induz resistência a doxorrubicina, além de estar associado com um pior prognóstico (CHEN, et al, 2016b). Nos tumores de mama, *ABCG2* confere resistência a antraciclinas e olaparibe (BURGER et al., 2003; ESKILER et al., 2020), enquanto no câncer de próstata, o receptor está associado à resistência à bicalutamida, um agente hormonal usado no tratamento dessa patologia (SABNIS et al., 2017). Além da resistência à antraciclinas, *ABCG2* também está envolvido no transporte e desenvolvimento de resistência aos agentes antineoplásicos topotecano, inibidores da tirosina quinase (como sorafenibe e regorafenibe e talazoparibe), mitoxantrona, metotrexato e suas formas poliglutamatas, e também a medicamentos pertencentes a outras classes farmacológicas, como cimetidina, fluoroquinolonas e antiretrovirais (LITMAN et al., 2000; KORT et al., 2015; ESKILLER et al., 2020; BOONSTRA et al., 2004; OGURI et al., 2007; WEISS et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Analisar quantitativamente e qualitativamente a extração de RNA em diferentes amostras de mama para identificar a expressão de transportadores ABC, a nível transcricional, em pacientes com câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão dos 20 principais transportadores ABC associados à resistência a agentes antineoplásicos em diferentes amostras de mama.
- Avaliar os transportadores ABC como potenciais biomarcadores tumorais preditivos de respostas aos agentes antineoplásicos.

4. MATERIAIS

4.1 EXTRAÇÃO DE RNA

Para extração do material genético (DNA, RNA e proteína) das amostras foram utilizados os reagentes TRIzol e clorofórmio, adquiridos da Sigma. Também foram utilizados os reagentes isopropanol e etanol absoluto, da Merck, sendo que o etanol foi posteriormente diluído com água miliQ para atingir a graduação de 75%. Água ultrapura livre de RNase, da marca Invitrogen, foi utilizada para ressuspender e armazenar o RNA extraído.

4.2 GEL DE AGAROSE

Para análise da integridade do RNA através do gel de agarose 1%, utilizou-se agarose da GE Healthcare em tampão TBE 1x. O TBE foi preparado com ácido bórico (Alpha Tee), tris Base (Ludwig) e EDTA (Merck). Água destilada também foi utilizada para o preparo do TBE 1x. Para a desnaturação do RNA, para garantir a separação dos fragmentos no gel de agarose, optou-se pela formamida adquirida da Applied Biosystem. Como marcador de peso molecular, foi aplicado o marcador 1 kb DNA Ladder RTU da marca Kasvi. Por fim, o brometo de etídio, agente intercalante de ácido nucléico, foi escolhido como corante para visualização dos fragmentos de RNA no transiluminador.

4.3 SÍNTESE DE cDNA E RT-qPCR

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™), água livre de RNase e o termociclador também da Applied Biosystem. O cDNA resultante era armazenado em freezer, a -20°C. Para a RT-qPCR, utilizaram-se as amostras de cDNA, os normalizadores *RPS13*, *YWHAZ* e *HPRT1*, cuja sequência dos primers encontra-se na tabela 2, e os primers para amplificação dos genes que codificam para *ABCA1*, *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCA7*, *ABCB1*, *ABCB2*, *ABCB4*, *ABCB5*, *ABCB6*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ABCC10*, *ABCC11*, *ABCE1*, *ABCF2*, *ABCG1* e *ABCG2*. Os transportadores foram selecionados com base na revisão de literatura, conforme mencionado anteriormente. Os primers utilizados foram desenhados e sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa “Neoplasias Resistentes à Drogas”, e estão apresentados na tabela 3. Também foram utilizados o reagente PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) e água livre de RNase. O termociclador utilizado para a reação foi o aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System da Applied Biosystems. Para todos os primeiros, foi utilizada a concentração de 1 µM e considerada eficiência de 2. Para esse estudo, utilizou-se *threshold* de 0,1 no software de análise do equipamento.

TABELA 2: DESENHO DOS NORMALIZADORES UTILIZADOS NA RT-qPCR

Normalizador HKG	Sequência Forward	Sequência Reverse	Tamanho amplicon	Referência/NCBI
<i>RPS13</i> ^{1, 2}	CGTCCCCACTTGTTGAAGT	TGAATCTCTCAGGATTACACCGA	109	NM_001017.3
<i>YWHAZ</i> ^{3, 4, 5}	GGGGGTGTTGCGATACG	GACTGGATGTTCTGACTTGAGAC	103	NM_001135702.1
<i>HPRT1</i> ^{5, 6, 7, 8, 9, 10}	CAGGGATTGAATCATGTTTGTGT	ACTCCAGATGTTTCCAACTCAAC	98	NM_000194.3

FONTES:

¹ Jacob F, Guertler R, Naim S, et al. Careful Selection of Reference Genes Is Required for Reliable Performance of RT-qPCR in Human Normal and Cancer Cell Lines. *PLoS One*. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0059180

² Zhang C, Wang YQ, Jin G, Wu S, Cui J, Wang RF. Selection of reference genes for gene expression studies in human bladder cancer using SYBR-green quantitative polymerase chain reaction. *Oncol Lett*. 2017. doi:10.3892/ol.2017.7002

³ Lemma, S., Avnet, S., Salerno, M., Chano, T., & Baldini, N. (2016). Identification and validation of housekeeping genes for gene expression analysis of cancer stem cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149481>;

⁴ Potashnikova D, Gladkikh A, Vorobjev IA. Selection of superior reference genes'combination for quantitative real-time PCR in B-cell lymphomas. *Ann Clin Lab Sci*. 2015.

⁵ Saidova AA, Vorobjev IA, Tvorogova A V., Maly I V., Hofmann WA, Potashnikova DM. Specific and reliable detection of Myosin 1C isoform A by RT-qPCR in prostate cancer cells. *PeerJ*. 2018. doi:10.7717/peerj.5970

⁶ Ali H, Du Z, Li X, et al. Identification of suitable reference genes for gene expression studies using quantitative polymerase chain reaction in lung cancer in vitro. *Mol Med Rep*. 2015. doi:10.3892/mmr.2015.3159

⁷ Liu Y, Qin Z, Cai L, Zou L, Zhao J, Zhong F. Selection of internal references for qRT-PCR assays of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biosci Rep*. 2017. doi:10.1042/BSR20171281

⁸ de Campos RP, Schultz IC, de Andrade Mello P, et al. Cervical cancer stem-like cells: systematic review and identification of reference genes for gene expression. *Cell Biol Int*. 2018. doi:10.1002/cbin.10878

⁹ Peng X, McCormick DL. Identification of reliable reference genes for quantitative gene expression studies in oral squamous cell carcinomas compared to adjacent normal tissues in the F344 rat model. *Oncol Rep*. 2016. doi:10.3892/or.2016.4883

¹⁰ Drozd E, Krzysztoń-Russjan J, Gruber B. Doxorubicin treatment of cancer cells impairs reverse transcription and affects the interpretation of RT-qPCR results. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2016.

TABELA 3: SEQUÊNCIA DOS PRIMERS DOS GENES QUE CODIFICAM PARA PROTEÍNAS ABC.

Gene	Referência NCBI	Sequência 5' – 3'	Localização éxon*	Tamanho Do Amplicon	Concentração	Eficiência (Threshold 0,1)
<i>ABCA1</i>	NM_005502.4	F- GGGCATTCTAGTTATGGCATCT R- GCAAGGTACCATCTGAGGTCT	F- éxon 25 ²³ R- éxon 26 ⁹ -27 ¹²	104 pb	1000 nM	2

ABCA2	NM_212533.2	F- TCCGACTGCACCGGTATG R- CTGCGCACCGCGATCTT	F- exon 31 ¹³ – 32 ⁵ R- exon 33 ¹⁷	109 pb	1000 nM	2
ABCA3	NM_001089.3	F- CCTACACGAGGCTGACCATC R- CCAGTTTACAGCTGGGATGC	F- exon 24 ²⁰ R- exon 24 ⁹ -25 ¹²	90 pb	1000 nM	2
ABCA7	NM_019112.3	F- ACCTGTCTGACTTCCTGGTCAA R- GAGAAGCCTCCGTATCTGACCTC	F- exon 30 ²² R – exon 31 ⁸ - 32 ¹⁵	97 pb	1000 nM	2
ABCB1	NM_000927.4	F- CCAGAAACAACGCATTGCCATA R- TTGGACAACCTTTTCACTTTCTGTA	F- exon 28 ²² R- exon 28 ¹⁶ - 29 ⁹	109 pb	1000 nM	2
ABCB2	NM_001292022.1	F- CCCTCCAGGATAATGGGGAGAT R- CGAGTGAAGGTATCGGCTGAG	F- exon 1 ¹⁵ - 2 ⁷ R- exon 22 ¹	94 pb	1000 nM	2
ABCB4	NM_000443.3	F- CTATTGCCCGAGCCCTCAT R- TCTTGGACAACCTTTTCACTTTCA	F- exon 27 ¹⁹ R – exon 27 ¹³ -28 ¹⁴	94 pb	1000 nM	2
ABCB5	NM_001163941.1	F- CAGCCGTGTGGTGCCATTAG R- AACTTGTGTGTTGTATTTCTCAGGG	F – exon 26 ²⁰ R – exon 26 ⁷ - 27 ¹⁸	100 pb	1000 nM	2
ABCB6	NM_001349828.1	F- AACCGCACCAACCATCGTA R- AGAGCCTCGTGTCTGTCC	F- exon 16 ¹⁸ R- exon 17 ⁵ - 18 ¹²	110 pb	1000 nM	2
ABCC1	NM_004996.4	F – CTGGACTGATGACCCCATCG R – ACGGCGATCCCTTGTGAAAT	F – exon 22 ²⁰ R – exon 22 ¹⁰ - 23 ¹⁰	96 pb	1000 nM	2
ABCC2	NM_000392.5	F - ATGCACTCAATATCACACAAACCC R – CAGTTATTCGCTCAACAGCCA	F – exon 26 ¹¹ – 27 ¹³ R – exon 27 ²¹	90 pb	1000 nM	2
ABCC3	NM_001144070.1	F - GATCTACTTCCTCTGGCAGAACCT R – GCCACAGCTCCGTTGAGT	F – exon 10 ¹⁹ – 11 ⁵ R – exon 11 ¹⁸	90 pb	1000 nM	2
ABCC4	NM_005845.4	F - TTGACAGCGACAAGATAATGGTTTT R - GCACCATCTTGTAATAATAGGCTCTC	F – exon 29 ²⁰ - 30 ⁵ R – exon 30 ²⁵	105 pb	1000 nM	2
ABCC5	NM_005688.4	F – GACGGAGATTGGAGAGCGAG R – GGGGTCGTCCAGGATGTAGA	F – exon 14 ⁷ - 15 ¹³ R – exon 15 ²⁰	109 pb	1000 nM	2
ABCC10	NM_033450.2	F - ACAGATGCCAAGATCCTGTGT R – CTGTCTTGTTGGCAAAGCGT	F – exon 18 ¹² - 19 ⁹ R – exon 19 ²⁰	106 pb	1000 nM	2
ABCC11	NM_032583.3	F- TCATTGACGGCGTGGACAT R- TAGGTTGAATCTGATGGTTCCTGAG	F – exon 26 ¹⁹ R – exon 26 ¹⁵ - 27 ¹⁰	110 pb	1000 nM	2
ABCE1	NM_001040876.1	F- TGGTGATGCTGGGGGAAAAT R- AGAACTGGTACTTCTCCTCCTTC	F- exon 11 ²⁰ R- exon 12 ⁷ -13 ¹⁶	97 pb	1000 nM	2
ABCF2	NM_007189.3	F – GGGCGTTACCATCAGCATTT R – TCTCCTTGATCTCTGGGTAGCA	F – exon 12 ¹⁵ - 13 ⁵ R – exon 13 ²²	91 pb	1000 nM	2
ABCG1	NM_207174.1	F- TGGGAGTCTTTCTTCGGGAAC R- TGGGAACATGATCTGAAAGGGC	F -exon 12 ²¹ R – exon 12 ¹⁰ - 13 ¹²	101 pb	1000 nM	2

ABCG2	NM_001257386.2	F- ATGGTCTGTTGGTCAATCTCAC R- TTATGCTGCAAAGCCGTAAATCC	F – éxon 13 ₃ - 14 ₁₉ R – éxon 14 ₉ - 15 ₁₄	97 pb	1000 nM	2
-------	----------------	---	--	-------	---------	---

FONTE: grupo de pesquisa “Neoplasias Resistentes à Drogas”

LEGENDA: *Os números que estão em fonte menor correspondem a quantidade de nucleotídeos contidos no éxon correspondente.

5. METODOLOGIA

O trabalho foi submetido ao comitê de ética para coleta e análise das amostras dos pacientes. A coleta e as análises ocorreram mediante a aprovação do comitê de ética (CEP) sob os números CAAE: 17187219.5.3002.5226 - Instituição Proponente: Hospital e Maternidade Angelina Caron/PR e CAAE: 17187219.5.0000.0102 - Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFPR. Para confirmar que as amostras extraídas são viáveis para análise a nível transcricional dos transportadores ABC em amostras de mama, foi realizada a síntese de cDNA e RT-qPCR de tecidos de câncer de mama, no qual utilizaram-se os normalizadores *RPS13*, *YWHAZ* e *HPRT1*.

5.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas, mediante aprovação do CEP conforme mencionado anteriormente, durante os procedimentos cirúrgicos na instituição Hospital Angelina Caron e armazenadas entre -20°C e -80°C (em nitrogênio líquido e/ou freezer a -80°C) até o momento da extração de RNA.

5.2 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA foi extraído conforme técnica padronizada pelo laboratório, com o uso do reagente TRIzol. Todos os materiais utilizados durante a extração foram autoclavados 2 vezes para eliminar qualquer vestígio de RNase que pudesse degradar as amostras.

As amostras foram retiradas do freezer a -80°C ou do nitrogênio líquido e transferidas para um tubo Falcon de 15 ml, onde foi acrescentado de 1 a 2 mL de TRIzol, conforme o tamanho da amostra, e deixado em gelo para descongelamento da amostra por não mais que 15 minutos. Após o descongelamento em gelo, foram adicionadas 2 esferas (beads) de ferro de 7 mm e o tecido foi rompido com triturador com haste com fio de nylon com movimentos verticais do tubo Falcon contra a haste. O processo de rompimento do tecido ocorria o mais rápido possível, não ultrapassando 1 minuto, para evitar a degradação da amostra. Após rompido o tecido, o conteúdo líquido foi transferido

para um eppendorf de 2 ml livre de RNase com o auxílio de micropipetas automáticas multicanal de 1 mL. O conteúdo foi incubado em gelo por 5 minutos, agitado por inversão por 3 vezes e levado à centrifuga por 5 minutos, à 12000 rpm à 4°C. Após o término da primeira centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf de 2 ml, livre de RNase, agitado vigorosamente em vórtex por 15 segundos e incubado em gelo por 5 minutos. Após incubação, foram adicionados 200 uL de clorofórmio (para cada 1 mL de TRIzol utilizado inicialmente) no eppendorf com o sobrenadante, agitado vigorosamente em vórtex por mais 15 segundos e incubado em gelo por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram encaminhadas novamente à centrifugação, à 12000 rpm, à 4°C por 15 minutos. Essa centrifugação tem como objetivo a separação de fases da amostra, resultando em uma fase aquosa, onde encontra-se o RNA, fase leitosa, onde pode ser encontrado o DNA e, por fim, a fase fenólica, onde concentram-se as proteínas da amostra. Cautelosamente, foi coletado a fase aquosa das amostras em um novo eppendorf livre de RNase. A fase fenólica e a fase leitosa foram fracionadas em novos tubos de eppendorfs, também livres de RNase, e armazenados em freezer -80°C para análise posterior.

No tubo contendo a fase aquosa, foram adicionados 500 uL de isopropanol (500 ul para cada 1 mL de TRIzol) e misturado por inversão por 10 vezes. Logo após a mistura da fase aquosa com o isopropanol, o tubo foi levado à centrifugação à 12000 rpm, por 10 minutos, à 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado com auxílio de micropipeta automática e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de etanol 75%, também preparado com água livre de RNase. O tubo foi agitado vigorosamente por 15 segundos em vórtex e novamente centrifugado à 7500 rpm, por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado com auxílio de uma micropipeta automática, retirando todo o conteúdo líquido do tubo. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, o RNA foi seco por 5 a 10 minutos, com objetivo de eliminar todo o solvente utilizado no procedimento. Após a secagem, o pellet foi ressuspendido com 20 uL de água livre de RNase. Desses 20 ul, 1 ul foi separado para leitura da qualidade da amostra no gel de agarose e 3 ul foram fracionados em um tubo de eppendorf para quantificação em Nanodrop. O restante da amostra, cerca de 16 ul, foram separados em novos tubos de eppendorf de 0,2 ml e armazenados em freezer -80°C até o momento do preparo do cDNA.

A qualidade e integridade das amostras de RNA foram avaliadas através do gel de agarose 1%. Para essa análise, era preparado o tampão TBE 1x, o qual era composto por 10,781 g de Tris base, 5,5 g de ácido bórico e 0,744 g de EDTA. Os reagentes eram pesados em balança analítica, adicionados em uma proveta e o volume era completado para 1000 mL com água milliQ. Após dissolvidos todos os reagentes, o tampão TBE 1x era fracionado em frascos de 250 mL e autoclavado 2 vezes antes do uso.

O gel a 1% foi preparado através da mistura de 0,4 g de agarose com 40 mL de tampão TBE 1x novo em um erlenmeyer. A mistura foi aquecida em micro-ondas, com agitação da mistura a cada 3 segundos, até que a agarose estivesse completamente dissolvida e a mistura transparente. Em seguida, esperou-se que a mistura resfriasse para uma temperatura em torno de 40°C e a mistura era aplicada na cuba de eletroforese, já montada com a cama e pente. Após a aplicação da mistura, aguardou-se a solidificação do gel para a retirada do pente e preenchimento da cuba com tampão TBE 1x até a marcação delimitada pelo fabricante da cuba. Em seguida, 1 uL de amostra do RNA foi misturado a 1 uL de formamida e a mistura era aplicada no gel de agarose 1%. No gel também foi aplicado o marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder RTU) e a corrida era realizada nas condições de 65 V por 35 minutos. Após o término da corrida, o gel foi corado em brometo de etídio por 15 minutos e enxaguado por imersão em água destilada por mais 15 minutos, seguido da leitura em transiluminador de luz UV (ultravioleta).

5.3 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DO RNA EM NANODROP

A quantificação das amostras foi realizada pela análise de absorbância ultravioleta (UV) a 260 nm em espectrofotômetro Nanodrop que, além de fornecer a quantidade de RNA em cada μ L de amostra, também permite analisar a qualidade das amostras através das razões entre absorbâncias determinadas em 260 e 230 nm (A_{260}/A_{230}) e entre 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}).

5.4 SÍNTESE DO cDNA

Após a quantificação do RNA em Nanodrop, foram calculados os volumes necessários para obtenção de 2 µg de RNA e calculado o volume de água livre de RNase para obtenção de um volume final de 10 µL de RNA para cada amostra. Em seguida, foram preparados os controles positivos e negativos e o RT master mix (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems - Applied Biosystem™) para o número de amostras a serem analisadas, conforme tabela 4:

TABELA 4: PREPARO DOS CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO PARA SÍNTESE DE cDNA.

	COMPONENTE	VOLUME (1 REAÇÃO)	
		CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO
1	10x RT Buffer	2,0 µL	2,0 µL
2	25x NTP Mix (100 mM)	0,8 µL	0,8 µL
3	10X RT Random Primers	2,0 µL	2,0 µL
4	Multi Scribe Reverse Transcriptase	1,0 µL	0 µL
5	Água livre de RNase	4,2 µL	5,2 µL
	Total por reação	10 µL	

FONTE: Laboratório Neoplasias Resistentes à Drogas (LCDR)

Após os cálculos, o master mix foi gentilmente misturado e mantido em gelo. Em tubos devidamente identificados, foram acrescentados os volumes de água livre de RNase calculados para cada amostra com auxílio de micropipeta automática. Em seguida, foram adicionados 10 µL do master mix em cada tudo, seguido das amostras previamente calculadas, sendo que o volume final da reação foi de 20 µL (10 µL de amostra de RNA + 10 µL do master mix). A mistura foi homogeneizada de 2 a 3 vezes e colocadas em “short spin” por 10 segundos. Após homogeneizadas, as amostras foram colocadas no termociclador da Applied Biosystems nas condições indicadas na tabela 5. Ao término do ciclo em termociclador, as amostras poderiam seguir para a RT-qPCR ou poderiam ser congeladas no freezer a -20°C para análise posterior.

TABELA 5: CONDIÇÕES DO TERMOCICLADOR PARA SÍNTESE DO cDNA.

	TEMPERATURA	TEMPO
STEP 1	25°C	10 minutos
STEP 2	37°C	120 minutos
STEP 3	85°C	5 minutos
STEP 4	4°C	∞

FONTE: Applied Biosystems

Ao término do ciclo em termociclador, as amostras poderiam seguir para a RT-qPCR ou poderiam ser congeladas no freezer a -20°C para análise posterior.

5.5 PCR EM TEMPO REAL

Para verificar se as amostras extraídas eram viáveis para análise da expressão gênica, foram selecionadas amostras de mama normal e câncer de mama, de forma aleatória, para amplificação do material genético. As amostras de cDNA selecionadas para câncer de mama foram as amostras AC42, AC62, AC71 e AC148, enquanto as amostras de mama normal foram as amostras AC151, AC161 e AC210. Todas as amostras foram diluídas na concentração de 1:5 com água livre de RNase. Para a realização da RT-qPCR, foram selecionados os primers que amplificam os normalizadores *RPS13*, *YWHAZ* e *HPRT1*, dos quais foram preparados 40 µL das soluções à 1 µM.

Em seguida, em uma placa de 96 poços, foram plaqueados 1 µL de cDNA das amostras diluídas 1:5 AC42, AC62, AC71, AC148, AC151, AC161 e AC210, 2 µL dos primers ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA7, ABCB1, ABCB2, ABCB4, ABCB5, ABCB6, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC10, ABCC11, ABCE1, ABCF2, ABCG1 e ABCG2 e 3 µL do reagente PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems).

Com intuito de evitar a contaminação dos reagentes, primeiro eram adicionados os primers a serem analisados no fundo do poço da placa, seguido das amostras de cDNA no lado esquerdo do poço e por último o reagente PowerUp™ SYBR™ Green

Master Mix ao lado esquerdo dos poços na placa, resultando em um volume final de 6 µL. As placas foram seladas com adesivo óptico da Applied Biosystem, feito spin em centrífuga (MiniSpin – Eppendorf) a 1000 rpm por 2 minutos para homogeneizar o conteúdo e garantir que o mesmo vá para o fundo de cada poço. Em seguida, a placa foi levada ao termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System da Applied Biosystems para análise. O equipamento foi programado conforme as condições para a reação determinadas na tabela 6, por 2 horas. Ao final da corrida, o threshold foi ajustado para 0,1.

TABELA 6: CONDIÇÕES DA RT-qPCR

ESTÁGIO	PASSOS	TEMPERATURA	TEMPO
HOLDING STAGE	Step 1	95°C	10 minutos
CYCLING STAGE	Step 1	95°C	15 segundos
	Step 2	60°C	1 minuto
MELT CURVE STAGE	Step 1	95°C	15 segundos
	Step 2	60°C	1 minuto
	Step 3	95°C	15 segundos

FONTE: Laboratório Neoplasias Resistentes à Drogas (LCDR)

A razão de expressão relativa (*mRNA ratio*) dos 20 genes alvo (tabela 3) foi calculada com base na eficiência do iniciador (E = eficiência do iniciador, considerada 100%, correspondente a 2) e no desvio de C_t (*threshold cycle*) ou C_p (*crossing points*) de uma amostra desconhecida em comparação aos genes de referência (Tabela 2), de acordo com a equação 1 (PFAFFL, 2001). Os níveis de mRNA foram normalizados utilizando *RPS13*, *YWHAZ* e *HPRT1* como genes de referência (GR) pelo software genorm 3.4 (VANDESOMPELE et al., 2002)

$$mRNA\ ratio = \frac{(2)^{\Delta C_t\ Alvo(média\ alvo\ de\ todas\ as\ amostras - alvo\ da\ amostra\ teste)}}{(2)^{\Delta C_t\ referência(média\ dos\ 3\ GR\ de\ todas\ amostras - média\ dos\ 3\ genes\ da\ amostra\ teste)}}$$

Equação 1: cálculo de mRNA ratio, onde GR se refere aos genes de referência

6. RESULTADOS

Durante o período do desenvolvimento desse trabalho, foram coletadas 187 amostras de mama, das quais 90 amostras foram processadas, enquanto as demais amostras permanecem armazenadas no freezer -80°C no Laboratório Neoplasias Resistentes à Drogas (LCDR) para extrações futuras. A tabela 7 mostra quais os tipos de tecidos de mama coletados e a respectiva quantidade de amostras extraídas:

TABELA 7: AMOSTRAS DE MAMA COLETADAS E PROCESSADAS

TIPO DE TECIDO	QUANTIDADE TOTAL (NÚMERO DE AMOSTRAS)	QUANTIDADE EXTRAÍDA (NÚMERO DE AMOSTRAS)
CÂNCER DE MAMA	89	53
MAMA NORMAL	51	23
BIÓPSIA DE MAMA	39	14
METÁSTASE*	7	0
TUMOR DE MAMA BENIGNO	1	0
TOTAL	187	90

FONTE: Laboratório Neoplasias Resistentes à Drogas (LCDR)

LEGENDA: *As amostras identificadas como metástase se referem tecidos metastáticos cujo tumor primário é câncer de mama. Dessas amostras, 1 amostra é referente a metástase axilar, 1 amostra de metástase óssea e 5 amostras de metástase linfonodal.

A idade dos pacientes que tiveram o RNA das amostras extraídos variou entre 23 a 91 anos de idade, com média de 59 anos e mediana de 60 anos. Em relação ao sexo, das 187 amostras, 4 pertenciam à pacientes do sexo masculino, sendo 2 amostras extraídas o RNA. Das 90 amostras analisadas, foi possível realizar a coleta de dados de 61 pacientes, entre eles, tamanho do tumor, estadiamento, resultado da imunohistoquímica, classificação histológica e linha de tratamento utilizada. Desses 61 pacientes, 2 eram do sexo masculino e para 9 pacientes obteve-se uma amostra de mama normal e uma amostra de câncer de mama. Em relação a classificação histológica, 90,16% (55 pacientes) apresentavam carcinoma ductal, sendo 89,09% carcinoma ductal invasivo, 3,63% ductal lobular e 7,27% somente classificados como carcinoma ductal.

Ainda em relação a classificação histológica, 1,64% foram classificados como carcinoma mucinoso invasivo, 1,64% como carcinoma papilífero e 3,28% foram classificados como pouco diferenciados. Os demais tumores não possuíam uma classificação específica. Em relação a classificação molecular, 68,85% dos tumores foram classificados como luminal, 16,40% das amostras foram classificadas como triplo negativo, 6,56% como superexpressão de HER-2 e 8,16% não possuíam classificação definida. Para os tumores classificados como luminais, não foi possível fazer a diferenciação entre luminal A e B pois não havia informações de Ki-67 das amostras.

Ao analisar o estadiamento, observa-se que 9,84% das pacientes apresentavam metástase, 57,38% apresentavam algum grau de acometimento de linfonodos (na classificação TNM, N maior que zero) e 37,7% apresentavam um tumor menor que 50 mm e sem acometimento de linfonodos. Dos dados levantados, 9,84% dos pacientes apresentavam estadiamento IA, 31,15% IIA, 18,03% IIB, 13,11% IIIA, 16,39% IIIB, 1,64% IIIC e 9,84% IV. As características clínicas idade, fase menstrual, tamanho do tumor, classificação histológica, presença de marcadores moleculares e tratamento antineoplásico de cada paciente foram resumidas na tabela 8.

TABELA 8: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

Idade (anos)		
	Faixa	34 a 90 anos
	Média	59 anos
	Mediana	60 anos
Ciclo menstrual		Número de pacientes
	Pré menopausa	17
	Pós menopausa	42
	N/A - sexo masculino	2
Tamanho do tumor (mm)		Número de pacientes
	0 a 50 mm	52
	51 a 100 mm	6
	101 a 150 mm	1
	Lesão extensa (com infiltração de pele e tecidos adjacentes)	2
Classificação histológica		Número de pacientes
	carcinoma ductal invasivo	49
	carcinoma ductal	4
	Carcinoma ducto lobular	2

carcinoma pouco diferenciado	2
Carcinoma mamário sem outra especificação	2
carcinoma papilífero	1
carcinoma mucinoso invasivo	1
Expressão de HER-2 ¹	Número de pacientes
HER-2 ¹ positivo	9
HER-2 ¹ negativo	47
Expressão de RE ²	Número de pacientes
RE ² positivo	42
RE ² negativo	14
Estadiamento TNM	
T1	T1N0M0 6
	T1N1M0 2
T2	T2N0M0 17
	T2N1M0 10
	T2N2M0 3
	T2N3M0 1
T3	T3N0M0 1
	T3N1M0 4
	T3N1M1 1
	T3N2M0 1
T4	T4N0M0 2
	T4N1M0 3
	T4N1M1 1
	T4N2M0 5
	T4N2M1 4
Linhas de tratamento	Número de pacientes
AC ³	22
AC ³ Adjuvante*	6
AC/T ⁴	7
AC ³ + Trastuzumabe	3
AC/T ⁴ + Trastuzumabe	2
AC ³ + TMX ⁶ adjuvante	1
AC ³ + Docetaxel + Trastuzumabe + Pertuzumabe	2
Taxol ⁵	4
Taxol ⁵ adjuvante*	3
TMX ⁶	2
TMX ⁶ adjuvante*	2
CMF ⁷ adjuvante*	3
CMF ⁷ paliativo	1
Sem QT ⁸	3

FONTE: Laboratório Neoplasias Resistentes à Drogas (LCDR)

LEGENDAS: ¹ HER-2 = Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 – Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2

² RE = Receptor de estrogênio

³ AC = Doxorrubicina + ciclofosfamida

⁴ AC/T = Doxorrubicina + ciclofosfamida por 4 ciclos seguido por paclitaxel

⁵ Taxol = Paclitaxel

⁶ TMX = Tamoxifeno

⁷ CMF = Ciclofosfamida + Metotrexato + fluoruracila

⁸ QT = quimioterapia

* Terapia adjuvante se refere ao tratamento realizado após algum procedimento inicial, como por exemplo, mastectomia

Em relação aos resultados quantitativos e qualitativos das amostras extraídas, a integridade do RNA foi avaliada através da presença das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal, sendo que, um RNA íntegro e de qualidade apresenta as duas bandas em uma proporção 2:1 (28S:18S) (WIECZOREK, DELAURIERE e SCHAGAT, 2022). Os resultados dos géis de agarose podem ser encontrados na tabela 9, juntamente com a quantificação por análise espectrofotométrica a 260 nm e avaliação da qualidade das amostras através da quantificação através das razões A260/A230 e A260/A280. Para a maioria das amostras, a concentração de RNA total variou de 0,10 a 5,13 µg/µL. Para os valores de A260/A280 e A260/A230, obtiveram-se médias de 1,87 e 0,79, respectivamente. Das amostras analisadas, 78,8% das amostras apresentaram valores de razão A260/A280 aceitos como puros (entre 1,8 e 2,2), ou seja, sem contaminação com proteínas. Entretanto, 3,3% das amostras apresentaram valores de razão A260/A230 aceitos como puros (próximo de 2). Por isso, apenas 3,3% ficaram dentro das razões tanto para A260/A230 e A260/A280. (IMBEAUD et al., 2005; LAM et al., 2012; MLCOCHOVA et al., 2014).

Para a análise de integridade do RNA, observa-se que 33,3% das amostras apresentaram-se com algum grau de degradação, 6,67% não apareceram no gel e 55,55% apresentavam uma ou duas bandas. Das 55,55% das amostras que apresentavam bandas, 32% (16 amostras) apresentaram as duas bandas bem definidas, 44% (22 amostras) apresentaram bandas mais discretas e com vestígios de degradação ao mesmo tempo e 24% (12 amostras) apresentaram somente a primeira banda bem definida. Para as amostras que apresentaram somente uma banda foi realizada a leitura em Nanodrop para quantificação das mesmas, uma vez que a concentração de ácidos

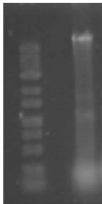
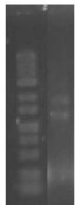
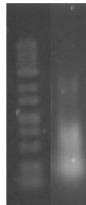
nucléicos poderia estar baixa e, conseqüentemente, influenciar a aparição da segunda banda no gel.

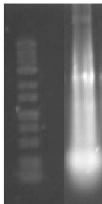
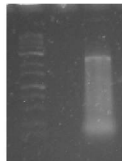
Após a extração de RNA total das amostras, determinação de concentração e da qualidade desse RNA, foi realizada transcrição reversa para obtenção de cDNA de todas as amostras cujo volume calculado para a reação de síntese de cDNA fosse menor que 10 μ L. Esse volume foi definido com base na capacidade de volume da reação. A partir disso, 4 amostras de câncer de mama (AC42, AC62, AC71 e AC148) e 3 amostras de mama normal (AC151, AC161 e AC210) foram selecionadas de forma aleatória para a realização da RT-qPCR. Embora RT-qPCR possa ser utilizada para quantificação absoluta, nesse trabalho foi utilizada para comparar quantidades relativas dos genes alvo em relação aos genes de referência (normalizadores ou endógenos) nas amostras. A normalização das amostras pelos genes de referência tem como objetivo minimizar erros experimentais e normalizar a taxa de expressão dos genes alvo, uma vez que os genes endógenos devem ter expressão estável em diferentes condições a fim de serem usados como referência. Esse é o caso dos genes *RPS13*, *YWHAZ* e *HPRT1* (PFAFFL 2001; PFAFFL, 2006; VANDESOMPELE et al., 2022). Em uma reação de RT-qPCR, o valor do ciclo de quantificação é definido como o número de ciclos necessários para que o sinal fluorescente exceda o ruído basal de fluorescência. O ciclo de quantificação é também conhecido como ciclo de limiar (*Ct*, *threshold cycle*) ou ponto de cruzamento (*Cp*, *crossing point*). Para definir o *Ct*, primeiramente houve a necessidade de definição manual do *threshold* em 0,1 no software de análise. Esse valor de 0,1 corresponde a aproximadamente metade da faixa logarítmica de curva de amplificação. A partir do *threshold*, o ciclo de amplificação (*Ct*) foi determinado para todos os genes em todas as amostras.

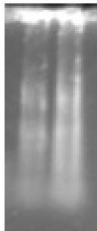
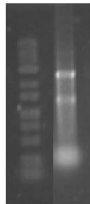
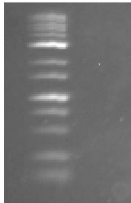
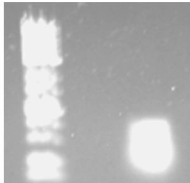
Outro ponto relevante na RT-qPCR é a determinação da eficiência de amplificação (KUANG et al., 2018), que pode ser baseada na curva de concentração de iniciador e cDNA (PFAFFL, 2001). Entretanto, a ausência de detecção do produto amplificado em diluições superiores a 5 vezes impossibilitou a determinação da eficiência, sendo essa considerada de 100% (ou seja, 2) para os cálculos de determinação de expressão gênica. Além disso, reações controle sem o molde de cDNA usando apenas água com todos os iniciadores foram realizadas e não houve amplificação (dados não mostrados). As

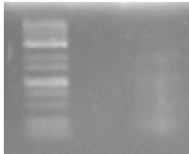
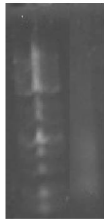
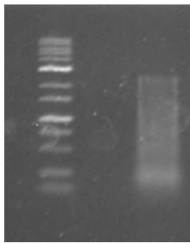
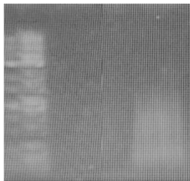
Figuras 6 e 7 demonstram a expressão relativa dos 20 genes que codificam para as proteínas ABC normalizados pelos três genes de referência selecionados para amostras de mama normal e câncer de mama, respectivamente.

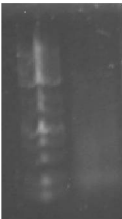
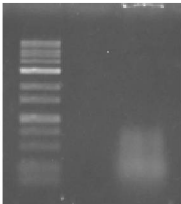
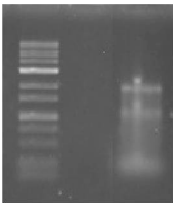
TABELA 9: RESULTADOS QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS DAS EXTRAÇÕES DAS AMOSTRAS DE MAMA

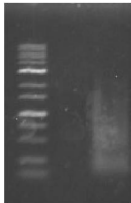
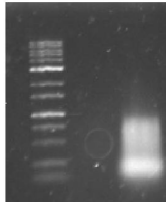
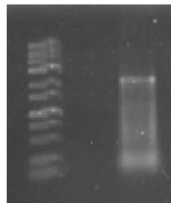
Amostra	Status QT	Tumor	Condições da extração	Observações e dificuldades na extração	[RNA] µg/µL	A260/280	A260/230	Integridade (Gel)	Resultado no gel
AC042	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,4251	1,83	0,78	Duas bandas discretas	
AC049	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,2412	1,79	0,64	Duas bandas discretas	
AC052	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,1823	1,7	0,44	Duas bandas discretas	
AC062	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,2232	1,81	0,52	Degradado	

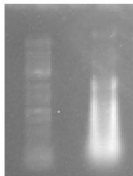
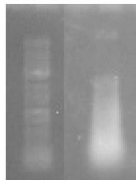
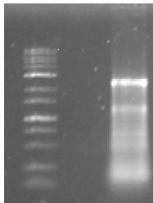
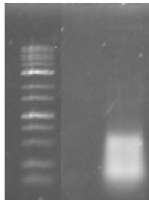
AC071	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	4,9981	1,99	1,45	Duas bandas definidas	
AC103	-	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	*contaminada - contaminou com amostra AC116	0,2071	1,75	0,42	Duas bandas discretas	
AC114	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador	Amostra grande, demorou para romper	1,9785	2,01	1,82	Somente uma banda definida	
AC116	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	*contaminada - contaminou com amostra AC103	0,1833	1,73	0,42	Degradado	

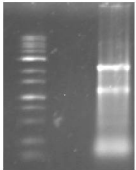
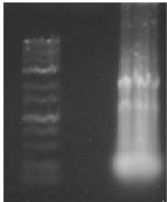
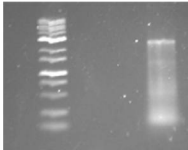
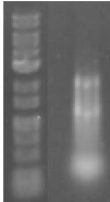
AC118	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,19	1,7	0,38	Duas bandas discretas	
AC118	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,3182	1,83	0,57	Duas bandas definidas	
AC122	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido fino, "dividido" no meio, mais difícil de triturar	0,0227	1,65	0,16	Não apareceu no gel	
AC130	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Demora para triturar (beads solta fio nylon)	0,2434	1,91	0,91	Degradado	

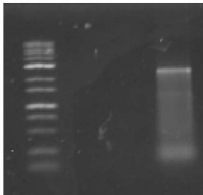
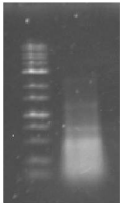
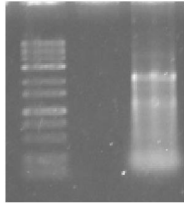
AC131	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,1641	1,78	0,45	Duas bandas discretas	
AC132	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,3849	1,85	0,61	Duas bandas discretas	
AC136	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + triturator + 2 beads 7 mm	Tecido gorduroso, rompeu bem	0,1064	1,98	0,72	Somente uma banda definida	
AC144	PRÉ	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,6794	2,02	0,58	Degradado	

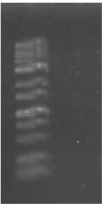
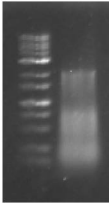
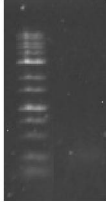
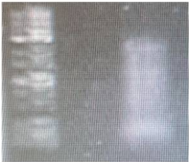
AC146	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,4837	1,89	0,82	Duas bandas discretas	
AC148	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,4616	1,83	0,71	Duas bandas discretas	
AC150	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido gorduroso, demorou para romper	0,1794	1,86	0,53	Degradado	
AC151	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Pouca gordura, triturou rápido	0,2921	1,88	0,52	Duas bandas discretas	

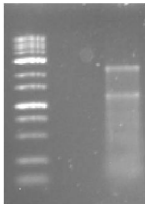
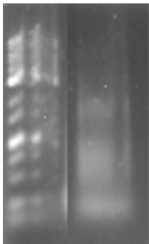
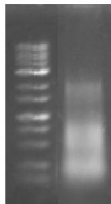
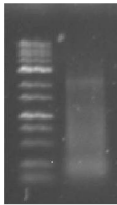
AC161	PRÉ	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,0824	1,88	0,54	Degradado	
AC166	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,3806	1,69	0,58	Duas bandas discretas	
AC172	PRÉ	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido bem fibroso, não rompeu	0,7413	2,01	1,64	Degradado	
AC175	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra bem grande, enroscou na haste, não triturou bem	0,1848	1,76	0,41	Somente uma banda definida	

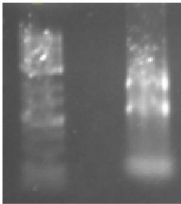
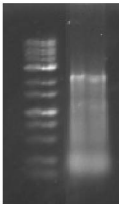
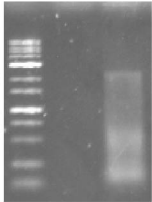
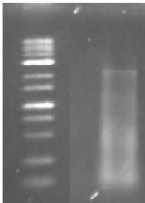
AC180	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + Triturador	-	0,2673	1,94	0,9	Não apareceram bandas	
AC180	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + Triturador	Aquecida - heat block	0,4397	1,94	0,95	Não apareceram bandas	
AC183	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,3982	1,94	1,08	Duas bandas definidas	
AC184	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido gorduroso, triturou bem, contaminação com haste da AC183	0,3807	1,94	1,04	Degradado	
AC187	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	1,2931	1,95	0,83	Degradado	

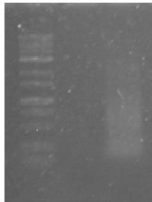
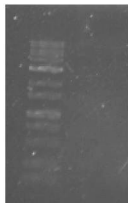
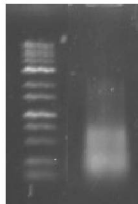
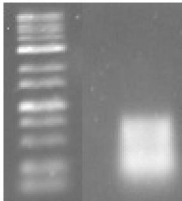
AC188	PRÉ	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra grande, dificuldade para triturar	0,4441	1,93	0,91	Duas bandas definidas	
AC196	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	4,0319	1,95	1,21	Duas bandas definidas	
AC209	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador	-	0,1945	1,75	0,49	Duas bandas definidas	
AC210	PRÉ	MAMA SADIA	TRizol + Triturador	-	0,300	1,79	0,57	Duas bandas definidas	

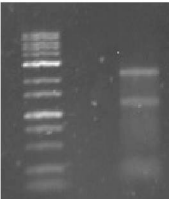
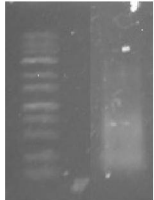
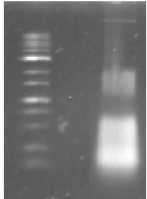
AC212	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra grande, bastante gordura, rompeu bem	0,1897	1,83	0,44	Duas bandas definidas	
AC215	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra grande, demorou para triturar	0,3632	1,86	0,92	Duas bandas discretas	
AC231	-	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador	Dificuldades na parte da secagem, pellet não aderiu no tubo, não retirado todo o etanol (30 minutos), não secado "completamente" o etanol	0,3732	1,9	0,6	Duas bandas definidas	
AC232	-	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido gorduroso e bem pequeno	0,2255	1,83	0,45	Degradado	

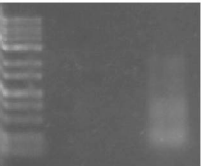
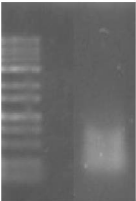
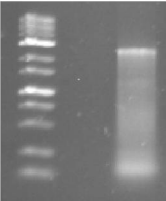
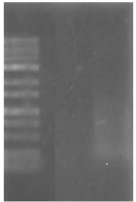
AC233	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido minúsculo, triturado bem	0,0394	1,62	0,21	Não apareceu no gel	
AC242	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,3918	1,9	0,79	Duas bandas discretas	
AC244	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra bem pequena e triturou bem	0,0545	1,64	0,21	Degradado	
AC252	-	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,2534	1,84	0,46	Degradado	

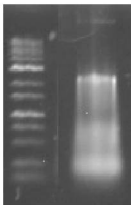
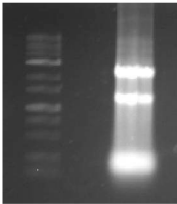
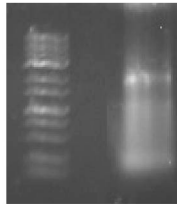
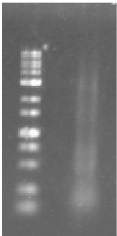
AC258	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra pequena e fina	0,1293	1,88	0,73	Duas bandas definidas	
AC259	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,3738	1,91	0,64	Duas bandas discretas	
AC265	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra fina e pequena, triturou bem	0,3592	1,85	0,64	Degradado	
AC266	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra sem gordura e bem pequena	0,1197	1,83	0,53	Somente uma banda definida	

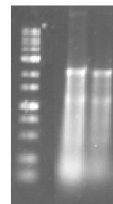
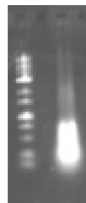
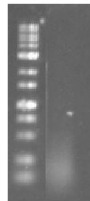
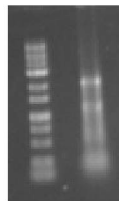
AC270	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,4336	1,85	0,67	Degradado	
AC272	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra grande e gordurosa, triturou bem	0,4071	1,92	0,96	Somente uma banda definida	
AC276	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido bem fino	0,2755	1,93	0,8	Somente uma banda definida	
AC282	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra fina, demorou um pouco mais pra triturar	0,1558	1,91	1,12	Somente uma banda definida	

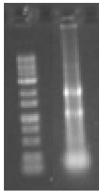
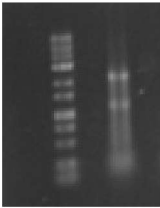
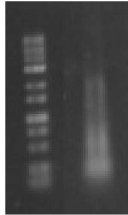
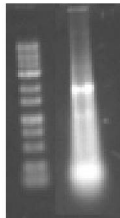
AC283	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador	Amostra bem fina, fibrosa, praticamente não triturou, não formou pellet durante a extração	0,0812	1,81	0,3	Degradado	
AC287	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador	Não formou pellet durante a extração, dificuldades pois era uma amostra bem fina e pequena	0,1348	1,62	0,24	Não apareceu no gel	
AC288	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	As amostras sem gordura mas bem pequenas	0,312	1,84	0,72	Degradado	
AC289	PRÉ	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,2628	1,76	0,53	Degradado	

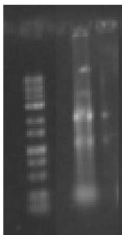
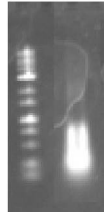
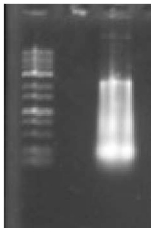
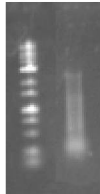
AC291	PRÉ	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,0804	1,86	0,58	Duas bandas definidas	
AC297	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador	Amostra grande, com bastante conteúdo gorduroso , demorou para romper (2 min)	0,3386	1,84	0,58	Degradado	
AC298	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra grande não trituraram muito bem, fios de nylon soltaram	0,7034	1,94	0,86	Degradado	
AC299	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido fibroso, não tinha gordura mas não rompeu, trocado de haste pois o fio da primeira haste soltou	0,0187	1,89	0,38	Não apareceu no gel	

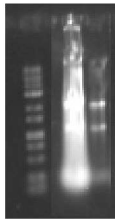
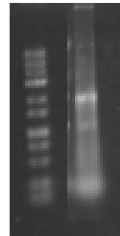
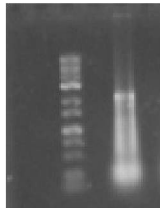
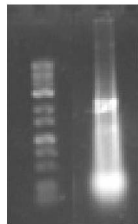
AC300	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostras bem pequenas com dificuldade para romper tecido	0,2335	1,89	0,6	Degradado	
AC304	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostras bem pequenas com dificuldade para romper tecido	0,2477	1,74	0,44	Degradado	
AC305	PRÉ	BIÓPSIA DE MAMA	TRizol + Triturador	-	0,2825	1,85	0,79	Somente uma banda definida	
AC308	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostras bem pequenas com dificuldade para romper tecido	0,1299	1,85	0,4	Duas bandas discretas	

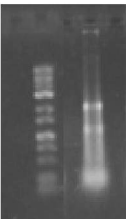
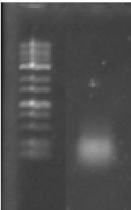
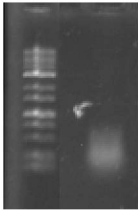
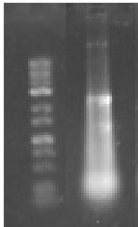
AC312	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,6752	1,97	1,15	Somente uma banda definida	
AC315	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador	-	5,1264	1,88	1,72	Duas bandas definidas	
AC316	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,9754	1,81	0,72	Duas bandas discretas	
AC359	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,1104	1,74	0,34	Degradado	

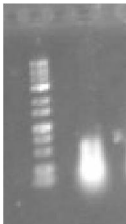
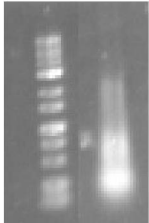
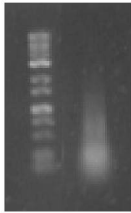
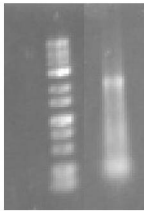
AC368	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Amostra grande. Enroscou na haste, gordurosa	0,4873	1,96	1,34	Duas bandas definidas	
AC369	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Não triturou bem	-	-	-	Degradado	
AC382	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido pequeno, não triturou bem	0,0997	1,8	0,36	Degradado	
AC384	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido pequeno e duro, não triturou bem; depois de 30 segundos, amostra saiu do tubo	0,1399	1,92	0,67	Duas bandas definidas	

AC390	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Triturou pouco, tecido ficou preso no fundo do tubo	1,277	1,9	0,89	Duas bandas definidas	
AC392	PRÉ	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Triturou bem	0,6343	1,93	1,22	Duas bandas definidas	
AC393	PRÉ	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido bem pequeno, como se fosse biopsia. Não triturou bem.	0,9464	1,94	1,07	Degradado	
AC406	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Triturou pouco	1,5431	1,97	1,34	Somente uma banda definida	

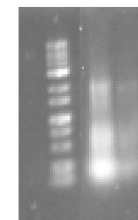
AC463	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido médio, triturou bem.	0,4093	1,91	0,77	Duas bandas definidas	
AC467	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido fino, característico de biópsia; triturou bem	-	-	-	Degradado	
AC471	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Nao triturou bem	2,4764	1,97	1,53	Somente uma banda definida	
AC479	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Triturou bem	-	-	-	Degradado	

AC480	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido muito grande, triturou bem. Usado 4 ml de trizol e reconstituído para 40 ul	4,4400	2,04	1,92	Duas bandas definidas	
AC499	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Triturou bem; tecido grande. Usado 2 ml de trizol	0,8802	1,91	0,97	Duas bandas discretas	
AC504	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,5618	1,89	1,13	Somente uma banda definida	
AC507	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	1,2415	1,96	1,33	Somente uma banda definida	

AC509	PÓS	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,3521	1,95	0,96	Somente uma banda definida	
AC511	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Nao triturou bem	0,1047	1,9	0,57	Degradado	
AC519	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Não triturou bem	0,3247	1,91	0,76	Degradado	
AC527	-	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	1,9544	2	1,59	Somente uma banda definida	

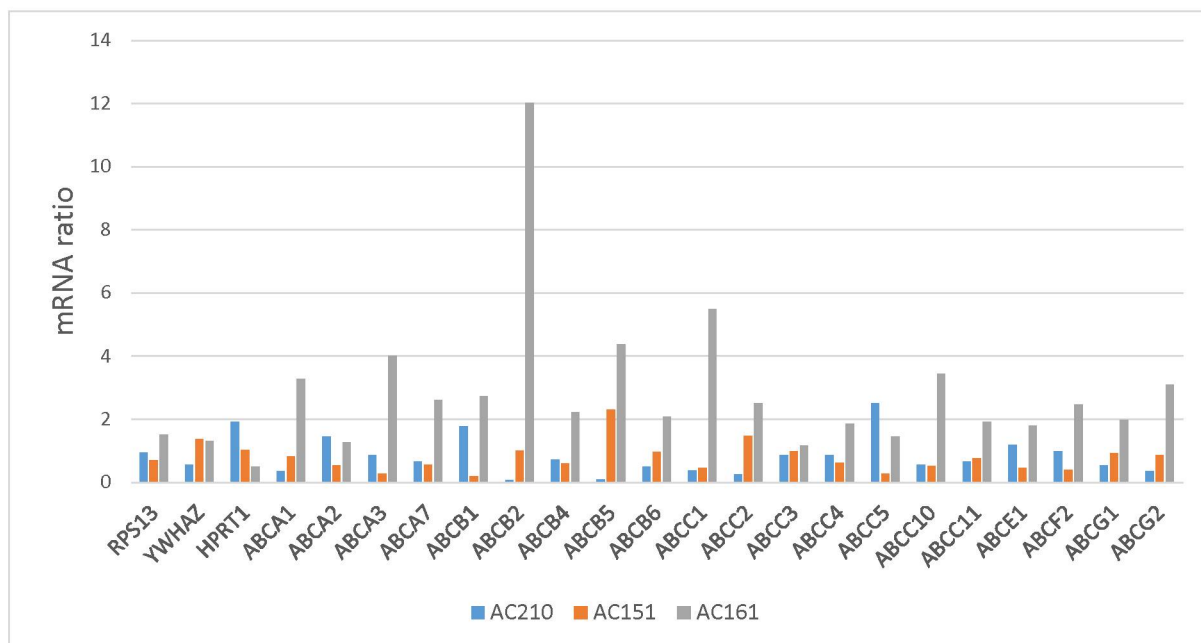
AC533	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido azulado, triturou bem	0,4525	1,95	1,2	Degradado	
AC538	-	MAMA SADIA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Tecido gorduroso, triturou bem	0,3432	1,91	1,05	Duas bandas discretas	
AC539	PRÉ	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	-	0,3993	1,92	0,89	Degradado	
AC606	PÓS	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Biópsia; não triturou bem	0,2757	1,9	0,75	Somente uma banda definida	

AC617	-	CÂNCER DE MAMA	TRizol + Triturador + 2 beads 7 mm	Biópsia; não triturou bem	0,5335	1,9	1,11	Duas bandas discretas
--------------	---	----------------------	--	------------------------------	--------	-----	------	--------------------------



FONTE: Laboratório Neoplasias Resistentes à Drogas (LCDR)

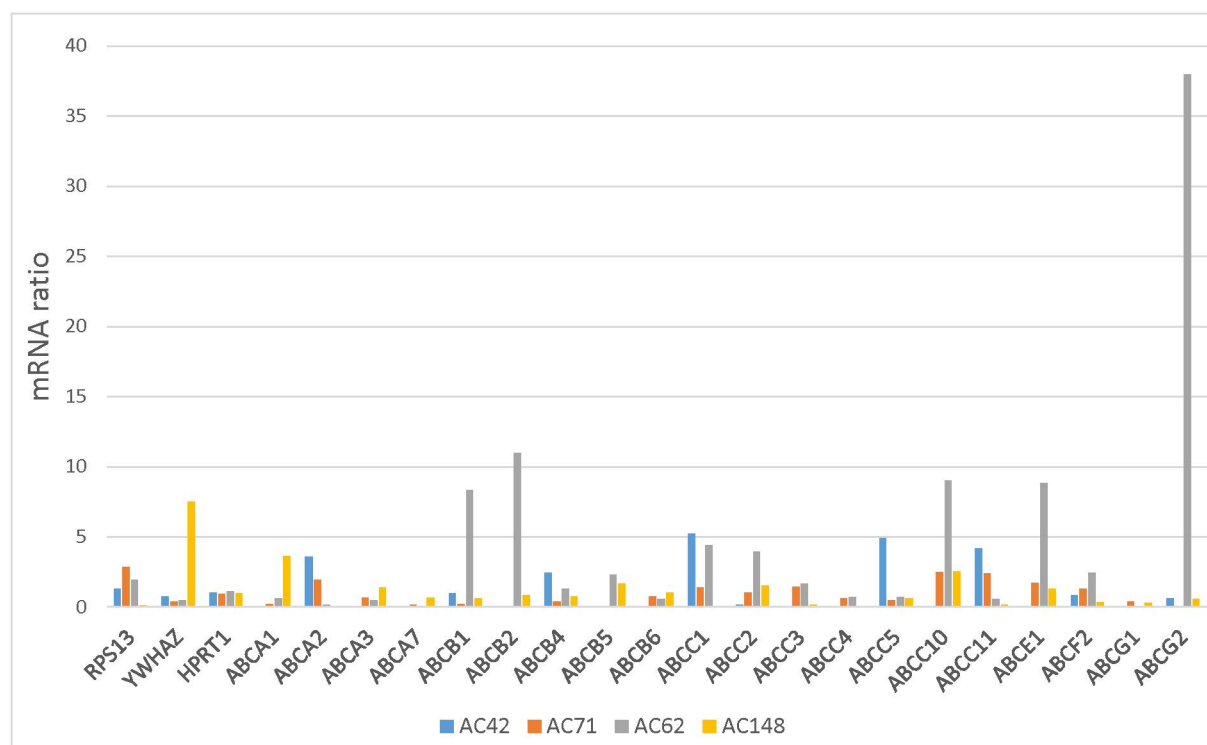
FIGURA 6 - mRNA ratio por RT-PCR das amostras de mama saudáveis.



FONTE: Laboratório Neoplasias Resistentes à Drogas (LCDR)

LEGENDA: Os valores de razão de mRNA foram determinados através do cálculo entre valores de eficiência da RT-PCR e os valores de Ct para cada amostra, conforme a equação $\text{mRNA ratio} = (2)^{\Delta C_t} \text{alvo} / (2)^{\Delta C_t \text{referência}}$, onde $\Delta C_t \text{alvo} = (\text{média alvo de todas as amostras} - \text{alvo da amostra teste})$ e $\Delta C_t \text{referência} = (\text{média dos 3 genes de referência de todas as amostras} - \text{média dos 3 genes da amostra teste})$.

FIGURA 7- mRNA ratio por RT-PCR das amostras de câncer de mama.



FONTE: Laboratório Neoplasias Resistentes à Drogas (LCDR)

LEGENDA: Os valores de razão de mRNA foram determinados através do cálculo entre valores de eficiência da RT-PCR e os valores de Ct para cada amostra, conforme a equação $\text{mRNA ratio} = (2)^{\Delta C_t} \text{alvo} (\text{média alvo de todas as amostras} - \text{alvo da amostra teste}) / (2)^{\Delta C_t} \text{referência} (\text{média dos 3 genes de referência de todas as amostras} - \text{média dos 3 genes da amostra teste})$

7. DISCUSSÃO

A análise de expressão gênica tem crescido na prática clínica, especialmente na oncologia, permitindo uma melhor análise do perfil molecular dos diferentes tumores, incluindo a análise do perfil de resistência às drogas. A utilização da expressão gênica pode auxiliar na descoberta e padronização de novos biomarcadores, tanto preditivos, quanto prognósticos e até mesmos biomarcadores de resistência a terapias. No entanto, vários fatores influenciam a qualidade de uma análise de expressão gênica, sendo a principal delas a qualidade e quantidade do RNA utilizado (LOCY et al., 2021; NARRANDES, XU; 2018).

A grande maioria dos exemplos na literatura utiliza blocos de parafina para análise de imunohistoquímica e para armazenamento dessas amostras a longo prazo, uma vez que o uso de blocos de parafina permite a preservação das proteínas (NARRANDES, XU; 2018). Entretanto, quando se trata de extração de RNA para análise de expressão gênica, as amostras em bloco de parafina muitas vezes não são adequadas pois o RNA pode ser degradado muito facilmente, tanto antes quanto durante e após o processo de fixação na parafina, devido sua instabilidade, além do dano que a própria formalina pode causar ao RNA das amostras. (SAMADANI et al., 2015; LOCY et al., 2021).

A extração de RNA de tecidos frescos e congelados permite uma melhor análise do perfil de expressão gênica quando comparado as amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (SAMADANI et al., 2015; LOCY et al., 2021). No entanto, o uso dessas amostras acaba tendo seu uso limitado devido a dificuldades na padronização de extração e análise, além das dificuldades relacionadas a coleta da amostra, ao tamanho da amostra e padronização do tamanho para análise, transporte e levantamento de dados clínicos e padronização dos dados clínicos (NARRANDES, XU; 2018).

Apesar de alguns protocolos para extração de RNA estarem descritos em literatura, há uma dificuldade de padronização na técnica, uma vez que mesma pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a própria técnica de extração e as técnicas de coleta, transporte e armazenamento de amostras. Diferenças presentes nas próprias amostras, como tamanho, tipo de tecido, também influenciam extração, a quantidade, a integridade e qualidade desse RNA (SAMADANI et al., 2015; LOCY et al., 2021). O RNA costuma ser menos estável e mais reativo que o DNA devido à

estrutura da ribose, que possui grupamento hidroxila nos carbonos 2' e 3' da ribose, conferindo uma maior reatividade a molécula, quando comparado ao DNA e uma maior susceptibilidade as enzimas que degradam RNA, as RNases (GREEN e SAMBROOK, 2019).

Durante as extrações das amostras de RNA total por TRIzol, observou-se uma maior dificuldade na extração de amostras pequenas, especialmente em amostras de biópsias por punção aspirativa por agulha fina (PAAF). As amostras de biópsia por PAAF possuíam a característica de serem extremamente finas e o tecido pequeno, com uma média de tamanho de 1 cm, com diâmetro em torno de 0,1 a 0,2 cm e peso aproximado de 50 mg, enquanto as amostras de tecido variavam de 0,5 a 1 cm de diâmetro e peso de aproximadamente 100 mg. Para todas as amostras de biópsia por PAAF não foi necessário mais do que 1 mL de TRIzol para o processo de extração. Além disso, por serem pequenas e finas, as amostras ficavam presas nos fios de nylon da haste, sendo necessário interromper o rompimento em vários momentos para soltar a amostra e voltar a triturá-la, o que interfere na qualidade da extração uma vez que não se recomenda manter a amostra por mais de um minuto no triturador devido ao aumento da degradação da amostra. Por fim, por serem amostras pequenas, as esferas (beads) utilizadas para otimizar a extração acabavam escapando do tubo de falcon, o que também reduzia a qualidade da extração das amostras.

Outra dificuldade em relação as amostras de biópsia por PAAF ou amostras pequenas (com menos de 0,5 cm) foi em relação a característica da amostra - caso a amostra tivesse uma característica mais fibrosa, tornava-se mais difícil ainda a extração dessa amostra. Para amostras maiores, especialmente aquelas que utilizaram mais de 1 mL de TRIzol, a extração tornava-se mais fácil pois o contato entre amostra, fios de nylon da haste e as beads era maior, facilitando a trituração. Por outro lado, a grande maioria dos tecidos grandes, que necessitavam de mais TRIzol durante a extração, apresentavam uma característica mais gordurosa, conforme mencionado na tabela 9, sendo que, em alguns casos, após a primeira centrifugação durante a extração, mais da metade do conteúdo era gorduroso e não era utilizado para o resto do procedimento da extração. Alguns estudos mostram que as características dos tecidos, entre elas tamanho e tipo de tecido, influenciam na qualidade da extração e no rendimento do RNA ao final da extração (SAMADANI et al., 2015; LOCY et al., 2021).

Além da quantidade de RNA obtido pelas amostras, especialmente amostras pequenas, outro ponto a ser considerado durante o processo é a integridade do RNA. A integridade do RNA é fundamental para permitir a análise do mesmo através de técnicas como RT-qPCR, microarranjo (microarrays). A análise do RNA extraído por meio de gel de agarose permite com que a integridade e qualidade do material extraído seja avaliado com base na separação dos diferentes tamanhos de fragmentos do ácido nucléicos, sendo que os fragmentos maiores se deslocam mais lentamente quando comparados aos fragmentos menores. Esses fragmentos são corados com corantes, geralmente intercalantes de RNA ou DNA, como por exemplo, o brometo de etídio, que podem estar presentes diretamente no gel ou podem ser aplicados no gel após o término da corrida. A ligação entre o agente intercalante e o ácido nucléico, quando excitado, emite a fluorescência que permite a leitura dos géis em transiluminador UV. Para um RNA íntegro, o gel de agarose apresentará duas bandas, correspondentes aos fragmentos 18S e 28S do RNA ribossomal. A razão 2:1 entre os fragmentos (28S:18S) também caracteriza um RNA de boa qualidade. Além disso, a intensidade da fluorescência das bandas é proporcional a quantidade de ácidos nucléicos presentes na amostra. Caso não seja possível ver as duas bandas, é um alto indicativo de degradação do RNA. (WIECZOREK, DELAURIERE e SCHAGAT, 2022; Invitrogen, 2019; MASOTTI e PRECKEL, 2006).

Nos resultados observados na tabela 9, pode-se observar que muitas amostras (37,78%) apresentaram algum grau de degradação quando visualizadas no gel pois não apresentaram as duas bandas 18S e 28S bem definidas. A degradação das amostras pode ocorrer por diversos fatores: presença de RNases nos equipamentos ou reagentes, longo período de armazenamento em nitrogênio líquido ou freezer - 80°C (devido à pandemia da COVID-19, algumas amostras foram armazenadas por mais de um ano), demora no rompimento das amostras e demora no processo de extração de modo geral, levando a amostra a ficar longos períodos fora do gelo.

Como mencionado anteriormente, a contaminação das amostras por enzimas RNases é uma das principais dificuldades e um dos principais fatores que pode influenciar a extração, a quantidade e a qualidade da extração de RNA (SAMADANI et al., 2015; LOCY et al., 2021). As RNases são enzimas importantes no metabolismo dos ácidos nucléicos tanto em células eucariotas quanto procariotas. Essas enzimas são onipresentes, podendo ser encontradas em todas as células, na saliva, na transpiração, na pele e também em superfícies inanimadas, como superfícies de

bancadas, equipamentos (centrífugas, aparelhos de eletroforese, etc), partículas no ar, vidrarias, etc. A estrutura das RNases, de modo geral, é composta por inúmeros resíduos de cisteína, que permite com que essa enzima forme ligações dissulfídicas, o que confere uma alta resistência a essa estrutura, sendo resistente a baixas temperaturas e também a autoclave. A presença de qualquer resquício de RNase já é suficiente para comprometer a integridade do RNA e degradar o mesmo (GREEN e SAMBROOK, 2019; Invitrogen, 2019; WIECZOREK, DELAURIERE e SCHAGAT, 2022).

Uma das estratégias utilizadas para que a degradação das amostras fosse reduzida, foi a rotina para autoclavar e para utilizar os materiais e reagentes e optou-se por extrair poucas amostras por vez para evitar que as amostras ficassem muito tempo fora do freezer, o que melhorou a qualidade das extrações ao longo do tempo. Além disso, quando a amostra apresentava somente uma banda definida, o que ocorreu para 12 amostras, era realizada a leitura em nanodrop, uma vez que o não aparecimento da segunda banda poderia estar relacionado com a baixa concentração da amostra durante a corrida no gel.

A quantificação das amostras foi realizada pela análise de absorbância UV a 260 nm espectrofotômetro Nanodrop e a análise de qualidade foi feita através das razões de absorbância no mesmo equipamento, A260/A230 e A260/A280.

Conforme mencionado nos resultados, para as amostras extraídas, os valores de A260/A280 e A260/A230 obtiveram médias de 1,87 e 0,79, respectivamente, indicando que o processo de extração não resultou em contaminações significativas por proteínas pois ficou entre a razão esperada pela literatura (IMBEAUD et al., 2005; LAM et al., 2012; MLCOCHOVA et al., 2014). No entanto, os valores de razão A260/A230 foram abaixo do que a literatura considera como puro (próximo de 2) (IMBEAUD et al., 2005; LAM et al., 2012). Entretanto, não há consenso sobre o limite inferior aceitável da razão A260/A230. Possíveis candidatos que podem aumentar a absorbância a 230 nm incluem sais, carboidratos, peptídeos e fenol ou compostos aromáticos em geral. O aumento da absorbância a 230 nm em amostras de RNA é quase sempre devido à contaminação com tiocianato de guanidina. O reagente comercial TRIzol utilizado para todas as extrações do RNA total é uma solução monofásica contendo isotiocianato de guanidina e fenol. Embora o fabricante Invitrogen não forneça a concentração final do isotiocianato de guanidina presente no reagente TRIzol, o artigo que inicialmente desenvolveu o método para isolamento de

RNA com uma mistura ácida de tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio descreve a concentração de 4 M de tiocianato de guanidina (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987). Isso pode resultar em contaminação com tiocianato de guanidina após resuspensão do pellet de RNA com água. De qualquer forma, foi demonstrado que a contaminação por tiocianato de guanidina mostrou não interferir nas aplicações moleculares subsequentes até 100 mM em amostras de RNA (QIAGEN, 2018). Portanto, a análise subsequente de RNA foi realizada por RT-qPCR com a necessidade prévia de transcrição reversa para obtenção de cDNA a fim de que a expressão de transcritos que codificam para os transportadores ABC bem como normalizadores pudesse ser determinada.

Verificou-se que foi possível identificar a expressão dos genes ABC de interesse, tanto nas amostras de mama normal, quanto nas amostras de câncer de mama. Nas amostras de mama normal, observou-se a expressão de todos os 20 genes de interesse, enquanto a literatura relata que os genes *ABCA7*, *ABCB4*, *ABCB5*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5* e *ABCC11* não são comumente expressos em células de mama normal (MODI et al., 2022). Já em relação as amostras de câncer de mama, observou-se que os genes da subfamília ABCA, genes *ABCB2*, *ABCB5*, *ABCB6*, *ABCC3*, *ABCC4* e *ABCG1* não foram expressos em algumas das amostras, não sendo igual o perfil de expressão entre os tumores. Por outro lado, estudos demonstram que as proteínas *ABCA1*, *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCB2*, *ABCC4* e *ABCG1* podem ser encontrados expressos em diferentes amostras de tumor de mama (MODI et al., 2022). Essa variação do perfil de expressão entre as amostras pode ser justificada pela heterogeneidade das amostras (BRAAKMAN et al., 2015) e que podem diferir dependendo, por exemplo, do estadiamento da doença, da expressão de receptores hormonais e receptores do fator de crescimento epidérmico, das linhas de tratamentos e da idade das pacientes (WIND, HOLEN; 2011). Um grupo maior de amostras e sua correlação com os dados clínicos das pacientes deve ser avaliado para que possa ser estabelecida uma relação entre os genes expressos e o perfil de resistência às drogas nessas pacientes.

A falta de uma padronização dos métodos para extração, quantificação e análise dos transportadores ABC em tumores sólidos dificulta a comparação da expressão desses genes em diferentes tecidos. Além disso, as dificuldades na coleta, transporte e armazenamento dessas amostras acaba sendo um fator limitante nas análises (WIND, HOLEN; 2011; VERMA, 2012; NARRANDES e XU, 2018; NOUVEL

et al., 2021). Os estudos em tumores de mama com análise de tumores frescos são escassos na literatura. A grande maioria dos estudos utilizam a imunohistoquímica como técnica para análise de expressão e, na maioria das vezes, as amostras utilizadas são amostras em blocos de parafina (WIND, HOLEN; 2011; SAMADANI et al., 2015; NARRANDES e XU, 2018; LOCY et al., 2021). O método de extração apresentado nesse trabalho permitiu a extração do RNA das amostras e posterior amplificação do cDNA por RT-qPCR. Desse modo, observa-se que o método apresentado nesse trabalho foi eficiente para analisar a expressão desses transportadores em amostras de mama, porém, é necessário a correlação das amostras com as características clínicas das pacientes, além de um maior número de amostras para reduzir a variabilidade entre os tecidos e garantir a reprodutibilidade dos resultados.

8. CONCLUSÃO

A análise da expressão gênica em tecidos frescos permite uma maior compreensão dos mecanismos fisiológicos e patológicos nas células, além de caracterizar com maior especificidade o perfil de expressão de proteínas nas células. Além disso, uma análise da expressão gênica de diferentes amostras pode permitir a caracterização de novos biomarcadores tumorais, tanto preditivos quanto prognósticos.

As proteínas da família ABC desempenham um importante papel fisiológico no organismo e têm ganhado importância na oncologia, especialmente nos tumores resistentes às drogas. A padronização de um método de extração de RNA total e análise de expressão dos genes que codificam para essas proteínas em diferentes tecidos é de grande importância na determinação de MDR clínica em pacientes com câncer e na caracterização dessas proteínas como possíveis biomarcadores tumorais.

Com esse estudo foi possível concluir que a extração de amostras recém coletadas e congeladas, tanto no freezer -80°C quanto no nitrogênio líquido, resultou em RNAs íntegros e com capacidade de serem amplificados para demonstrar o perfil de expressão gênica do tecido. No entanto, a técnica ainda precisa de melhorias quanto a contaminação por compostos fenólicos e otimização da RT-qPCR. A técnica mostrou-se adequada para a extração de RNA e para análise do perfil de expressão dos transportadores ABC em amostras de mama, tanto saudáveis quanto tumorais. Em estudos futuros, será possível comparar os níveis de expressão gênica entre amostras saudáveis e amostras tumorais, comparar o perfil dos pacientes em relação a presença dos transportadores ABC e determinar uma relação dos transportadores ABC como biomarcadores preditivos e prognósticos em pacientes oncológicos.

REFERÊNCIAS

- ABERUYI, N.; RAHGOZAR, S.; GHODOUSI, E. S.; GHAEDI, K. Drug Resistance Biomarkers and Their Clinical Applications in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 2020.
- ADAMSKA, A.; DOMENICHINI, A.; CAPONE, E.; et al. Pharmacological inhibition of ABCC3 slows tumour progression in animal models of pancreatic cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 312, p. 1–14, 2019.
- ALLIKMETS, R.; GERRARD, B.; HUTCHINSON, A.; DEAN, M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 10, p. 1649–1655, 1996.
- ANDOLFO, I.; ALPER, S. L.; DELAUNAY, J.; et al. Missense mutations in the ABCB6 transporter cause dominant familial pseudohyperkalemia. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 1, p. 66–72, 2012.
- ANILLO, T.; SHULENIN, S.; CHEN, Z. Q.; et al. Identification and characterization of a novel ABCA subfamily member, ABCA12, located in the lamellar ichthyosis region on 2q34. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 98, p. 167–176, 2002.
- ARMSTRONG, N. et. al. A systematic review of the international prevalence of BRCA mutation in breast cancer. **Clinical Epidemiology**, v. 11, p. 543–561, 2019.
- ARONSON, J. K.; FERNER, R. E. **Biomarkers - A General Review**. Current Protocols in Pharmacology, v. 76, p. 9.23.1–9.23.17, 2017.
- BAN, N.; MATSUMURA, Y.; SAKAI, H.; et al. ABCA3 as a Lipid Transporter in Pulmonary Surfactant Biogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9628–9634, 2007.
- BAO, L.; WU, J.; DODSON, M.; 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.
- BARBET, R.; PEIFFER, I.; HUTCHINS, J. R. A.; et al. Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells: Possible role of ABC plasma membrane transporters in maintaining human stem cell pluripotency. **Cell Cycle**, v. 11, n. 8, p. 1611–1620, 2012.
- BERA, T. K.; LEE, S.; SALVATORE, G.; LEE, B.; PASTAN, I. MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. **Molecular Medicine**, v. 7, n. 8, p. 409–416, 2001.

BISWAS, R.; BUGDE, P.; HE, J.; et al. Transport-mediated oxaliplatin resistance associated with endogenous overexpression of MRP2 in Caco-2 and PANC-1 cells. **Cancers**, v. 22, n.1330, p. 1-17, 2019.

BOONSTRA, R.; KOLK, D. M. VAN DER; BERG, A. VAN DEN; JONG, B. DE. 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, F.; HAN, R.; VISSER, A.; 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, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJNHOLDS, J. A family of drug transporters: the multidrug-resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, p. 1295–1302, 2000.

BRAAKMAN, R. B. H.; BEZSTAROSTI, K; SIEUWERTS, A. M.; DE WEERD V; et al. Integrative analysis of genomics and proteomics data on clinical breast cancer tissue specimens extracted with acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform. **Journal of Proteome Research**, v.14, p.1627-1636, 2015

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BROCCARDO, C.; OSORIO, J.; LUCIANI, M.; et al. Comparative analysis of the promoter structure and genomic organization of the human and mouse ABCA7 gene encoding a novel ABCA transporter. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 92, p. 264–270, 2001.

BURGER, H.; FOEKENS, J. A.; LOOK, M. P.; 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.

CALCAGNO, A. M.; FOSTEL, J. M.; TO, K. K. W.; et al. Single-step doxorubicin-selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes. **British Journal of Cancer**, v. 98, n. 9, p. 1515–1524, 2008.

CANDEIL, L.; GOURDIER, I.; PEYRON, D.; et al. ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. **International Journal of Cancer**, v. 109, n. 6, p. 848–854, 2004.

CAROZZO, A.; YANEF, A.; GÓMEZ, N.; et al. Identification of MRP4/ABCC4 as a Target for Reducing the Proliferation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells by Modulating the cAMP Efflux. **Molecular Pharmacology**, v. 96, p. 13-25, 2019.

CESANO, A; WARREN, S. Bringing the Next Generation of Immuno-Oncology Biomarkers to the Clinic. **Biomedicines**, v.6, n. 14, 2018.

CHAPUY, B.; KOCH, R.; RADUNSKI, U.; et al. Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. **Leukemia**, v. 22, p. 1576–1586, 2008.

CHAPUY, B.; PANSE, M.; RADUNSKI, U.; 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, 2009.

CHEN, K. G.; SZAKÁCS, G.; ANNÉREAU, J. P.; et al. Principal expression of two mRNA isoforms (ABCB5 α and ABCB5 β) of the ATP-binding cassette transporter gene ABCB5 in melanoma cells and melanocytes. **Pigment Cell Research**, v. 18, n. 2, p. 102–112, 2005.

CHEN, Y. H.; CIMINO, P. J.; LUO, J.; DAHIYA, S.; GUTMANN, D. H. ABCG1 maintains high-grade glioma survival in vitro and in vivo. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 23416–23424, 2016a.

CHEN, Y. L.; CHEN, P. M.; LIN, P. Y.; HSIAU, Y. T.; CHU, P. Y. ABCG2 overexpression confers poor outcomes in hepatocellular carcinoma of elderly patients. **Anticancer Research**, v. 36, n. 6, p. 2983–2988, 2016b.

CHEN, Z.; DONG, J.; ISHIMURA, A.; et al. The Essential Vertebrate ABCE1 Protein Interacts with Eukaryotic Initiation Factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 11, p. 7452–7457, 2006.

CHEN, Z.; LEE, K.; WALTHER, S.; et al. Analysis of Methotrexate and Folate Transport by Multidrug Resistance Protein 4 (ABCC4): MRP4 Is a Component of the Methotrexate Efflux System. **Cancer Research**, v. 62, n. 34, p. 3144–3150, 2002.

CHEN, Z. S.; HOPPER-BORGE, E.; BELINSKY, M. G.; et al. Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 351–358, 2003.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, p. 156–159, 1987.

CHRISTIE, E. L.; PATTNAIK, S.; BEACH, J.; et al. Multiple ABCB1 transcriptional fusions in drug resistant high-grade serous ovarian and breast cancer. **Nature Communications**, v. 10, n. 1295, p. 5–14, 2019. Springer US. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-09312-9>

CIRQUEIRA, M. B.; MOREIRA, M. A. R.; SOARES, L. R.; FREITAS-JÚNIOR, R. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, 2011.

COLE, S. P. C.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J. H.; 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.

DALTON, W. S.; DURIE, B. G. M.; ALBERTS, D. S.; GERLACH, J.; CRESS, A. E. Characterization of a New Drug-resistant Human Myeloma Cell Line That Expresses P-Glycoprotein. **Cancer Research**, v. 46, n. 10, p. 5125–5130, 1986.

DE LA SALLE, H.; SAULQUIN, X.; MANSOUR, I.; et al. Asymptomatic deficiency in the peptide transporter associated to antigen processing (TAP). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 128, n. 3, p. 525–531, 2002.

DE ROOCK, W.; BIESMANS, B.; DE SCHUTTER, J.; TEJPAR, S. Clinical Biomarkers in Oncology - Focus on Colorectal Cancer. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 13, n. 2, p. 103–114, 2009.

DEAN, M. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2002.

DEELEY, R. G.; WESTLAKE, C.; COLE, S. P. C. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 849–899, 2006.

DOWSETT, M.; NIELSEN, T. O.; A'HERN, R.; BARLETT, J.; et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 22, p. 1656–1664, 2011.

DRENBERG, C. D.; HU, S.; LI, L.; et al. ABCC4 Is a Determinant of Cytarabine-Induced Cytotoxicity and Myelosuppression. **Clinical and Translational Science**, v. 9, p. 51–59, 2016.

DUAN, Z.; BRAKORA, K. A.; SEIDEN, M. V. Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal resistance in human ovarian cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 7, p. 833–838, 2004.

DULUCQ, S.; BOUCHET, S.; TURCQ, B.; LIPPERT, E.; et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 2024–2027, 2008.

EFFERTH, T.; GILLET, J. P.; SAUERBREY, A.; 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.

ELLIOTT, A. M.; AL-HAJJ, M. 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, K.; MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B.; CEROVSKA, E.; 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.

ENGEL, T.; LORKOWSKI, S.; LUEKEN, A.; et al. The Human ABCG4 Gene Is Regulated by Oxysterols and Retinoids in Monocyte-Derived Macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 288, p. 483–488, 2001.

ESKILER, G. G.; CECENER, G.; EGELI, U.; TUNCA, B. Talazoparib nanoparticles for overcoming multidrug resistance in triple-negative breast cancer. **Journal of Cellular Physiology**, p. 1–16, 2020.

FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and Other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US). 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/> Acesso em 29 de agosto de 2022.

FLETCHER, J. I.; HABER, M.; HENDERSON, M. J.; NORRIS, M. D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nature Reviews**, v.10, p. 147-156, 2010.

FONTANA F; ANSELMINI, M.; LIMONTA, P. Molecular Mechanisms of Cancer Drug Resistance: Emerging Biomarkers and Promising Targets to Overcome Tumor Progression. **Cancers**, v. 14, n. 1614, 2022.

FRANK, N. Y.; MARGARYAN, A.; HUANG, Y.; et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. **Cancer Research**, v. 65, n. 10, p. 4320–4333, 2005.

GANAPATHI, R. N.; GANAPATHI, M. K. Mechanisms regulating resistance to inhibitors of topoisomerase II. **Frontiers in Pharmacology | Pharmacology of Anti-Cancer Drugs**, v. 4, 2013.

GAO, M.; MIAO, L.; LIU, M.; et al. MiR-145 sensitizes breast cancer to doxorubicin by targeting multidrug resistance-associated protein-1. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, p. 59714–59726, 2016.

GAO, Q.; LI, X. XIU; XU, Y. MING; et al. IRE1 α -targeting downregulates ABC transporters and overcomes drug resistance of colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 476, p. 67–74, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.007>

GAO, R.; FANG, C.; XU, J.; et al. LncRNA CACS15 contributes to oxaliplatin resistance in colorectal cancer by positively regulating ABCC1 through sponging miR-145. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 663, n. 389, p. 183–191, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.005>

GILLET, J. P.; EFFERTH, T.; STEINBACH, D.; 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.

GILLET, J. P.; SCHNEIDER, J.; BERTHOLET, V.; et al. Microarray expression profiling of ABC transporters in human breast cancer. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 3, n. 2, p. 97–106, 2006.

GIORDANO, S. H. Breast Cancer in Men. **The New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 24, p. 2311-2320, 2018.

GOSE, T.; SHAFI, T.; FUKUDA, Y.; et al. ABCG2 requires a single aromatic amino acid to “clamp” substrates and inhibitors into the binding pocket. **FASEB Journal**, v. 34, n. 4, p. 4890–4903, 2020.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATTES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews**, v.2, p. 48-58, 2002.

GRAF, S. A.; HAIGH, S. E.; CORSON, E. D.; SHIRIHAI, O. S. Targeting, import and dimerization of a mammalian mitochondrial ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCB10 (ABC-me). **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 41, p. 42954–42963, 2004.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. How to Win the Battle with RNase. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2019.

GREGERS, J.; GRÉEN, H.; CHRISTENSEN, I. J.; DALHOFF, K.; et. al. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 15, p. 372-379, 2015.

GUICHARD, N.; GUILLARME, D.; BONNABRY, P.; FLEURY-SOUVERAIN, S. Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review. **Analyst**, v. 142, p. 2273 - 2321, 2017.

GUO, Y.; KOTOVA, E.; CHEN, Z. S.; et al. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 32, p. 29509–29514, 2003.

HAMPRAS, S. S.; SUCHESTON, L.; WEISS, J.; BAER, M. R.; et. al. Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette (ABC) proteins, overall survival and drug toxicity in patients with Acute Myeloid Leukemia. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 1, n. 3, p. 201-207, 2010.

HAN, X.; TIAN, Y.; TIAN, D. Tumor metastatic promoter ABCE1 interacts with the cytoskeleton protein actin and increases cell motility. **Oncology Reports**, v. 35, n. 6, p. 3623–3629, 2016.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p.646-674, 2011.

HANKE, N. T.; IMLER, E.; MARRON, M. T.; et al. Characterization of carfilzomib-resistant non-small cell lung cancer cell lines. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 7, p. 1317–1327, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-018-2662-0>

HARBECK, N.; PENAULT-LLORCA, F.; CORTES, J.; GNANT, M.; et al. Breast cancer. **Nature Reviews**, v. 5, n. 66, 2019.

HE, Z.; HU, B.; TANG, L. et al. The overexpression of MRP4 is related to multidrug resistance in osteosarcoma cells. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 11, n. 1, 2015.

HEDDITCH, E. L.; GAO, B.; RUSSELL, A. J.; et al. ABCA Transporter Gene Expression and Poor Outcome in Epithelial Ovarian Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 7, p. 1-11, 2014.

HEIMERL, S.; BOSSERHOFF, A. K.; LANGMANN, T.; ECKER, J.; SCHMITZ, G. Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. **Melanoma Research**, v. 17, n. 5, p. 265–273, 2007.

HELIAS, V.; SAISON, C.; BALLIF, B. A.; et al. The human porphyrin transporter ABCB6 is dispensable for erythropoiesis but responsible for the new blood group system Langereis. **Nature Genetics**, v. 44, n. 2, p. 1-13, 2013.

HENDIG, D.; LANGMANN, T.; ZARBOCK, R.; 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. 1–2, p. 85–92, 2009.

HENRY, N. L.; HAYES, D. N. Cancer Biomarkers. **Molecular Oncology**, v. 6, p. 140-146, 2012.

HIPFNER, D. R.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1461, p. 359–376, 1999.

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

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

HOPPER, E.; BELINSKY, M. G.; ZENG, H.; et al. Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. **Cancer Letters**, v. 162, p. 181–191, 2001.

HOPPER-BORGE, E.; CHEN, Z.; SHCHAVELEVA, I.; BELINSKY, M. G.; KRUH, G. D. Analysis of the Drug Resistance Profile of Multidrug Resistance Protein 7 (ABCC10): Resistance to Docetaxel. **Cancer Research**, v. 7, n. 215, p. 4927–4930, 2004.

HU, D.; LI, M.; SU, J.; MIAO, K.; QIU, X. Dual-Targeting of miR-124-3p and ABCC4 Promotes Sensitivity to Adriamycin in Breast Cancer Cells. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 23, n. 3, p. 156–165, 2019.

HUANG, B.; ZHOU, H.; LANG, X.; LIU, Z. siRNA-induced ABCE1 silencing inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 4, p. 1685–1690, 2014.

HUANG, H.; CHEN, J.; DING, C. M.; et al. LncRNA NR2F1-AS1 regulates hepatocellular carcinoma oxaliplatin resistance by targeting ABCC1 via miR-363. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 3238–3245, 2018.

HUANG, Y.; ANDERLE, P.; BUSSEY, K. J.; et al. Membrane transporters and channels: Role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. **Cancer Research**, v. 64, n. 12, p. 4294–4301, 2004.

HUSSAIN, I.; WAHEED, S.; AHMAD, K. A.; PIROG, J. E.; SYED, V. *Scutellaria baicalensis* targets the hypoxia-inducible factor-1 α and enhances cisplatin efficacy in ovarian cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 9, p. 7515–7524, 2018.

IMBEAUD, S.; GRAUDENS, E.; BOULANGER, V.; BARLET, X.; et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 6, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. **A situação do câncer de mama no Brasil**: síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/situacao-do-cancer-de-mama-no-brasil-sintese-de-dados-dos-sistemas-de-informacao> Acesso em: 29 agosto 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC Biennial Report 2020–2021 – Key Global Cancer Data for 2020. Lyon: IARC – WHO, 2021. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2021/12/br2021-img-1.jpg>. Acesso em 02 outubro 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Mechanisms of carcinogenesis. Lyon: IARC – WHO, 2008. Disponível em: https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/wcr_2008_5.pdf Acesso em: 07 out 2020.

INVITROGEN - THERMO FISHER SCIENTIFIC. Working with RNA: the basics. Avoiding, Detecting, and Inhibiting RNases. **Technical Note, Thermo Fischer Scientific**, 2019. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/ambion-tech-support/nuclease-enzymes/general-articles/the-basics-rnase-control.html> Acesso em 11 de setembro de 2022.

JAEGER, L. H.; NASCIMENTO, T. C.; ROCHA, F. D.; VILELA, F. M. P.; et al. Adjusting RT-qPCR conditions to avoid unspecific amplification in SARS-CoV-2 diagnosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 102, p. 437–439, 2021.

JANUCHOWSKI, R.; ZAWIERUCHA, P.; ANDRZEJEWSKA, M.; RUCIŃSKI, M.; ZABEL, M. Microarray-based detection and expression analysis of ABC and SLC transporters in drug-resistant ovarian cancer cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 67, n. 3, p. 240–245, 2013.

JEDLITSCHKY, G.; TIRSCHMANN, K.; LUBENOW, L. E.; et al. The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. **Blood**, v. 104, n.12, p. 3603–3610, 2004.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 455, n. 1, p. 152–162, 1976.

KALIA, M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 64, p. S16-S21, 2015.

KAMINSKI, W. E.; PIEHLER, A.; PU, K.; et al. Complete Coding Sequence, Promoter Region, and Genomic Structure of the Human ABCA2 Gene and Evidence for Sterol-Dependent Regulation in Macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 258, n.1, p. 249–258, 2001.

KARATAS, O. F.; GUZEL, E.; DUZ, M. B.; ITTMANN, M.; OZEN, M. The role of ATP-binding cassette transporter genes in the progression of prostate cancer. **Prostate**, v. 76, n. 5, p. 434–444, 2016.

KARCHER, A.; SCHELE, A.; HOPFNER, K. X-ray Structure of the Complete ABC Enzyme ABCE1 from *Pyrococcus abyssi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 12, p. 7962–7971, 2008.

KATHAWALA, R. J.; SODANI, K.; CHEN, K.; et al. Masatinib antagonizes ATP-Binding Cassette subfamily C member 10-mediated paclitaxel resistance: a preclinical study. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n.3, p.714-723, 2014.

KIM, I. W.; YUN, H. Y.; CHOI, B.; HAN, N.; et al. ABCB1 C3435T genetic polymorphism on population pharmacokinetics of methotrexate after hematopoietic stem cell transplantation in Korean patients: a prospective analysis. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 8, p. 1816-1826, 2012.

KLEFFEL, S.; LEE, N.; LEZCANO, C.; et al. ABCB5-targeted chemoresistance reversal inhibits Merkel cell carcinoma growth. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n.1, p. 838-846, 2016.

KLUCKEN, J.; BUCHLER, C.; ORSO, E.; et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 2, 2000.

KNUTSEN, T.; KONETI RAO, V.; RIED, T.; et al. Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 27, n. 1, p. 110–116, 2000.

KOCH, J.; GUNTRUM, R.; HEINTKE, S.; KYRITSIS, C.; TAMPE, R. Functional Dissection of the Transmembrane Domains of the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 10142–10147, 2004.

KORT, A.; DURMUS, S.; SPARIDANS, R. W.; et al. Brain and testis accumulation of regorafenib is restricted by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1). **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 7, p. 2205–2216, 2015.

KUANG, J.; YAN, X.; GENDERS, A. J.; GRANATA, C.; et al. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. **Plos One**, v. 13, n. 5, 2018.

KUMAR, S.; MISHRA, S. MALAT1 as master regulator of biomarkers predictive of pan-cancer multi-drug resistance in the context of recalcitrant NRAS signaling pathway identified using systems-oriented approach. **Nature - Scientific Reports**, v. 12, n. 7540, 2022.

LAI, L.; TAN, T. M. C. role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) – mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. **Biochemical Journal**, v. 361, p. 497–503, 2002.

LAING, N. M.; BELINSKY, M. G.; KRUH, G. D.; BELL, D. W.; et al. Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 58, p. 1332–1337, 1998.

LAM, B.; SIMKIN, M.; RGHEI, N.; HAJ-AHMAD, Y. Revised Guidelines for RNA Quality Assessment for Diverse Biological Sample Input. **Norgen Biotek Corporation**, Application Note n. 47, 2012. Disponível em: <http://www.norgenbiotek.com/display-resource.php?ID=> Acesso em: 30 de julho de 2022.

LANG, T.; HABERL, M.; JUNG, D.; et al. Genetic Variability, Haplotype Structures, and Ethnic Diversity of Hepatic Transporters MDR3 (ABCB4) and Bile Salt Export Pump (ABCB11). **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 9, p. 1582–1599, 2006.

LANGMANN, T.; MAUERER, R.; ZAHN, A.; et al. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 230–238, 2003.

LAWLOR, D.; MARTIN, P.; BUSSCHOTS, S.; et al. PARP inhibitors as p-glycoprotein substrates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 6, p. 1913–1920, 2014.

LEE, B. H.; TAYLOR, M. G.; ROBINET, P.; et al. Dysregulation of cholesterol homeostasis in human prostate cancer through loss of ABCA1. **Cancer Research**, v. 73, n. 3, p. 1211–1218, 2013.

LEGGAS, M.; ADACHI, M.; SCHEFFER, G. L.; et al. Mrp4 Confers Resistance to Topotecan and Protects the Brain from Chemotherapy. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 17, p. 7612–7621, 2004.

LEMOS, C.; GIOVANNETTI, E.; ZUCALI, P. A.; ASSARAF, Y. G.; et. al. Impact of ABCG2 polymorphisms on the clinical outcome and toxicity of gefitinib in non-small-cell lung cancer patients. **Pharmacogenomics**, v. 12, n. 2, p. 159-170, 2011.

LEVATIĆ, J.; ĆURAK, J.; KRALJ, M.; et al. Accurate models for P-gp drug recognition induced from a cancer cell line cytotoxicity screen. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5691–5708, 2013.

LI, B.; XIE, D.; ZHANG, H. Long non-coding RNA GHET1 contributes to chemotherapeutic resistance to Gemcitabine in bladder cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 187–194, 2019.

LIANG, S. C.; YANG, C. Y.; TSENG, J. Y.; et al. ABCG2 Localizes to the Nucleus and Modulates CDH1 Expression in Lung Cancer Cells. **Neoplasia**, v. 17, n. 3, p. 265–278, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2015.01.004>>

LITMAN, T.; BRANGI, M.; HUDSON, E.; 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, X. I. A.; LI, Q.; ZHOU, J.; ZHANG, S. U. ATP - binding cassette transporter A7 accelerates epithelial - to - mesenchymal transition in ovarian cancer cells by upregulating the transforming growth factor - β signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 16, p. 5868–5874, 2018.

LOCY, H.; CORREA, R. J. M.; AUTAERS, D.; SCHIETTECATTE, A.; et. al. Overcoming the Challenges of High Quality RNA Extraction from Core Needle Biopsy. **Biomolecules**, v. 11, n. 621, 2021.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 275–292, 2005.

MACK, J. T.; BELJANSKI, V.; SOULIKA, A. M.; et al. “Skittish” Abca2 Knockout Mice Display Tremor, Hyperactivity, and Abnormal Myelin Ultrastructure in the Central Nervous System. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 1, p. 44–53, 2007.

MASOTTI, A.; PRECKEL, T. Analysis of small RNAs with the Agilent 2100 Bioanalyzer. **Nature Methods**, 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth908>. Acesso em 02 Outubro 2022.

MCDEVITT, C. A.; COLLINS, R. F.; CONWAY, M.; et al. Purification and 3D Structural Analysis of Oligomeric Human Multidrug Transporter ABCG2. **Structure**, v. 14, n. 11, p. 1623–1632, 2006.

MINAMI, K.; KAMIJO, Y.; NISHIZAWA, Y.; 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.

MLCOCHOVA, H.; HEZOVA, R.; STANIK, M.; SLABY, O. Urine microRNAs as potential noninvasive biomarkers in urologic cancers. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 32, p. 41.e1-41.e9, 2014.

MODI, A.; ROY, D.; SHARMA, S.; VISHNOI, J. R.; et al. ABC transporters in breast cancer: their roles in multidrug resistance and beyond. **Journal of Drug Targeting**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1061186X.2022.2091578>

MOHAMMAD, I. S.; HE, W.; YIN, L. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 100, n. February, p. 335–348, 2018. Elsevier. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.038>

MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B.; BRYNYCHOVA, V.; OLIVERIUS, M.; et al. Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. **Pancreas**, v. 42, n. 4, p. 707–716, 2013.

MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer - Targets and Therapy**, v. 11, p. 151-164, 2019.

MOO, T. A.; SANFORD, R.; DANG, C.; MORROW, M. Overview of Breast Cancer Therapy. **PET Clinics**, v. 13, p. 339-354, 2018.

MORGANTE, C. V.; MARTINS, A. C. Q.; SILVA, A. K.; OLIVEIRA, T. N.; et. al. Protocolo de Extração de RNA Total de *Arachis spp.* e Avaliação do Efeito de Contaminantes por meio de Análises Espectrofotométricas. **Embrapa Semiárido - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 121, 2015.

MURRAY, J.; VALLI, E.; YU, D. M. T.; et al. Suppression of the ATP-binding cassette transporter ABCC4 impairs neuroblastoma tumor growth and sensitizes to irinotecan *in vivo*. **European Journal of Cancer**, v. 83, p. 132-141, 2017.

NARRANDES, S.; XU, W. Gene Expression Detection Assay for Cancer Clinical Use. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 13, p. 2249-2265, 2018.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Gene & Expression. Maryland: NCBI - United States National Library of Medicine, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression/> Acesso em: 18 set 2022.

NIELSEN, T. O.; LEUNG, S. C. Y.; RIMM, D. L.; DODSON, A.; et. al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 113, n. 7, p. 808-819, 2021.

NISHIMURA, S.; TSUDA, H.; ITO, K.; 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.

NOUVEL, A.; LAGET, J.; DURANTON, F.; LEROY, J.; et al. Optimization of RNA extraction methods from human metabolic tissue samples of the COMET biobank. **Scientific Reports - Nature Portfolio**, v.11, n.20975, 2021.

OGAWA, Y.; TSUDA, H.; HAI, E.; et al. Clinical role of ABCF2 expression in breast cancer. **Anticancer Research**, v. 26, n. 3 A, p. 1809–1814, 2006.

OGURI, T.; BESSHO, Y.; ACHIWA, H.; et al. MRP8 / ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. **Molecular Cancer Therapy**, v. 6, n. 1, p. 122–128, 2007.

OISO, S.; TAKAYAMA, Y.; NAKAZAKI, R.; 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.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Facts sheets in cancer**. Geneva: WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Acesso em: 02 Out 2022.

OVERBECK, T. R.; KRAUSE, D.; TRUEMPER, L.; WULF, G. Intracellular ATP-Binding Cassette Transporter A3 is Expressed in Lung Cancer Cells and Modulates Susceptibility to Cisplatin and Paclitaxel. **Oncology**, v. 84, p. 362–370, 2013.

PARK, S.; SHIMIZU, C.; SHIMOYAMA, T.; 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.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002–2007, 2001.

PFAFFL, M. W. Relative quantification. In: DORAK, M. T. **Real-time PCR**. Nova York: Taylor e Francis Group, 2006. P. 63–82.

PIATKOV, I.; CAETANO, D.; ASSUR, Y.; et al. ABCB1 and ABCC1 single-nucleotide polymorphisms in patients treated with clozapine. **Pharmacogenomics and Personalized Medicina**, v. 10, p. 235–242, 2017.

PRAJAPATI, R.; SANGAMWAR, A. T. Translocation mechanism of P-glycoprotein and conformational changes occurring at drug-binding site: Insights from multi-targeted molecular dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 11, p. 2882–2898, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.07.018>>

PROCHAZKA, L.; KOUDELKA, S.; DONG, L. F.; et al. Mitochondrial targeting overcomes ABCA1-dependent resistance of lung carcinoma to a -tocopheryl succinate. **Apoptosis**, v. 18, p. 286–299, 2013.

QU, X.; ZHANG, L. Effect of ABCE1-silencing gene, transfected by electrotransfer, on the proliferation, invasion, and migration of human thyroid carcinoma SW579 cells. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 14680–14689, 2015.

QIAGEN. Effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications. **Application note**, 1/2018. Disponível em: <https://www.qiagen.com/de/resources/download.aspx?id=11226191-0a82-4a9b-ba4a-99800b6f8595&lang=en> Acesso em 22-Out-2022.

RAHGOZAR, S.; MOAFI, A.; ABEDI, M.; 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.

RAO, V. K.; WANGSA, D.; ROBEY, R. W.; et al. Characterization of ABCG2 gene amplification manifesting as extrachromosomal DNA in mitoxantrone-selected SF295 human glioblastoma cells. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 160, n. 2, p. 126–133, 2005.

RICHIE, R. C.; SWANSON, J. O. Breast Cancer: A Review of the Literature. **Journal of Insurance Medicine**, v. 35, p. 85–101, 2003.

ROBEY, R. W.; PLUCHINO, K. M.; HALL, M. D.; et al., Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistance cancer. **Nature Reviews**, v. 18, n. 323, p. 452–464, 2018.

ROUNDHILL, E.; TURNBULL, D.; BURCHILL, S. Localization of MRP-1 to the outer mitochondrial membrane by the chaperone protein HSP90 β . **FASEB Journal**, v. 30, n. 5, p. 1712–1723, 2016.

ROUNDHILL, E. A.; BURCHILL, S. A. Detection and characterisation of multi-drug resistance protein 1 (MRP-1) in human mitochondria. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 6, p. 1224–1233, 2012

ROUNDHILL, E. A.; JABRI, S.; BURCHILL, S. A. ABCG1 and P-gp identify drug resistant, self-renewing osteosarcoma cells. **Cancer Letters**, v. 453, p. 142–157, 2019. Elsevier. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.011>

RUIZ-VILLALBA, A.; VAN PELT-VERKUIL, E.; GUNST, Q. D.; RUIJTER, J. M.; et al. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 14, p. 7–18, 2017.

RUSSEL, F. G. M.; KOENDERINK, J. B.; MASEREEUW, R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 4, n. 19, p. 200–207, 2008.

SABNIS, N. G.; MILLER, A.; TITUS, M. A.; HUSS, W. J. The Efflux Transporter ABCG2 Maintains Prostate Stem Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. 128–140, 2017.

SAG, D.; CEKIC, C.; WU, R.; LINDEN, J.; HEDRICK, C. C. The cholesterol transporter ABCG1 links cholesterol homeostasis and tumour immunity. **Nature Communications**, v. 6, p. 1-28, 2015.

SAMADANI, A. A.; NIKBAKHSH, N.; FATTAHI, S.; POURBAGHER, R. et. al. RNA Extraction from Animal and Human's Cancerous Tissues: Does Tissue Matter? **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 4, n. 1, 2015.

SEBOROVA, K.; VACLAVIKOVA, R.; SOUCEK, P.; et al. Association of ABC gene profiles with time to progression and resistance in ovarian cancer revealed by bioinformatics analyses. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 2, p. 606–616, 2019.

SHICHIJO, S.; ISHIHARA, Y.; AZUMA, K.; et al. ABCE1, a member of ATP-binding cassette transporter gene, encodes peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in colon cancer patients. **Oncology Reports**, v. 13, n. 5, p. 907–913, 2005.

SHIRAKI, N.; OKAMURA, K.; TOKUNAGA, J.; et al. Bromocriptine reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 93, n. 2, p. 209–215, 2002.

SILVA, J. L.; NUNES, N. C. C.; IZETTI, P.; MESQUITA, G. G.; et. al. Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 145, 2020.

SMITH, A. J.; VAN HELVOORT, A.; VAN MEER, G.; et al. MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 31, p. 23530–23539, 2000.

SONE, K.; OGURI, T.; UEMURA, T.; et al. Genetic variation in the ATP binding cassette transporter ABCC10 is associated with neutropenia for docetaxel in Japanese lung cancer patients cohort. **BMC Cancer**, v. 10, n. 246, p. 1–9, 2019.

STAHLMAN, M. T.; BERNARD, V.; WERT, S. E.; et al. Expression of ABCA3 in Developing Lung and Other Tissues. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 71–83, 2007.

STEINBACH, D.; GILLET, J.; SAUERBREY, A.; et al. ABCA3 as a Possible Cause of Drug Resistance in Childhood Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 14, p. 4357–4364, 2006.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, 2011.

SUROWIAK, P.; MATERNA, V.; KAPLENKO, I.; et al. ABCC2 (MRP2, cMOAT) can be localized in the nuclear membrane of ovarian carcinomas and correlates with resistance to cisplatin and clinical outcome. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 23, p. 7149–7158, 2006.

SZAKÁCS, G.; ANNEREAU, J. P.; LABABIDI, S.; et al. Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. **Cancer Cell**, v. 6, n. 2, p. 129–137, 2004.

SZAKÁCS, G.; PATERSON, J. K.; LUDWIG, J. A.; BOOTH-GENTHE, C.; GOTTESMAN, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 219–234, 2006.

TANDIA, M.; MHIRI, A.; PAULE, B.; SAFFROY, R.; et al. Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 79, n. 4, p. 759–766, 2017.

TARLING, E. J.; EDWARDS, P. A. ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 49, p. 19719–19724, 2011.

TIWARI, A. K.; SODANI, K.; DAI, C. L.; ASHBY JR., C. R.; CHEN, Z. S. Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 570–594, 2011.

TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 27–35, 2020.

TSUDA, H.; ITO, Y. M.; OHASHI, Y.; et al. Identification of overexpression and amplification of ABCF2 in clear cell ovarian adenocarcinomas by cDNA microarray analyses. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 19 I, p. 6880–6888, 2005.

TSYGANOV, M. M.; FREIDIN, M. B.; IBRAGIMOVA, M. K.; et al. Genetic variability in the regulation of the expression cluster of MDR genes in patients with breast cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 251–260, 2017.

UEMURA, T.; OGURI, T.; MAENO, K.; et al. ABCC11 gene polymorphism as a potential predictive biomarker for an oral 5 - fluorouracil derivative drug S - 1 treatment in non-small cell lung cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 84, n. 6, p. 1229–1239, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00280-019-03959-3>>.

UNIPROT. **ATP-binding cassette sub-family A**. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=abcA+homo+sapiens&sort=score>>. Acesso em: 18-Set-2022. 2022a

UNIPROT. **ATP-binding cassette sub-family B**. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=abcb+homo+sapiens&sort=score>>. Acesso em: 18-Set-2022. 2022b

UNIPROT. **ATP-binding cassette sub-family C.** Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=ABCC+homo+sapiens&sort=score>>. Acesso em: 18-Set-2022. 2022c

UNIPROT. **ATP-binding cassette sub-family D.** Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=ABCD&sort=score>>. Acesso em: 18-Set-2022. 2022d

UNIPROT. **ATP-binding cassette sub-family E.** Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=abcE+homo+sapiens&sort=score>>. Acesso em: 18-Set-2022. 2022e

UNIPROT. **ATP-binding cassette sub-family F.** Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=abcB+homo+sapiens&sort=score>>. Acesso em: 18-Set-2022. 2022f

UNIPROT. **ATP-binding cassette sub-family G.** Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=ABCG+homo+sapiens&sort=score>>. Acesso em: 18-Set-2022. 2022g

VAN AUBEL, R. A. M. H.; SMEETS, P. H. E.; PETERS, J. G. P.; BINDELS, R. J. M.; RUSSEL, F. G. M. The MRP4/ABCC4 Gene Encodes a Novel Apical Organic Anion Transporter in Human Kidney Proximal Tubules: Putative Efflux Pump for Urinary cAMP and cGMP. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, p. 595–603, 2002.

VAN DE VEN, R.; SCHEFFER, G. L.; REURS, A. W.; et al. A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2353–2360, 2008.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; et. al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7; 2002.

VERMA, M. Personalized Medicine and Cancer. **Journal of Personalized Medicine**, v.2, p. 1-14, 2012

VRANA, D.; HLAVAC, V.; BRYNYCHOVA, V.; et al. ABC transporters and their role in the neoadjuvant treatment of esophageal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, 2018.

VULSTEKE, C.; LAMBRECHTS, D.; DIEUDONNÉ, A.; HATSE, S.; et. al. Genetic variability in the multidrug resistance associated protein-1 (ABCC1/MRP1) predicts hematological toxicity in breast cancer patients receiving (neo-)adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide (FEC). **Annals of Oncology**, v. 24, n. 6, p. 1513-1525, 2013.

WANG, L.; HE, F.; BU, J.; et al. ABCB6 mutations cause ocular coloboma. **American Journal of Human Genetics**, v. 90, p. 40–48, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.026>

WANG, Y.; ORAM, J. F. Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a protein kinase C γ pathway. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 1062–1068, 2007.

WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHAO, B.; XU, Z.; LV, Y. Suspension State Promotes Drug Resistance of Breast Tumor Cells by Inducing ABCC3 Overexpression. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, p. 410–422, 2020.

WEEN, M. P.; ARMSTRONG, M. A.; OEHLER, M. K.; RICCIARDELLI, C. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 96, n. 2, p. 220–256, 2015.

WEISS, J.; ROSE, J.; STORCH, C. H.; et al. Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 238–245, 2007.

WIECZOREK D.; DELAURIERE, L.; SCHAGAT, T. Methods of RNA Quality Assessment. Promega Corporation, 2022. Disponível em: <https://www.promega.com.br/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment/>. Acesso em 02 Outubro 2022.

WIELINGA, P.; HOOIJBERG, J. H.; GUNNARSDOTTIR, S.; et al. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. **Cancer Research**, v. 65, n. 10, p. 4425–4430, 2005.

WIELINGA, P. R.; REID, G.; CHALLA, E. E.; et al. Thiopurine metabolism and identification of the thiopurine metabolites transported by MRP4 and MRP5 overexpressed in human embryonic kidney cells. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 1321–1331, 2002.

WIND, N. S.; HOLEN, I. Multidrug Resistance in Breast Cancer: From *In Vitro* Models to Clinical Studies. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2011, 2011.

XIAO, Q.; ZHOU, Y.; WINTER, S.; et al. Germline variant burden in multidrug resistance transporters is a therapy-specific predictor of survival in breast cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 146, p. 2475–2487, 2020.

XIE, Z. Y.; LV, K.; XIONG, Y.; GUO, W. H. ABCG2-mediated multidrug resistance and tumor-initiating capacity of side population cells from colon cancer. **Oncology Research and Treatment**, v. 37, n. 11, p. 666–672, 2014.

XU, M.; LI, L.; LIU, Z.; 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.002>>

YABUUCHI, H.; TAKAYANAGI, S. ICHIRO; YOSHINAGA, K.; 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, A.; ISHIKAWA, T.; OTA, I.; et al. High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.137, p. 773–782, 2013.

YAN, M.; WANG, J.; REN, Y.; et al. Over-expression of FSIP1 promotes breast cancer progression and confers resistance to docetaxel via MRP1 stabilization. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 3, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-1248-8>>

YASUI, K.; MIHARA, S.; ZHAO, C.; 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.

YIN, L.; DUAN, J. J.; BIAN, X. W.; YU, S. C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 61, 2020.

YU, Q.; HAN, X.; TIAN, D. L. Deficiency of Functional Iron-Sulfur Domains in ABCE1 Inhibits the Proliferation and Migration of Lung Adenocarcinomas by Regulating the Biogenesis of Beta-Actin in Vitro. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 554–566, 2017.

ZATTONI, I. F.; DELABIO, L. C.; DUTRA, J. P.; KITA, D. G.; et al. Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 237, 2022.

ZHAN, J.; WANG, P.; LI, S.; et al. HOXB13 networking with ABCG1/EZH2/Slug mediates metastasis and confers resistance to cisplatin in lung adenocarcinoma patients. **Theranostics**, v. 9, n. 7, p. 2084–2099, 2019.

ZHANG, H.; LIAN, Z.; SUN, G.; LIU, R.; XU, Y. Loss of miR-516a-3p mediates upregulation of ABCC5 in prostate cancer and drives its progression. **Onco Targets and Therapy**, v.11, p. 3853–3867, 2018a.

ZHANG, H.; SONG, H.; YUAN, R.; et al. Polyene phosphatidylcholine overcomes oxaliplatin resistance in human gastric cancer BGC823 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, n. 1, p. 108–114, 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.033>>

ZHANG, H.; YOU, Y.; ZHU, Z. The human RNA surveillance factor Up-frameshift 1 inhibits hepatic cancer progression by targeting MRP2/ABCC2. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 92, p. 365–372, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.090>

ZHANG, G.; WANG, Z.; QIAN, F.; ZHAO, C.; SUN, C. Silencing of the ABCC4 gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer. **Oncology Reports**, v. 33, p. 1147–1154, 2015a.

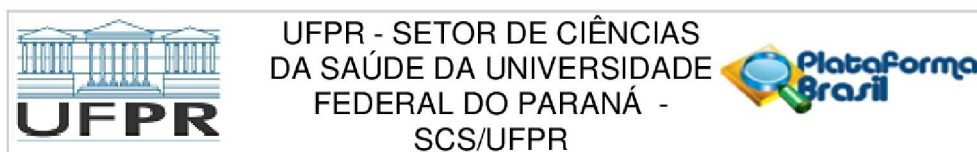
ZHANG, X.; ZHAO, L.; LI, X.; et al. ATP-binding cassette sub-family C member 4 (ABCC4) is overexpressed in human NK/T-cell lymphoma and regulates chemotherapy sensitivity: Potential as a functional therapeutic target. **Leukemia Research**, v. 39, n. 12, p. 1448–1454, 2015b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2015.10.001>

ZHAO, L.; ZHOU, C.; TANAKA, A.; et al. Cloning, characterization and tissue distribution of the rat ATP-binding cassette (ABC) transporter ABC2/ABCA2. **Biochemical Journal**, v. 872, p. 865–872, 2000.

ZHU, X.; XUE, L.; YAO, Y.; 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.

ZUTZ, A. et al. Mitochondrial ABC proteins in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1787, n. 6, p. 681–690, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabo.2009.02.009>>.

APÊNDICE 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA UFPR



UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -
SCS/UFPR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise dos níveis de expressão de transportadores ABC em amostras de pacientes com câncer

Pesquisador: GLAUCIO VALDAMERI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17187219.5.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.507.574

Apresentação do Projeto:

O projeto a ser avaliado quanto ao seu caráter bioético tem como título "Análise dos níveis de expressão de transportadores ABC em amostras de pacientes com câncer", tem como pesquisador responsável o Prof. Dr. Glaucio Valdameri do PPG em Ciências Farmacêuticas do Setor de Ciências da Saúde - UFPR e, ainda, na equipe de pesquisa Letícia C. Delabio, Edilaine T. da Silva, Manoella A. da Costa e Andreza V. L. Marques.

O projeto será realizado no período compreendido entre outubro de 2019 a junho de 2023.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o autor, o projeto tem como objetivo primário:

"Identificar quais são os transportadores ABC responsáveis pela resistência ao tratamento quimioterápico em pacientes com câncer."

E, ainda, como objetivos secundários:

"Avaliar os níveis de expressão transcricional de transportadores ABC em amostras de biópsias tumorais antes e depois do tratamento quimioterápico;

Apontar os principais transportadores ABC que impactam no tratamento quimioterápico;

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

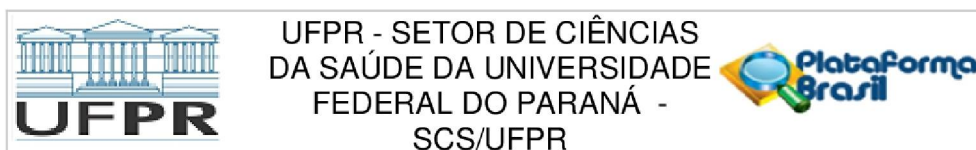
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.507.574

Confirmar os níveis de expressão dos transportadores ABC a nível proteico; Identificar a presença de resistência intrínseca ou adquirida;
 Avaliar quais os tipos de câncer estão mais susceptíveis à resistência mediada por transportadores ABC;
 Verificar se a resistência está relacionada com: quimioterápicos isolados, classes farmacológicas ou se o medicamento quimioterápico está associado a um transportador específico;
 Propor protocolos de tratamento às neoplasias malignas com base nos níveis de expressão dos transportadores identificados."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, são riscos envolvendo esta pesquisa aqueles "relacionados ao sigilo das amostras biológicas. Para assegurar que os dados dos pacientes não sejam divulgados, os pesquisadores comprometem-se em manter o material sob a guarda exclusiva do Laboratório de Imunologia Clínica (Departamento de Análises Clínicas - Setor Ciências da Saúde) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) durante todo o período destinado ao estudo."

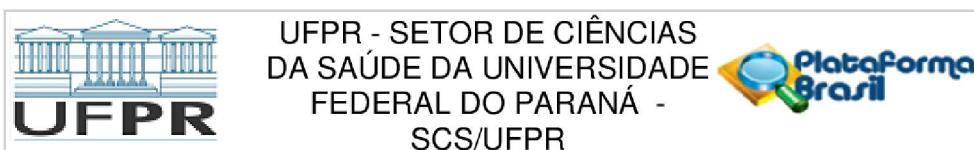
Ainda, segundo os autores, os benefícios estão relacionados ao fato da pesquisa visar "identificar quais os tipos de câncer podem ser mais susceptíveis à resistência mediada por transportadores ABC. Sendo assim, os benefícios estão relacionados à escolha personalizada dos protocolos de tratamento aos pacientes, sendo apontados aqueles com previsão de resistência aos tratamentos propostos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto a ser desenvolvido trata-se de um estudo observacional transversal com coleta prospectiva de amostras biológicas (n=500) de biópsias tumorais, por meio de seleção intrahospitalar.

Após análise sobre a presença e expressão de transportadores ABC, será realizada uma coleta retrospectiva dos dados acerca dos tratamentos quimioterápicos realizados por meio de consulta ao prontuário do paciente para verificar a associação da superexpressão destes com a resistência tumoral.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.507.574

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores responderam às questões e alteraram os documentos conforme as recomendações desse colegiado. Portanto, o parecer é favorável à aprovação do projeto no que se refere ao seu caráter ético.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

*Em caso de projetos com Coparticipantes que possuam Comitês de Ética, seu TCLE somente será liberado após aprovação destas instituições.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS).

Favor agendar a retirada do TCLE pelo telefone 41-3360-7259 ou por e-mail cometica.saude@ufpr.br, necessário informar o CAAE.

Considerações Finais a critério do CEP:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: www.cometica.ufpr.br (obrigatório envio)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

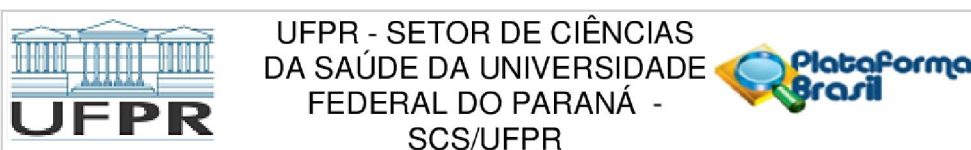
CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.507.574

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1326197.pdf	13/08/2019 10:38:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_VERSAO_2.docx	13/08/2019 10:37:33	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_PAIS_RESPONSIVEL_VERSAO_2.docx	13/08/2019 10:37:20	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_VERSAO_2.docx	13/08/2019 10:36:58	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Outros	CARTA_DEVOLUCAO_PENDENCIAS.docx	13/08/2019 10:36:41	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	10/07/2019 15:37:22	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	SOLICITACAO_DE_ACESSO_LAUDOS_AMOSTRAS_CITOPAR.pdf	10/07/2019 15:35:54	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_PARA_REALIZACAO_DA_PESQUISA_E_MANIPULACAO_DOS_DADOS_ANGELINA_CARON.pdf	10/07/2019 15:35:38	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_COMPROMISSO_USO_DADOS_DE_ARQUIVO.pdf	10/07/2019 15:19:50	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Outros	CHECK_LIST_DOCUMENTAL.pdf	10/07/2019 15:15:39	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CONCORDANCIA_DE_SERVICO_ENVOLVIDO.pdf	10/07/2019 15:11:54	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	09/07/2019 11:27:11	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_PAIS_RESPONSIVEL.docx	09/07/2019 11:24:43	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO.docx	09/07/2019 11:24:34	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

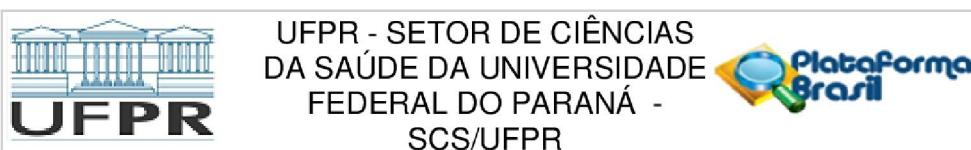
CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

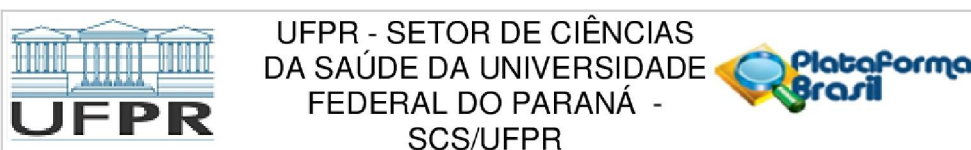
E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.507.574

Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVR E E ESCLARECIDO.docx	09/07/2019 11:24:34	MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.docx	09/07/2019 11:24:25	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	SOLICITACAO_DE_ACESSO_AOS_DA DOS_DE_PRONTUARIOS_HEG.pdf	09/07/2019 11:24:02	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	SOLICITACAO_DE_ACESSO_AOS_DA DOS_DE_PRONTUARIOS_ANGELINA_CARON.pdf	09/07/2019 11:23:53	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AUTORIZACAO_PARA_REALIZACAO_DA_PESQUISA_E_MANIPULACAO_DO S_DADOS_HEG.pdf	09/07/2019 11:20:38	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AUTORIZACAO_PARA_REALIZACAO_DA_PESQUISA_E_MANIPULACAO_DO S_DADOS_CITOPAR.pdf	09/07/2019 11:20:28	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_GUARDA_MATERIAL_BIOLO GICO.pdf	09/07/2019 11:18:22	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACOES_EQUIPE_PESQUISA. pdf	09/07/2019 11:17:45	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CONCORDANCIA_INST_COPARTICIP ANTES_HEG.pdf	09/07/2019 11:17:11	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CONCORDANCIA_INST_COPARTICIP ANTES_CITOPAR.pdf	09/07/2019 11:17:00	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CONCORDANCIA_INST_COPARTICIP ANTES_ANGELINA_CARON.pdf	09/07/2019 11:16:45	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANALISE_DE_MERITO.pdf	09/07/2019 11:11:55	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Outros	ATA_DE_APROVACAO_PPGCF_PROJ ETO_CEP.pdf	09/07/2019 11:11:25	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_ENCAMINHAMENTO_PESQUI SADOR_AO_CEP.pdf	09/07/2019 11:10:17	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar**Bairro:** Alto da Glória**CEP:** 80.060-240**UF:** PR**Município:** CURITIBA**Telefone:** (41)3360-7259**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.507.574

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

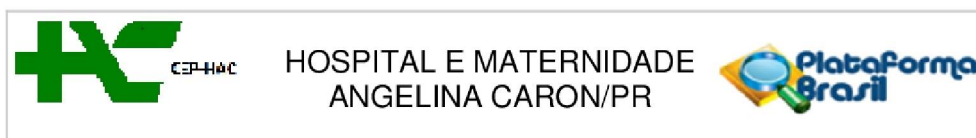
Não

CURITIBA, 14 de Agosto de 2019

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

APÊNDICE 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA HOSPITAL E MATERNIDADE ANGELINA CARON



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise dos níveis de expressão de transportadores ABC em amostras de pacientes com câncer

Pesquisador: GLAUCIO VALDAMERI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17187219.5.3002.5226

Instituição Proponente: Hospital e Maternidade Angelina Caron / PR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.614.000

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional transversal com coleta prospectiva das amostras biológicas, as biópsias tumorais, por meio de seleção intrahospitalar. Será feita também a coleta retrospectiva dos dados acerca dos tratamentos quimioterápicos realizados através de consulta ao prontuário do paciente para verificar a associação da superexpressão de transportadores ABC com a resistência tumoral. Os serviços coparticipantes irão disponibilizar os horários de agendamento do procedimento de biópsia dos pacientes, para que os pesquisadores se desloquem aos serviços, expliquem o estudo e apliquem então o TCLE aos pacientes antes da realização do procedimento. Havendo concordância na participação do estudo, o participante, pais ou responsável legal, irá assinar o Termo, autorizando o uso das amostras biológicas e dados de prontuário. Será aplicado ao participante, aos pais ou responsável legal o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou o Termo de Assentimento a participantes maiores de 12 anos e menores de 18 anos. Amostras: Serão utilizadas amostras de biópsias tumorais fornecidas pelos serviços coparticipantes que disponham de amostra tecidual antes do primeiro tratamento quimioterápico e amostra do mesmo paciente e após o tratamento. As amostras serão obtidas através de colaborações firmadas com instituições coparticipantes.

1)Citopar – Térreo, Loja 3. Av. Sete de Setembro, 5426 - Batel, Curitiba – PR.

2)Hospital Erasto Gaertner – Rua Dr. Ovide do Amaral, 201 - Jardim das Américas. Curitiba – PR.

As amostras biológicas serão usadas especificamente para os propósitos dessa pesquisa e

Endereço: Rod. do Caqui nº 1150 km 01- Caixa Postal 046
Bairro: Jardim Araçatuba **CEP:** 83.430-000
UF: PR **Município:** CAMPINA GRANDE DO SUL
Telefone: (41)3679-8100 **Fax:** (41)3679-8100 **E-mail:** cepnac@hospitalcaron.com.br



HOSPITAL E MATERNIDADE
ANGELINA CARON/PR



Continuação do Parecer: 3.614.000

posteriormente serão descartadas e destruídas no próprio laboratório responsável pela pesquisa. Os dados de prontuário serão obtidos através das instituições:

1) Hospital Angelina Caron – Rodovia do Caqui, 1150 - Centro, Campina Grande do Sul – PR.

2) Hospital Erasto Gaertner – Rua Dr. Ovide do Amaral, 201 - Jardim das Américas. Curitiba – PR.

A utilização das amostras se dará em um único momento, portanto, as mesmas serão encaminhadas ao próprio laboratório de pesquisa com conservação em temperatura ambiente e serão analisadas logo após o fornecimento das mesmas. As amostras de biópsias serão destruídas e descartadas logo após o término da realização das análises laboratoriais. A análise será realizada através de: Isolamento de RNA e Síntese de cDNA- Quantificação do mRNA por qRT-PCR em tempo real-Western Blot.

Dados de prontuários: Serão realizadas consultas aos prontuários dos pacientes para correlacionar resultados das amostras de biópsias tumorais aos tratamentos medicamentosos propostos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar quais são os transportadores ABC responsáveis pela resistência ao tratamento quimioterápico em pacientes com câncer.

Objetivo Secundário:

Avaliar os níveis de expressão transcricional de transportadores ABC em amostras de biópsias tumorais antes e depois do tratamento quimioterápico; Apontar os principais transportadores ABC que impactam no tratamento quimioterápico; Confirmar os níveis de expressão dos transportadores ABC a nível proteico; Identificar a presença de resistência intrínseca ou adquirida; Avaliar quais os tipos de câncer estão mais

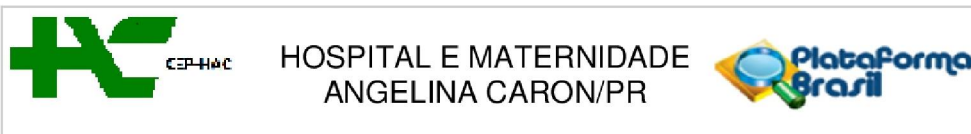
susceptíveis à resistência mediada por transportadores ABC; Verificar se a resistência está relacionada com: quimioterápicos isolados, classes farmacológicas ou se o medicamento quimioterápico está associado a um transportador específico; Propor protocolos de tratamento às neoplasias malignas com base nos níveis de expressão dos transportadores identificados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos, envolvendo esta pesquisa, estão relacionados ao sigilo das amostras biológicas. Para assegurar que os dados dos pacientes não sejam divulgados, os pesquisadores comprometem-se em manter o material sob a guarda exclusiva do Laboratório de Imunologia Clínica (Departamento de Análises Clínicas - Setor Ciências da Saúde) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) durante

Endereço: Rod. do Caqui nº 1150 km 01- Caixa Postal 046
Bairro: Jardim Araçatuba **CEP:** 83.430-000
UF: PR **Município:** CAMPINA GRANDE DO SUL
Telefone: (41)3679-8100 **Fax:** (41)3679-8100 **E-mail:** cepnac@hospitalcaron.com.br



Continuação do Parecer: 3.614.000

todo o período destinado ao estudo. Reforça-se que as amostras de biópsia tumoral, logo após análise laboratorial será destruída e descartada, pois a utilização do material ocorre em etapa única.

Benefícios:

A pesquisa visa identificar quais os tipos de câncer podem ser mais susceptíveis à resistência mediada por transportadores ABC. Sendo assim, os benefícios estão relacionados à escolha personalizada dos protocolos de tratamento aos pacientes, sendo apontados aqueles com previsão de resistência aos tratamentos propostos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional transversal com coleta prospectiva das amostras biológicas, as biópsias tumorais, por meio de seleção intrahospitalar. Após análise laboratorial das amostras, será feita coleta retrospectiva dos dados acerca dos tratamentos quimioterápicos realizados através de consulta ao prontuário do paciente para verificar a associação da superexpressão de transportadores ABC com a resistência tumoral. A consulta aos prontuários dos pacientes visa correlacionar os resultados laboratoriais obtidos com a resposta aos tratamentos quimioterápicos realizados. No decorrer do tratamento oncológico, serão registrados os dados de prontuário no que diz respeito ao protocolo proposto no início do tratamento e em quais medicamentos quimioterápicos consiste o protocolo inicial. Serão levantados dados afim de serem identificadas possíveis alterações no plano terapêutico que sejam decorrentes de resposta terapêutica insatisfatória à neoplasia.

Desfecho Primário:

Apontar quais os tipos de câncer estão mais susceptíveis à resistência mediada por transportadores ABC e quais são os principais transportadores ABC envolvidos na resistência aos tratamentos quimioterápicos afim de serem propostos protocolos de tratamento às neoplasias malignas com base nos níveis de expressão dos transportadores identificados.

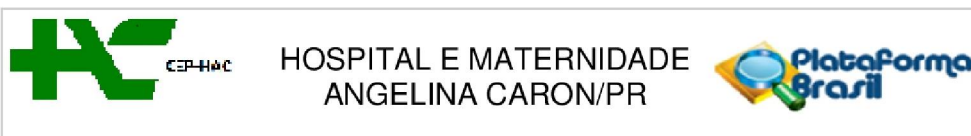
Desfecho Secundário:

Verificar se a resistência está relacionada com quimioterápicos isolados, classes farmacológicas ou se o medicamento quimioterápico está associado a um transportador específico e identificar a presença de resistência intrínseca ou adquirida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto com tema relevante, atual e de importância científica. Com embasamento teórico, bem elaborado, descrevendo em detalhes todos os procedimentos que serão realizados no decorrer da

Endereço: Rod. do Caqui nº 1150 km 01- Caixa Postal 046
Bairro: Jardim Araçatuba **CEP:** 83.430-000
UF: PR **Município:** CAMPINA GRANDE DO SUL
Telefone: (41)3679-8100 **Fax:** (41)3679-8100 **E-mail:** cepnac@hospitalcaron.com.br



Continuação do Parecer: 3.614.000

pesquisa.

Todos os documentos referentes ao projeto estão adequados ao que se propõe e respeitam as normas vigentes. O Termo de Consentimento possui linguagem de fácil entendimento e contém todas as informações necessárias aos pacientes.

Recomendações:

Não foram detectadas falhas éticas ou metodológicas, não havendo portanto, pendências no referido projeto. Salientamos a importância do envio de relatórios semestrais ao CEP-HAC, assim como qualquer alteração do protocolo e um relatório final na conclusão da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

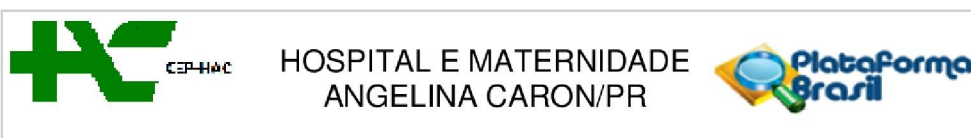
Diante do exposto, o CEP-HAC de acordo com suas atribuições definidas na resolução 466/12, manifesta-se pela APROVAÇÃO do Projeto, nos termos em que está proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVR E_E_ESCLARECIDO_VERSAO_2.docx	13/08/2019 10:37:33	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVR E_E_ESCLARECIDO_PAIS_RESPONS AVEL_VERSAO_2.docx	13/08/2019 10:37:20	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_VERSA O_2.docx	13/08/2019 10:36:58	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Outros	CARTA_DEVOLUCAO_PENDENCIAS.d ocx	13/08/2019 10:36:41	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	10/07/2019 15:37:22	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Outros	CHECK_LIST_DOCUMENTAL.pdf	10/07/2019 15:15:39	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVR E E ESCLARECIDO PAIS RESONSA	09/07/2019 11:24:43	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO	Aceito

Endereço: Rod. do Caqui nº 1150 km 01- Caixa Postal 046
Bairro: Jardim Araçatuba **CEP:** 83.430-000
UF: PR **Município:** CAMPINA GRANDE DO SUL
Telefone: (41)3679-8100 **Fax:** (41)3679-8100 **E-mail:** cepnac@hospitalcaron.com.br



Continuação do Parecer: 3.614.000

Justificativa de Ausência	docx	09/07/2019 11:24:43	MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVR E_E_ESCLARECIDO.docx	09/07/2019 11:24:34	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.docx	09/07/2019 11:24:25	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AUTORIZACAO_PARA_REALIZACAO_DA_PESQUISA_E_MANIPULACAO_DO S_DADOS_HEG.pdf	09/07/2019 11:20:38	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AUTORIZACAO_PARA_REALIZACAO_DA_PESQUISA_E_MANIPULACAO_DO S_DADOS_CITOPAR.pdf	09/07/2019 11:20:28	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito
Outros	ATA_DE_APROVACAO_PPGCF_PROJ ETO_CEP.pdf	09/07/2019 11:11:25	ANDREZZA VIVIANY LOURENCO MARQUES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINA GRANDE DO SUL, 01 de Outubro de 2019

Assinado por:
Fátima dos Santos de Bittencourt
(Coordenador(a))

Endereço: Rod. do Caqui nº 1150 km 01- Caixa Postal 046
Bairro: Jardim Araçatuba **CEP:** 83.430-000
UF: PR **Município:** CAMPINA GRANDE DO SUL
Telefone: (41)3679-8100 **Fax:** (41)3679-8100 **E-mail:** cepnac@hospitalcaron.com.br