

Localização subcelular de XIAP: papel na resistência às drogas e no prognóstico no câncer de mama

Deborah Delbue^{1,2} (ME), Pedro Ivo Lucena³, Lauana G.T. Lemos^{1,2}, Eric W-F. Lam⁴, João P.B. Viola³, Raquel C. Maia¹, Gabriela Nestal de Moraes¹

¹Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular; Programa de Hemato-Oncologia Molecular; INCA, Rio de Janeiro (RJ).

²Programa de Pós-Graduação em Oncologia do INCA, RJ

³Programa de Biologia Celular do INCA, RJ

⁴Department of Surgery and Cancer, Hammersmith Hospital, Imperial College London, UK.

INTRODUÇÃO E OBJETIVO

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete as mulheres, além de causar elevadas taxas de mortalidade. Tal neoplasia tem como um importante *hallmark* o desbalanço entre proliferação e morte celular e nesse contexto, se insere a XIAP. A XIAP é uma proteína antiapoptótica encontrada principalmente na porção citoplasmática, entretanto alguns estudos sugerem um possível papel oncogênico exercido pela XIAP nuclear. Dados do nosso grupo mostram que a expressão de XIAP nuclear apresenta impacto desfavorável, enquanto que a expressão citoplasmática confere impacto favorável na sobrevida global de pacientes com carcinoma ductal infiltrante (Figura 1), sugerindo papéis distintos dependentes de sua localização subcelular. Pouco se sabe sobre o papel da localização subcelular de XIAP no câncer de mama, portanto o nosso objetivo é investigar a sua localização em diferentes compartimentos celulares e seu impacto na quimiorresistência nessa neoplasia.

METODOLOGIA

Nesse estudo, foram utilizadas linhagens celulares derivadas de câncer de mama (BT549, MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^R e MCF-7 Tax^R) e uma linhagem celular de mama não neoplásica (HB4a). Para avaliação da expressão e localização subcelular de XIAP, Western Blotting e fracionamento subcelular foram realizados. A viabilidade celular, capacidade de formação de colônias e o número de células foram analisados pelos ensaios de MTT, clonogênico e marcação com azul de tripan, respectivamente. A fim de avaliar os efeitos da superexpressão de XIAP nuclear na resistência ao tratamento, as células MCF-7 foram transfectadas utilizando os plasmídeos pEBB, XIAP^{WT}, XIAP^{H467A} e XIAP^{ΔRING}, além de XIAP NLS^{N-term} e XIAP NLS^{C-term}, gerados por clonagem molecular a partir da inserção do sítio de localização nuclear (NLS) na porção N e C-terminal da forma selvagem.

RESULTADOS

Nossos dados mostram que todas as linhagens apresentaram XIAP citoplasmática, exceto as células MCF-7 Dox^R, resistentes à doxorrubicina (dox), que também apresentaram XIAP nuclear (Figura 2). Observamos que o tratamento com dox diminuiu a viabilidade celular (Figuras 3 e 4) e a capacidade de formação de colônias nas células MDA-MB-231 e MCF-7, porém o mesmo não foi observado nas células MCF-7 Dox^R (Figura 5), validando o nosso modelo experimental. Corroborando esses achados, as células MCF-7 Tax^R, resistentes ao paclitaxel, apresentaram expressão nuclear de XIAP (Figura 6), o que sugere uma possível correlação da presença de XIAP nuclear com o perfil de resistência aos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama. Além disso, o tratamento com dox não alterou a localização subcelular de XIAP em nenhuma das células testadas (Figura 7). De forma importante, a indução da superexpressão dos mutantes XIAP^{ΔRING} e XIAP NLS^{C-term}, onde a localização de XIAP é observada no núcleo (Figuras 8 e 9), resultou no aumento da capacidade proliferativa (Figuras 10 e 11), além de resistência ao tratamento com dox (Figura 12), indicando um papel oncogênico para XIAP nuclear.

CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados mostram que a expressão de XIAP pode ser encontrada em diferentes compartimentos subcelulares em linhagens celulares e amostras de pacientes, estando a presença de XIAP no núcleo correlacionada a um fenótipo de resistência às drogas *in vitro* e a um prognóstico desfavorável no câncer de mama (Figura 13).

Suporte financeiro: Ministério da Saúde/MS; Programa de Oncobiologia - UFRJ/Fundação do Câncer; CNPq; FAPERJ.

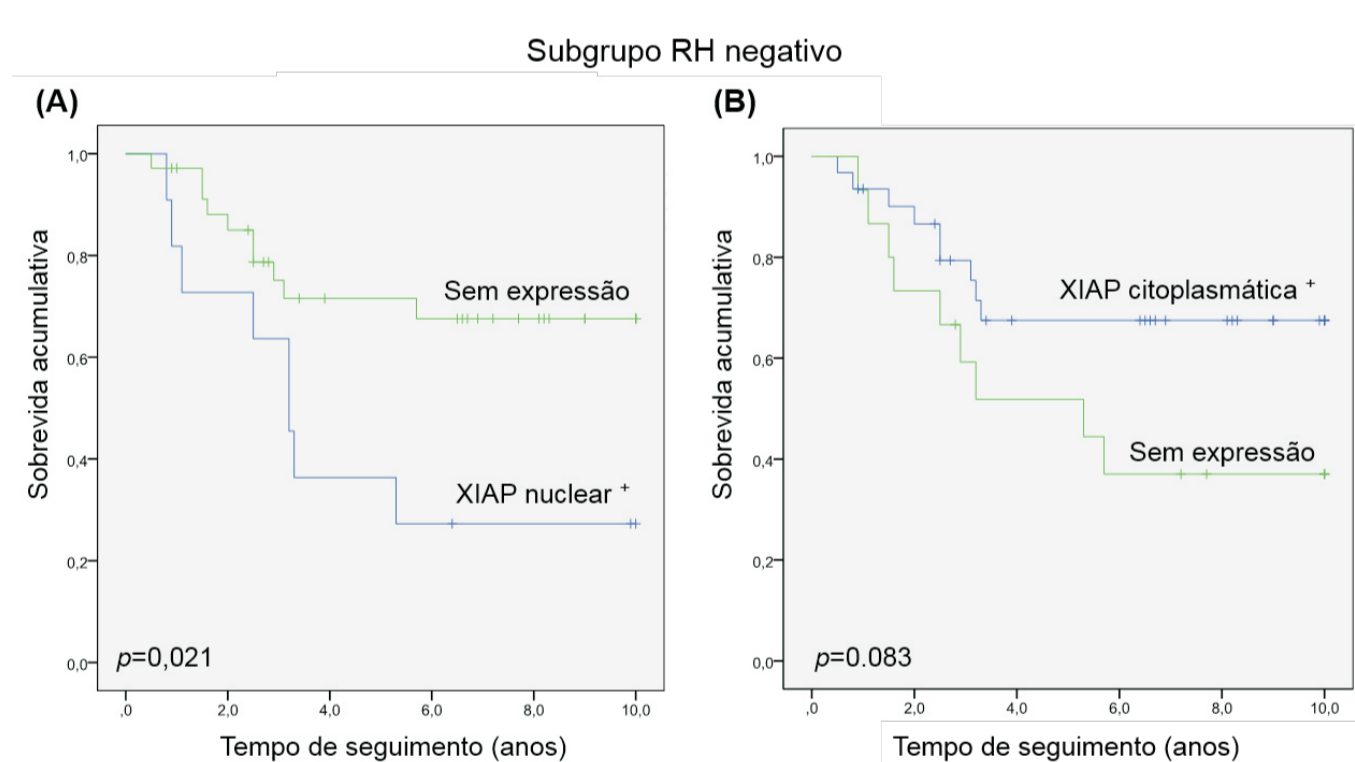


Figura 1: Diferenças na sobrevida global de pacientes com carcinoma ductal infiltrante negativos para receptores hormonais (RH) agrupados de acordo com a expressão nuclear (A) ou citoplasmática (B) de XIAP. As curvas de Kaplan-Meier foram comparadas pelo teste log-rank, onde o valor de p<0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

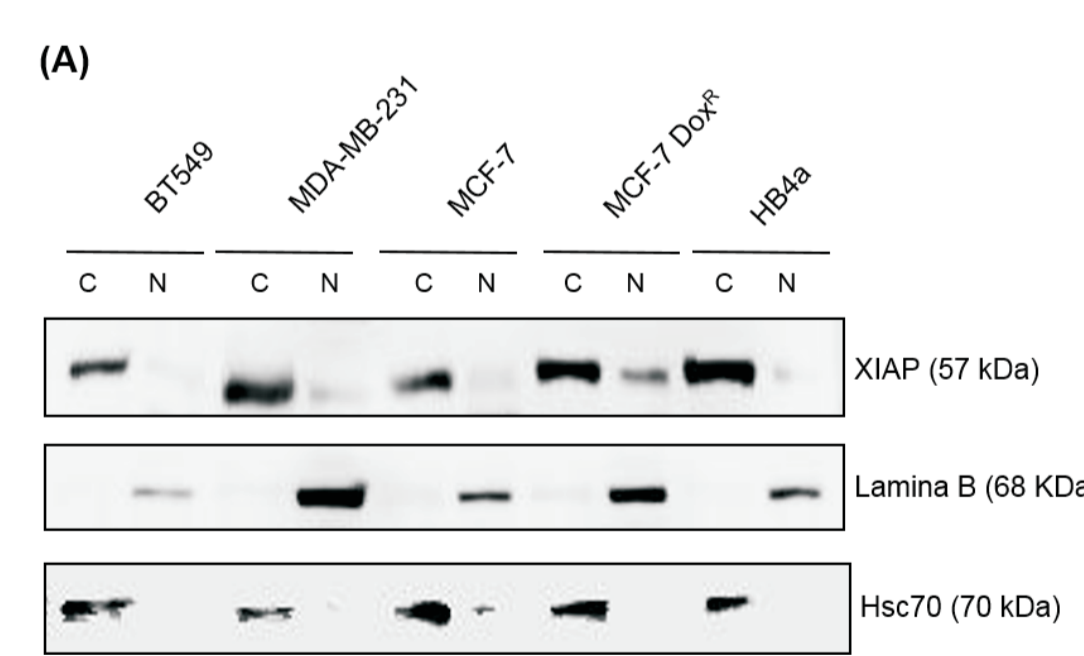


Figura 2: Expressão e localização subcelular de XIAP em um painel de linhagens celulares. As células foram deixadas aderir por 24 h e então, através do kit NE-PER (Thermoscientific), as porções nuclear e citoplasmática foram separadas (A). Posteriormente, a expressão proteica de XIAP foi avaliada por Western blotting (B). Lamina B foi usada como constitutivo nuclear, enquanto Hsc70 como constitutivo citoplasmático. C: Citoplasma; N: Nuclear.

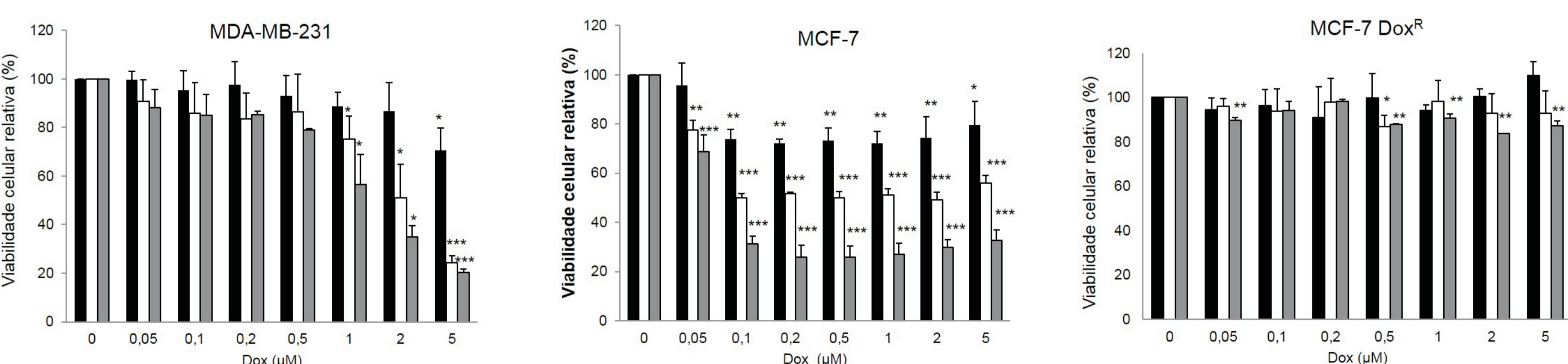


Figura 3: Alterações na viabilidade celular induzidas pela doxorrubicina (dox) nas células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^R. As células foram colocadas em placas de 96 poços e deixadas aderir por 24 h. Posteriormente, as células foram expostas à dox em concentrações crescentes por 24, 48 e 72 h. As linhagens celulares foram comparadas com o seu controle de células não tratadas. O gráfico corresponde às médias e desvio padrão de três experimentos independentes. (Teste t student: *p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001; considerado estatisticamente significativo).

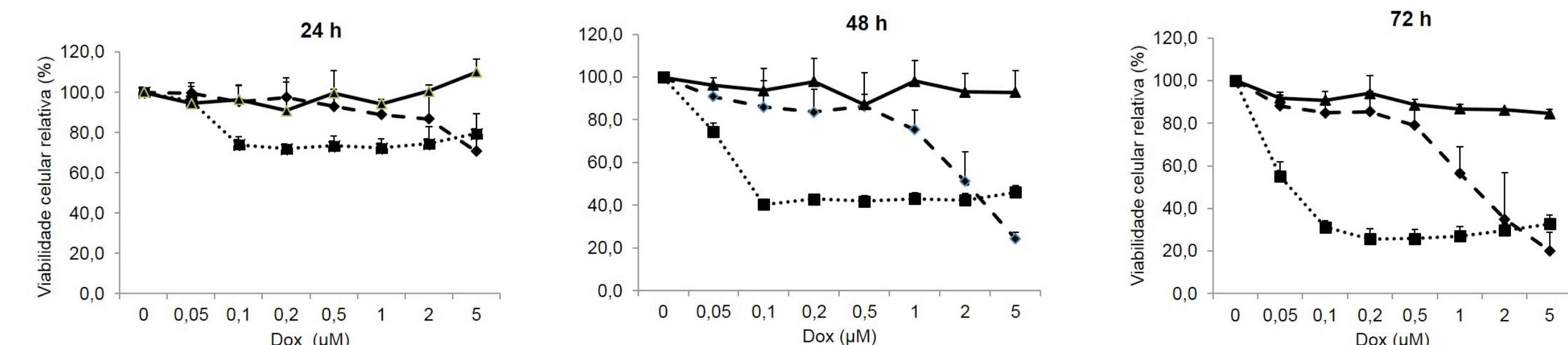


Figura 4: Comparação entre as linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^R em 24, 48 e 72 h de exposição a doxorrubicina (dox). As células foram colocadas em placas de 96 poços e deixadas aderir por 24 h. Posteriormente, as células foram expostas à dox em concentrações crescentes por 24, 48 e 72 h. O gráfico corresponde às médias de três experimentos independentes.

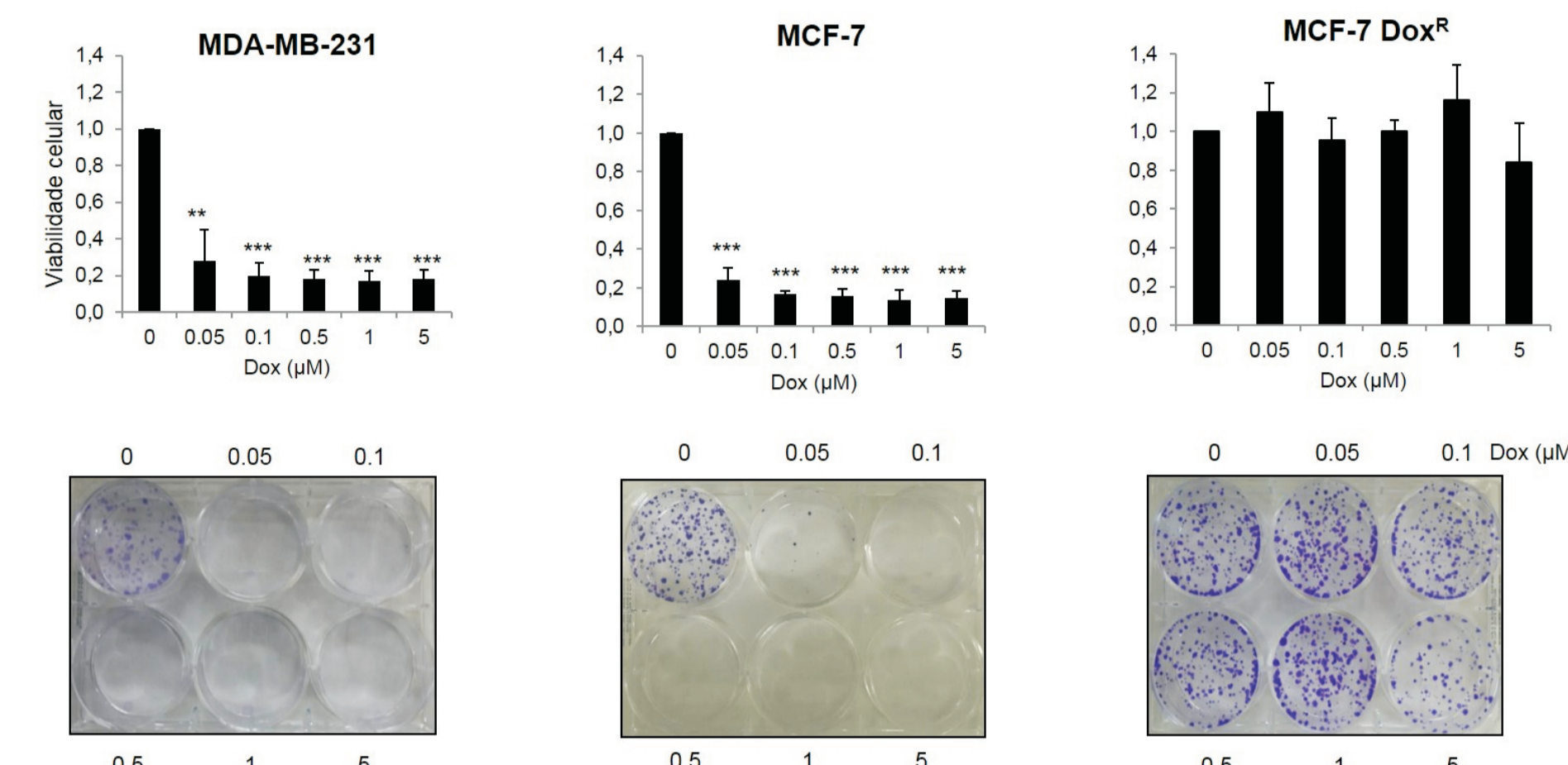


Figura 5: Alterações induzidas pela doxorrubicina (dox) no padrão de formação de colônias nas células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-7 Dox^R. As células foram colocadas em placas de seis poços e deixadas aderir por 24 h. Posteriormente, foi adicionada a dox em diferentes concentrações. Depois de 48 h de exposição ao quimioterápico, o meio foi trocado e as células foram deixadas crescer por cerca de 14 dias, e então, marcadas com cristal violeta. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes. (Teste t student: **p<0.001; ***p<0.0001; considerado estatisticamente significativo).

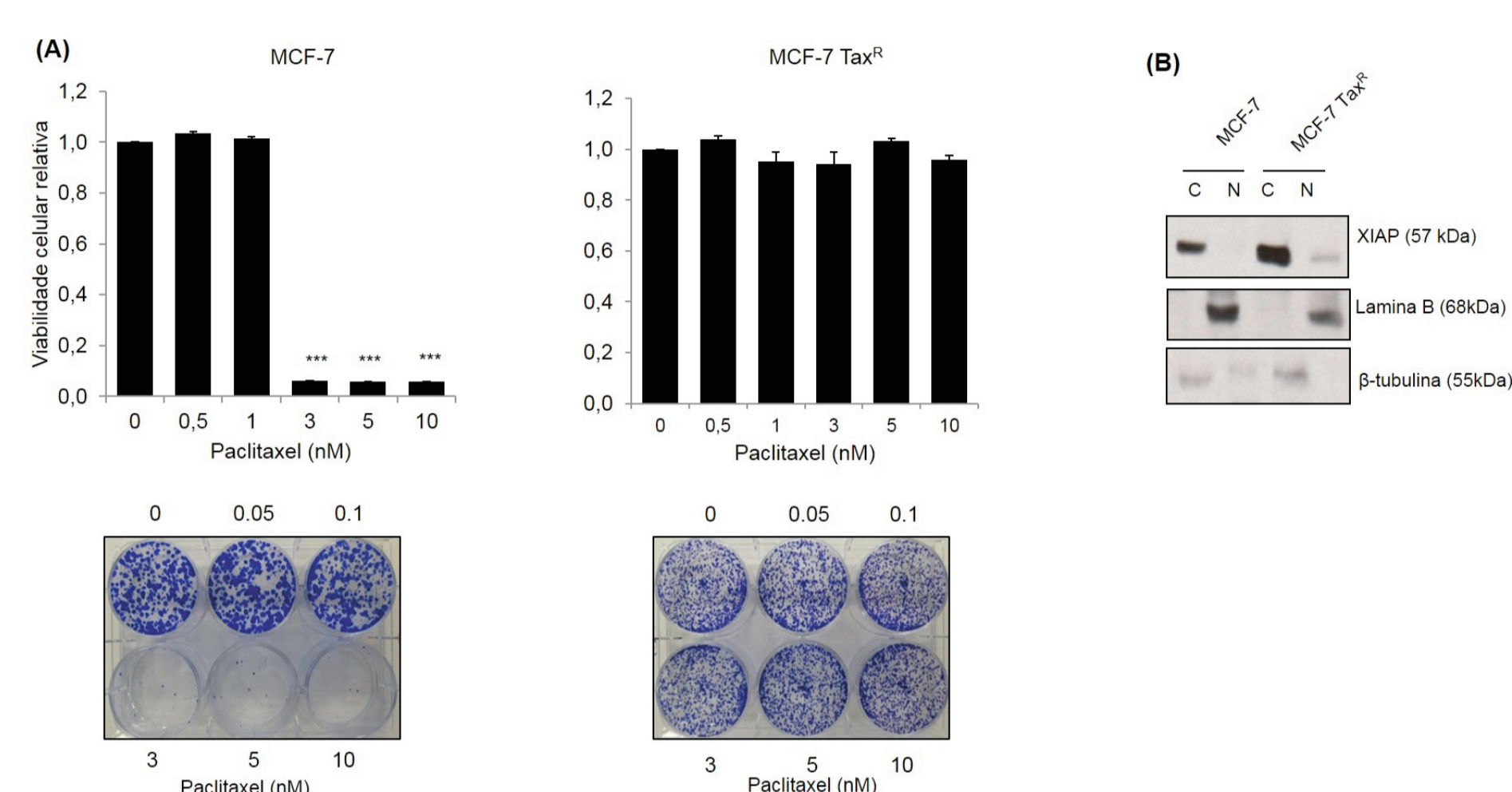


Figura 6: Perfil de localização subcelular de XIAP e de sensibilidade ao paclitaxel em células MCF-7 e MCF-7 Tax^R. (A) As células foram deixadas aderir em placas de seis poços por 24 h. Posteriormente, diferentes concentrações de paclitaxel foram adicionadas. Depois de 48 h de exposição ao quimioterápico, o meio foi trocado e as células foram deixadas crescer por cerca de 14 dias, e então, marcadas com cristal violeta. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes (Teste t student: ***p<0.0001; considerado estatisticamente significativo). (B) As células foram deixadas aderir por 24 h em garrafas grandes e então, foram submetidas ao fracionamento subcelular (kit NE-PER) e, posteriormente, Western blotting. A lamina B foi utilizada como controle constitutivo nuclear, enquanto que β-tubulina, como constitutivo citoplasmático.

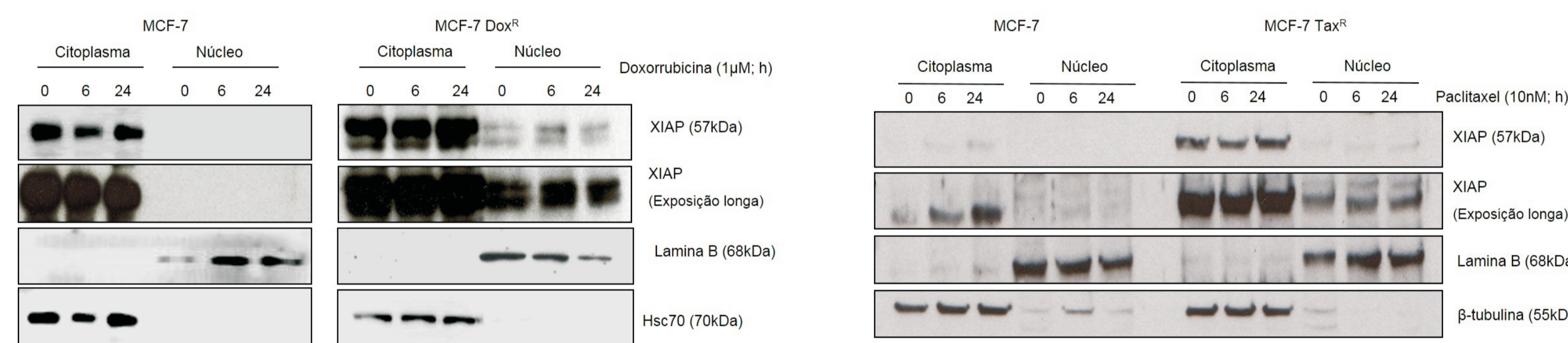


Figura 7: Localização subcelular de XIAP nas células MDA-MB-231, MCF-7, MCF-7 Dox^R e MCF-7 Tax^R após tratamento com doxorrubicina ou paclitaxel. As células foram deixadas aderir por 24 h em garrafas grandes e então, foram submetidas ao tratamento com a doxorrubicina ou paclitaxel por 6 e 24 h. Posteriormente, as proteínas nucleares e citoplasmáticas foram isoladas pelo kit NE-PER e analisadas por Western blotting. A lamina B foi utilizada como controle constitutivo nuclear, enquanto que β-tubulina ou Hsc70 como constitutivo citoplasmático.

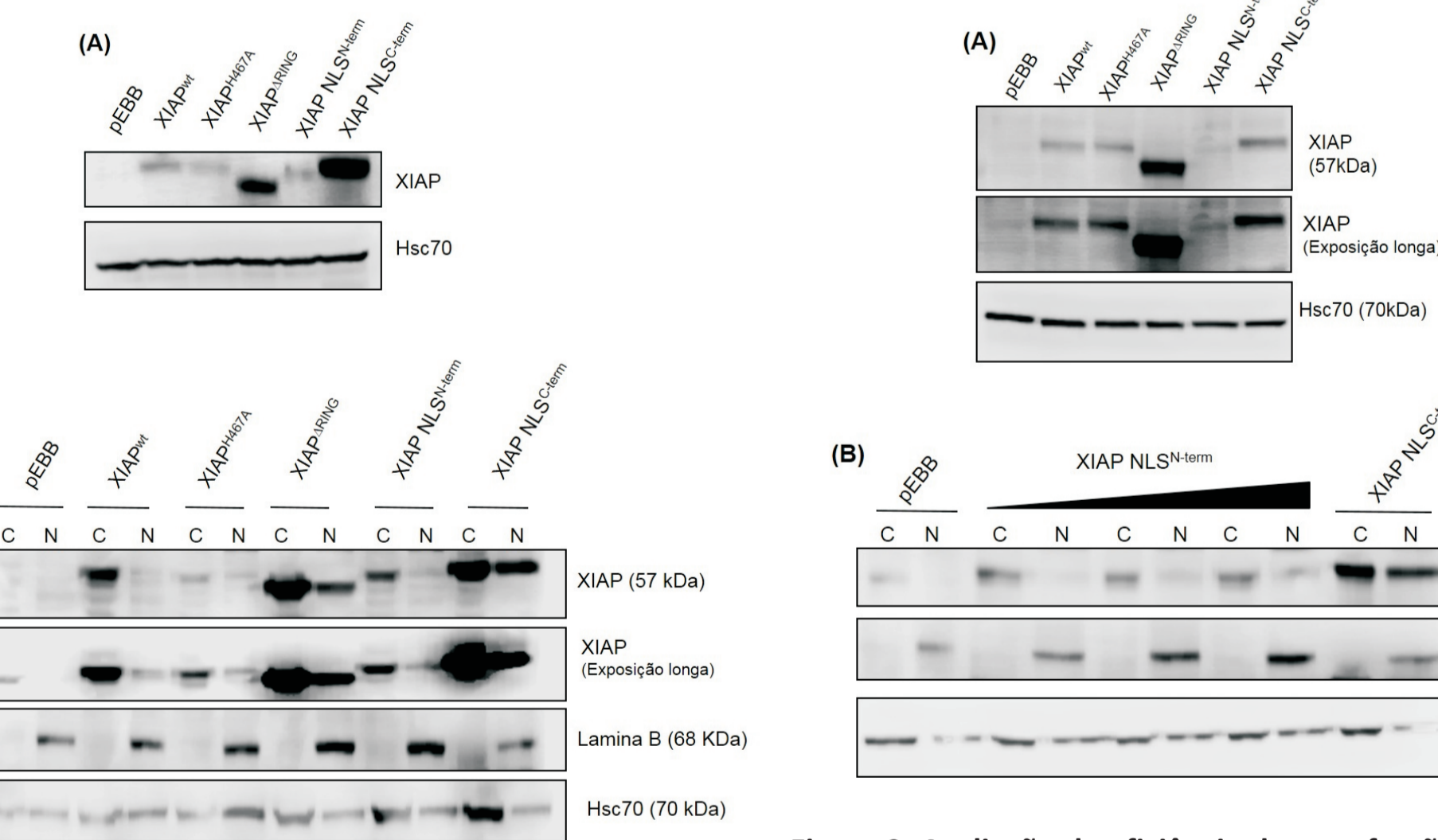


Figura 8: Avaliação da expressão e localização subcelular de XIAP em células MCF-7 superexpressando os vetores pEBB, XIAP^{WT}, XIAP^{H467A}, XIAP^{ΔRING} e XIAP NLS^{N-term}. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de petri (10cm) por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os vetores pEBB, XIAP^{WT}, XIAP^{H467A}, XIAP^{ΔRING} e XIAP NLS^{N-term}, utilizando Lipofectamina 2000. Posteriormente, extratos proteicos totais (A) e fracionados através do kit NE-PER (B) foram avaliados para a expressão de XIAP por Western blotting. A lamina B foi utilizada como controle constitutivo nuclear, enquanto que Hsc70 como constitutivo citoplasmático.

Figura 9: Avaliação da eficiência de transfecção plasmidial através da manipulação dos níveis de DNA internalizado nas células MCF-7. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de 6 poços por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os plasmídeos pEBB, XIAP^{WT}, XIAP^{H467A}, XIAP^{ΔRING} e XIAP NLS^{N-term}, utilizando Lipofectamina 2000. As células transfectadas foram, então, contadas através da exclusão por azul de tripan 24 h após a transfecção. O gráfico corresponde às médias e desvio padrão de três experimentos independentes (Teste t student: *p<0.05; ***p<0.0001; considerado estatisticamente significativo).

Figura 10: Efeito da indução da superexpressão de XIAP e seus mutantes no padrão de crescimento de células MCF-7. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de petri (10cm) ou placa de 6 poços por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os plasmídeos pEBB, XIAP^{WT}, XIAP^{H467A}, XIAP^{ΔRING} e XIAP NLS^{N-term}, utilizando Lipofectamina 2000. As células transfectadas foram, então, contadas através da exclusão por azul de tripan 24 h após a transfecção. O gráfico corresponde às médias e desvio padrão de três experimentos independentes (Teste t student: *p<0.05; ***p<0.0001; considerado estatisticamente significativo).

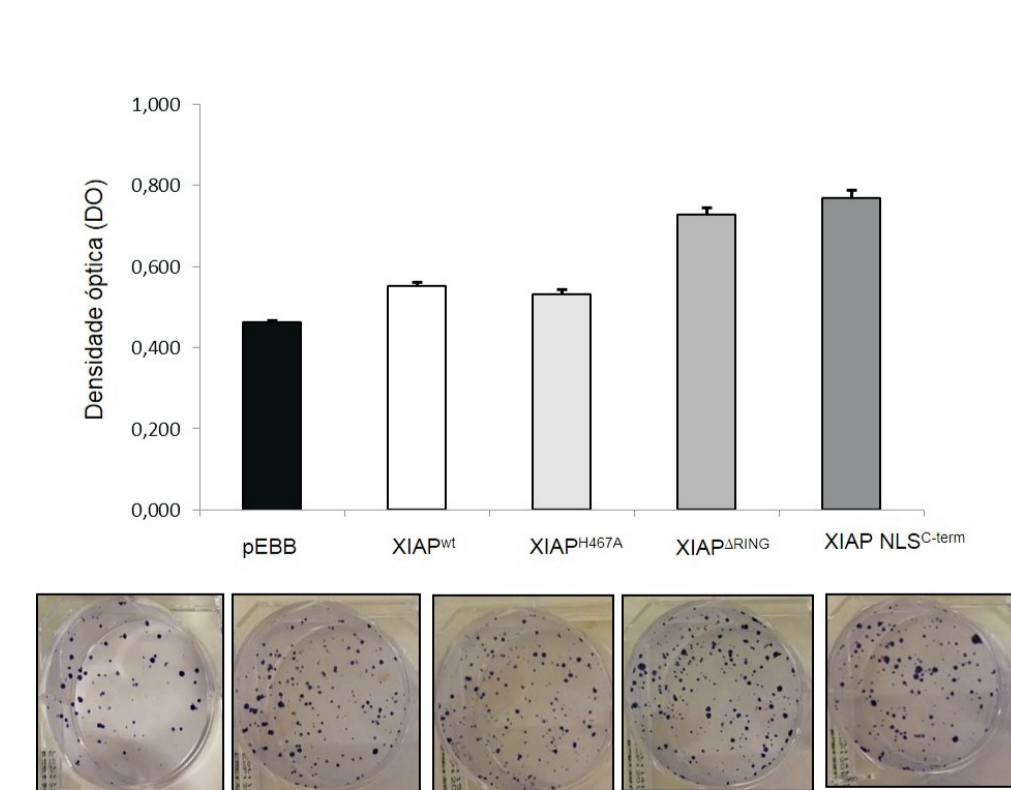


Figura 11: Efeito da indução da superexpressão de XIAP e seus mutantes na formação de colônias de células MCF-7. As células foram transfectadas com os vetores pEBB, XIAP^{WT}, XIAP^{H467A}, XIAP^{ΔRING} e XIAP NLS^{N-term} e replaqueadas em placas de seis poços. Posteriormente, as células foram deixadas aderir por cerca de 14 dias, e então, marcadas com cristal violeta. O gráfico é representativo de um experimento e as barras técnicas mostram as triplicatas dentro do mesmo experimento.

Figura 12: Alterações na viabilidade celular induzidas pela doxorrubicina (dox) em células MCF-7 transfectadas com os vetores pEBB, XIAP^{WT}, XIAP^{H467A}, XIAP^{ΔRING} e XIAP NLS^{N-term}. As células MCF-7 foram deixadas aderir em placas de petri (10cm) ou placa de 6 poços por 24 h e posteriormente, foram transfectadas com os plasmídeos pEBB, XIAP^{WT}, XIAP^{H467A}, XIAP^{ΔRING} e XIAP NLS^{N-term}, utilizando Lipofectamina 2000. No dia seguinte, as células MCF-7 foram replaqueadas em placas de 96 poços e deixadas aderir por 24 h. Posteriormente, as células foram expostas a 1 µM dox por 24 h. Para cada vetor, as linhagens celulares tratadas com a dox foram comparadas ao seu controle de células não tratadas. O gráfico corresponde às médias e desvio padrão de dois experimentos independentes.

Figura 13: Figura esquemática da associação entre a localização nuclear de XIAP e seu papel oncogênico no câncer de mama. A expressão de XIAP pode ser encontrada em diferentes compartimentos subcelulares em linhagens celulares e amostras de pacientes. A expressão estritamente citoplasmática pode estar associada a um fenótipo de sensibilidade às drogas em linhagens celulares, bem como a sobrevida global aumentada em pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama. Por outro lado, a presença de XIAP nuclear se correlaciona a um fenótipo de resistência às drogas *in vitro* e a um prognóstico desfavorável, apontando para um papel oncogênico no câncer de mama.