

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FARMACOLOGIA
E TERAPÊUTICA

Leonardo Horbach

**AVALIAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA
TUMORAL DE SARCOMA DE EWING**

Porto Alegre

2017

Leonardo Horbach

**AVALIAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA
TUMORAL DE SARCOMA DE EWING**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Prof.^a Caroline Brunetto de Farias, PhD

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Horbach, Leonardo

Avaliação de Alvos Moleculares Envolvidos na Resistência Tumoral de Sarcoma de Ewing / Leonardo Horbach. -- 2017.

51 f.

Orientadora: Dra. Caroline Brunetto de Farias.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Ewing Sarcoma. 2. molecular target. 3. drug resistance. 4. doxorubicin. 5. vincristine. I. Brunetto de Farias, Dra. Caroline, orient. II. Título.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | 5 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 6 |
| RESUMO..... | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 SARCOMA DE EWING | 10 |
| 1.1.1 Definição e epidemiologia | 10 |
| 1.1.2 Bases moleculares | 11 |
| 1.1.3 Diagnóstico e tratamento | 12 |
| 1.1.4 Doxorrubicina | 13 |
| 1.1.5 Vincristina | 14 |
| 1.2 RESISTÊNCIA TUMORAL | 15 |
| 1.2.1 Mecanismos gerais..... | 16 |
| 1.2.2 Mecanismos específicos à doxorrubicina | 18 |
| 1.2.1 Mecanismos específicos à vincristina..... | 19 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 21 |
| 3 OBJETIVOS | 21 |
| 3.1 GERAL | 21 |
| 3.2 ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 4 ARTIGO | 22 |
| 5 DISCUSSÃO GERAL | 41 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 45 |
| REFERÊNCIAS | 47 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens de microscopia demonstrando células de Sarcoma de Ewing

Figura 2: Translocações descritas em Sarcoma de Ewing. Translocações envolvendo o gene EWS e os genes da família ETS.

Figura 3. Esquema representativo dos fatores múltiplos envolvidos na resistência quimioterápica

Figura 4: Principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento de MDR

Figura 5: Vias envolvidas na seleção de resistência à doxorrubicina

Figura 6: Mecanismos de resistência a agentes ligantes de tubulina (ALT)

Figura 7: Rede de interação proteína-proteína entre genes com expressão alterada em células resistentes à doxorrubicina em Sarcoma de Ewing

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: ATP-binding Cassete

ALT: Agentes ligantes da tubulina

ATP: Adenosina trifosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

ES: Sarcoma de Ewing

ESFT: Família tumoral de Sarcoma de Ewing

ETS: Família de transcriptores ETS

EWSR1: Proteína ligante ao RNA EWS 1

FISH: Hibridação *in situ* por fluorescência

FLI-1: Friend Leukemia Integration 1

HHF35: Anticorpo monoclonal anti-actina muscular

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LDH: Lactato Desidrogenase

MCF-7: Linhagem celular de câncer de mama

MDR: Resistência a múltiplas drogas

mRNA: RNA mensageiro

MRPS: Proteínas associadas a resistência a múltiplas drogas

MXR: Proteína Resistente a Multixenobióticos

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

P-gp: glicoproteína P

qPCR: PCR quantitativo

RNA: Ácido ribonucleico

RTK: Receptores tirosina-quinase

RT-PCR: PCR Transcriptase Reversa

TAD: Sítio de ativação transcricional

RESUMO

O Sarcoma de Ewing (ES) é um raro tumor de ossos e tecidos moles com uma característica translocação cromossomal, a fusão EWS/FLI-1, que atua sobre diversos processos oncogênicos. O desenvolvimento da resistência à quimioterapia é comum no tumor e continua como uma das principais causas na falha do tratamento. O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão de genes após a indução de resistência em linhagens celulares de ES. Foi selecionado um conjunto de genes (CCAR1, TUBA1A, POLDIP2, SMARCA4 e SMARCB1) a partir da mineração da literatura em resistência tumoral para duas drogas utilizadas na terapia de ES, doxorrubicina e vincristina. Descrevemos a expressão de cada gene selecionado antes e após as linhagens SK-ES-1 serem submetidas a um protocolo de indução de resistência para ambos os fármacos, que obteve êxito ao induzir as células à resistência. A expressão relativa dos níveis de mRNA foi avaliada e foi encontrada em maior expressão para os genes SMARCA4, SMARCB1 e POLDIP2, e em menor expressão para os genes TUBA1A e CCAR1, quando comparadas às linhagens de controle não-resistentes de cada quimioterápico. Os resultados sugerem o envolvimento de mecanismos de reparo de dano ao DNA, remodelamento de cromatina via SWI/SNF, atividade de microtúbulos e atividade spliceossomal nos processos de resistência quimioterápica em ES.

Palavras-chave: Sarcoma de Ewing; alvos moleculares; resistência; doxorrubicina; vincristina;

ABSTRACT

Ewing Sarcoma (ES) is a rare bone and soft tissue tumor with a characteristic chromosomal translocation, the fusion protein EWS/FLI-1, that drives several oncogenic processes. The development of resistance to chemotherapy is common and remains as the main cause of treatment failure. The goal of this study was to evaluate the expression of selected genes in ES cell lines after induction of resistance. A set of genes (CCAR1, TUBA1A, POLDIP2, SMARCA4 and SMARCB1) was data mined from tumoral resistance literature for two drugs used in ES therapy, doxorubicin and vincristine. We describe the expression of each selected gene before and after SK-ES-1 cell lines were exposed to a drug resistance inducing protocol for doxorubicin and vincristine. Cell lines were successfully induced to be resistant to doxorubicin and vincristine. The relative mRNA expression levels were upregulated for genes SMARCA4, SMARCB1 and POLDIP2 and downregulated for genes TUBA1A and CCAR1, when comparing resistant and non-resistant ES cell lines for each drug. The results suggest involvement of repair pathways, SWI/SNF chromatin remodeling, microtubule and spliceosomal activity processes in drug resistance mechanisms in ES.

Keywords: Ewing Sarcoma; molecular target; drug resistance; doxorubicin; vincristine;

1 INTRODUÇÃO

1.1 SARCOMA DE EWING

1.1.1 Definição e epidemiologia

O Sarcoma de Ewing pertence à classe das neoplasias conhecida como de pequenas células redondas e azuis (Figura 1). A origem deste tumor ainda não está definida, entretanto, alguns estudos indicam que pode ser oriundo de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. (BETHESDA, 2015).

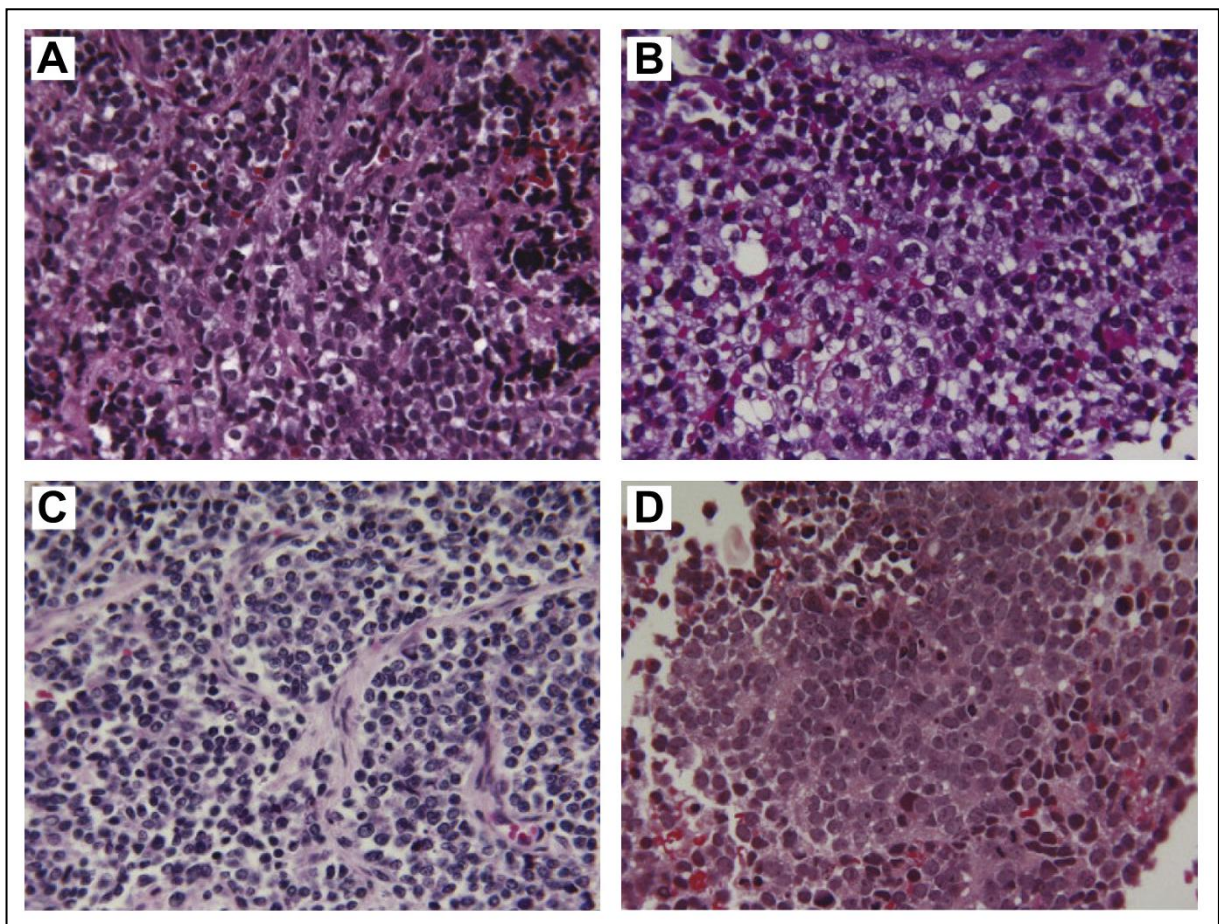


Figura 1: Imagens de microscopia demonstrando células de Sarcoma de Ewing. (A) Núcleos azuis, grandes e anfófilos. (B) Células tumorais em aumento diferenciado, citoplasma claro a anfófilo. (C) Núcleos monótonos e uniformes em agrupamentos alveolares (D) Fotografia de alta-potência demonstrando células tumorais não apoptóticas (COTE & CHOY, 2013).

O Sarcoma de Ewing é o segundo tipo mais frequente de neoplasia de ossos e tecidos moles em crianças e jovens adultos, precedido apenas pelo osteosarcoma, e pode estar localizado no osso ou em tecidos moles como tronco, extremidades, cabeça e pescoço, retroperíneo e outros (YANG *et al.*, 2010).

São alguns fatores de prognóstico o sítio do tumor, tamanho ou volume, idade do paciente, sexo, níveis de LDH sérico, metástase, tratamentos posteriores, perfil citogenético e detecção de níveis de transcritos de fusão na medula óssea, contribuindo para melhor ou pior evolução da doença (BETHESDA, 2015).

1.1.2 Bases moleculares

O Sarcoma de Ewing apresenta uma alteração citogenética no *loco* EWSR1 no cromossomo 22 banda q12 envolvendo outros cromossomos, incluindo o cromossomo 11 e 21. Ocorre uma fusão do gene EWSR1 com, mais comumente, o gene FLI-1 do cromossomo 11 banda q24, da família ETS, resultando na fusão EWS/FLI-1 (BETHESDA, 2015). O novo arranjo genômico é responsável pela ativação de oncogenes, repressão de supressores tumorais e remodelamento da cromatina, contribuindo para o desenvolvimento da doença (BALAMUTH e WOMER, 2010; RIGGI *et al.*, 2014). O produto da fusão pode ser detectado por técnicas de hibridização *in situ* por imunofluorescência (FISH) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (INCA, 2017).

Apesar da fusão EWS/FLI-1 ser mais frequente, várias outras interações menos comuns entre os dois genes têm sido identificadas, onde cerca de 10-20% dos casos envolve genes alternativos da família ETS como componentes da translocação. Em todos os casos, o sítio de ativação transcricional (TAD, em inglês) do terminal-N do gene EWS se funde ao terminal-C do sítio de ligação ao DNA (DBD, em inglês) da família ETS (Figura 2). Associações entre o tipo de fusão e o prognóstico foram relatadas anteriormente a partir da análise de arquivos de tumores. Pacientes com fusão EWS/FLI-1 apresentaram sobrevida global significativamente mais alta em comparação com outros tipos de fusão (SHUKLA *et al.*, 2013; CROMPTON *et al.*, 2014). Além disso, o grau de diferenciação também pode influenciar a malignidade da doença, e parece estar relacionado à progressão tumoral, à resistência quimioterápica e a fatores epigenéticos (CORNAZ-BUROS *et al.*, 2014; SHEFFIELD *et al.*, 2017).

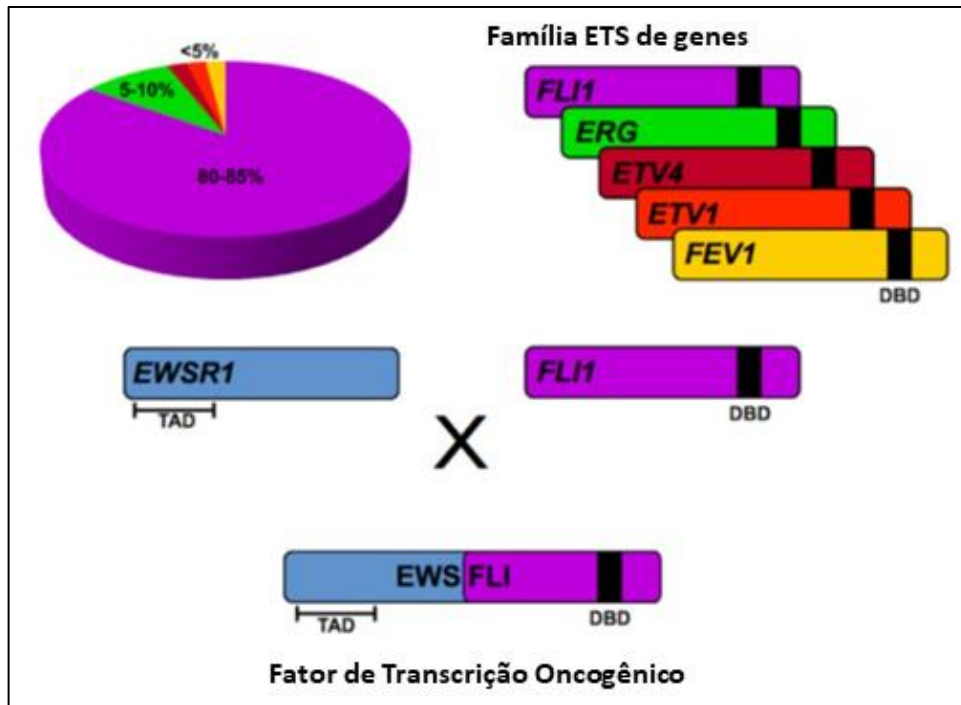


Figura 2: Translocações descritas em Sarcoma de Ewing. Translocações envolvendo o gene EWS e os genes da família ETS. (adaptado de MONUMENT *et al.* (2012)).

1.1.3 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico ocorre através de biópsia e exames imunohistoquímicos para avaliação da expressão dos marcadores CD99, FL1, HHF35, desmina e sinaptofisina (WERNER *et al.*, 2005), embora não sejam específicos para Sarcoma de Ewing. A complementaridade do diagnóstico pode ser realizada através de exames radiológicos visualizando lesões características (INCA, 2017).

O tratamento pode incluir cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo esta última responsável por uma melhora na sobrevida de 10% para 75-80%, em casos localizados (BALAMUTH e WOMER, 2010; COTE e CHOY, 2013). Nos casos metastáticos, o efeito dos quimioterápicos reduz drasticamente e as taxas de sobrevida caem para aproximadamente 20% (GROHAR e HELMAN, 2013).

Atualmente, há três principais protocolos de tratamento de Sarcoma de Ewing, sendo um europeu, um norte-americano e o protocolo Sul-Americano, desenvolvido colaborativamente entre os países Argentina, Brasil, Chile e Uruguai e coordenado pelo Instituto do Câncer Infantil. O protocolo foi inicialmente definido pelo estudo EWING1 (BRUNETTO *et al.*, 2015) e consiste em dois ciclos de ICE (ifosfamida, carboplatina e etoposídeo), seguido de dois ciclos de VDC (vincristina, doxorrubicina e ciclofosfamida) e posterior tratamento local via cirurgia e/ou radioterapia. Recentemente, o protocolo encontra-se em processo de atualização (estudo EWING2, ainda em andamento) e passará a tratar de forma diferenciada os pacientes com e sem metástase, além de dispor de uma terapia metronômica anti-angiogênica, de doses baixas e sem períodos de descanso, com o objetivo de tratar os casos não responsivos à quimioterapia tradicional.

Dos quimioterápicos disponíveis utilizados nos tratamentos do Sarcoma de Ewing, duas das drogas mais importantes são a doxorrubicina e a vincristina, com mecanismos distintos tanto de ação quanto de resistência.

1.1.4 Doxorrubicina

A doxorubicina, antibiótico citotóxico da classe das antraciclinas isolado do microorganismo *Streptomyces peucetius*, tem como principal mecanismo de ação a intercalação no DNA e interrupção do mecanismo de reparo pela enzima Topoisomerase II, resultando em dano excessivo ao DNA e morte celular (THORN *et al.*, 2011). A intercalação no DNA resulta em super-enovelamento, causando a desestabilização de nucleotídeos via acúmulo de tensão torcional. Esse processo é atenuado pela Topoisomerase II, mas, como a enzima tem seu funcionamento comprometido pela droga, o estresse é evidenciado (PANG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2014). Ainda, a droga é capaz de promover o afastamento de histonas, alterando mecanismos transcriptômicos e epigenéticos celulares, com seletividade por exons e regiões promotoras de transcrição. A ligação de sua molécula com o DNA gera uma competição por espaço com as histonas responsáveis pela estabilização dos nucleotídeos, podendo também influenciar negativamente o mecanismo de reparo de DNA e levar a célula à morte. O processo faz com que a cromatina permaneça aberta, facilitando a ocorrência de danos adicionais ao DNA por efeitos como estresse oxidativo, causados inclusive pelo efeito da droga sobre as células (PANG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2014).

Apesar dos efeitos terapêuticos, a doxorubicina tem como importante efeito adverso a cardiotoxicidade, isto porque, a droga atua afetando principalmente os miócitos com dano conseqüente à função sistólica ventricular esquerda, além de miocardite, pericardite, arritmias e insuficiência cardíaca (RAZAVI-AZARKHIAVI *et al.*, 2017). Os sintomas podem levar semanas ou meses para se manifestarem, apesar dos efeitos tóxicos nas células cardíacas surgirem a partir da primeira dose. Ações contra a cardiotoxicidade podem incluir redução de dose, infusão prolongada, formulações diferenciadas da doxorubicina e/ou uso concomitante de bloqueadores beta ou inibidores da ECA (EWER e EWER, 2015).

1.1.5 Vincristina

Amplamente utilizado em tratamentos de Sarcoma de Ewing, o fármaco vincristina é um alcalóide isolado da planta *Vinca rosea*. Trata-se de um agente desestabilizador de tubulinas que impossibilita a criação dos fusos mitóticos, cessando o ciclo celular na metáfase e levando a apoptose (KAVALLARIS, 2010; BOSILKOVSKA *et al.*, 2015). Por ter efeito dose-dependente, em baixas concentrações a vincristina imobiliza o aparelho mitótico, resultando em falha do processo de separação cromossomal. Em altas concentrações, há ruptura e despolimerização total dos microtúbulos. A exposição em longo prazo acaba por produzir efeito citotóxico contínuo (GIDDING *et al.*, 1999). Estudos demonstram que, além do seu efeito sobre os microtúbulos, a vincristina pode se ligar diretamente ao DNA e à cromatina, inclusive promovendo o afastamento de histonas (MOHAMMADGHOLI *et al.*, 2013), similar à doxorubicina. Ainda, há evidências de atuação também sobre a topoisomerase II, considerando que células resistentes à vincristina apresentam reduzida expressão da enzima (SKLADANOWSKI *et al.*, 2005).

Todavia, o uso da vincristina ocasiona o surgimento de efeitos adversos, sendo os mais relevantes a mielosupressão e a neuropatia periférica. Efeito, este, possivelmente resultante da perda de microtúbulos, interferência na ligação de proteínas motoras aos microtúbulos, diferenças na dinâmica dos microtúbulos, retração neuronal, redução da responsividade dos neurônios ou sua desmielinização. Já as causas da mielosupressão podem estar relacionadas ao bloqueio da mitose e proliferação das células de medula óssea de alta ciclagem (JORDAN e WILSON, 2004).

Dessa forma, observa-se que a terapia nem sempre é bem sucedida. Além dos efeitos colaterais das drogas, muitas vezes debilitantes e complicadores do tratamento, há o surgimento de resistência por parte dos tumores, seja esta intrínseca ou adquirida (AHMED *et al.*, 2014).

1.2 RESISTÊNCIA TUMORAL

Conforme Housman e colaboradores (2014), a resistência tumoral é um processo conhecido onde tanto tumores quanto outras doenças param de responder aos tratamentos farmacológicos. O mecanismo foi inicialmente descrito quando bactérias se tornaram resistentes aos antibióticos. Atualmente, considera-se o processo de resistência um fenômeno multifatorial que demanda atenção tanto ao paciente quanto à doença (ALFAROUK *et al.*, 2015) (Figura 3).

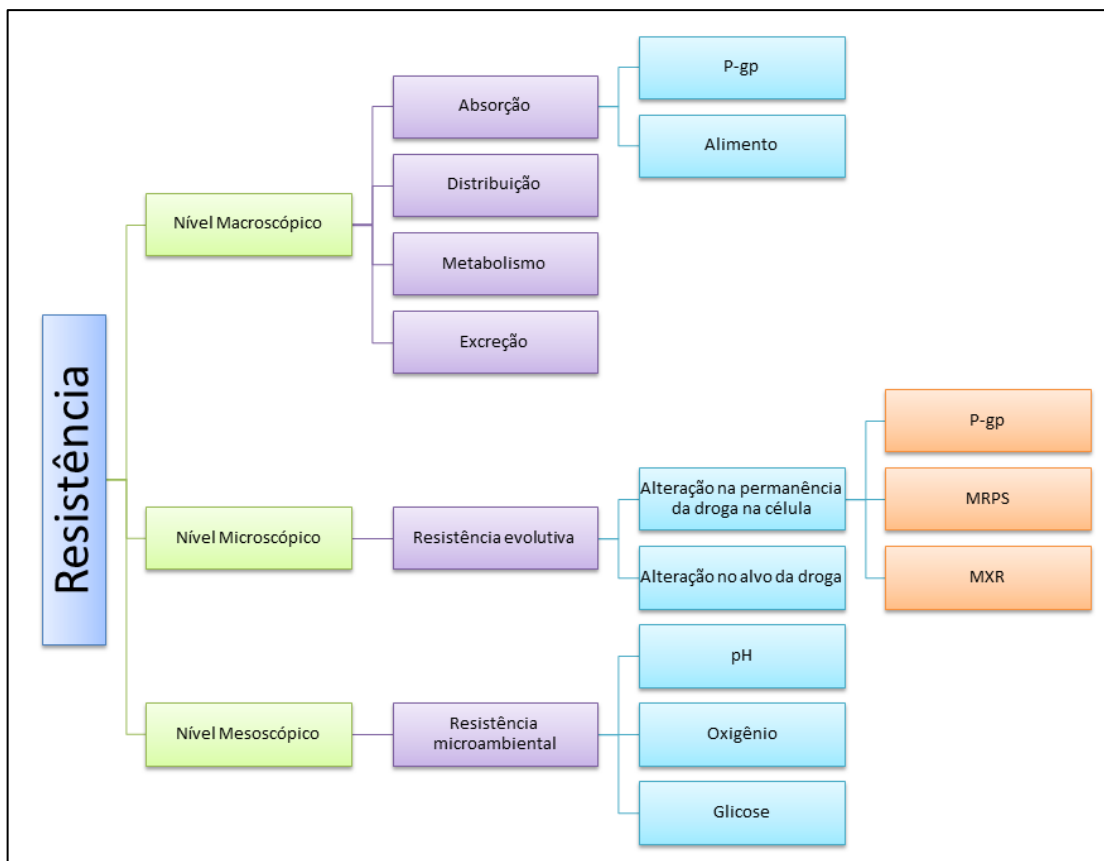


Figura 3. Esquema representativo dos fatores múltiplos envolvidos na resistência quimioterápica. A resistência quimioterápica é um processo multifatorial, envolvendo níveis macro, micro e mesoscópicos. Em nível macroscópico, destaca-se fatores farmacocinéticos como absorção, distribuição, metabolismo e excreção, onde já entram as bombas de efluxo

vistas anteriormente (no mecanismo da doxo), que dificultam a absorção. Em nível microscópico os mecanismos de resistência múltipla, bombas de efluxo e processos de resistência a múltiplos xenobióticos (adaptado de (ALFAROUK *et al.*, 2015)).

O enfrentamento da resistência aos quimioterápicos pode ter dois lados; assim como as células cancerígenas devem perder seus mecanismos de tolerância para sofrerem os efeitos dos fármacos, as células normais devem manter esses mesmos mecanismos para permanecerem protegidas aos danos. Das células nessa última categoria, destacam-se principalmente as células da medula óssea, cuja destruição é um dos limitantes de dose nos tratamentos de câncer. Sabendo que o tumor é composto naturalmente por células com diferentes perfis de resistência a ação da quimioterapia inicialmente destrói a maioria das células sensíveis às drogas, selecionando as mais resistentes. À medida que o tumor cresce, o tratamento tende a falhar visto que há uma quantidade reduzida de células com sensibilidade, gerando um tumor resistente (PERSIDIS, 1999). Os tumores podem apresentar diversos mecanismos distintos de resistência aos fármacos, podendo ser eles intrínsecos e/ou adquiridos (DAMIA e GARATTINI, 2014).

1.2.1 Mecanismos gerais

Diversos fatores celulares, vias metabólicas e marcadores genéticos ou epigenéticos estão envolvidos no processo de resistência tumoral, como por exemplo, as vias RTK (receptores tirosina-quinase e de necrose tumoral), Akt-PI3K (AHMED *et al.*, 2012; TSUBAKI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015), Topoisomerase II (RODRIGO *et al.*, 2011; ALPSOY *et al.*, 2014), cMYC e cJUN (LIN *et al.*, 2012; ZHUO *et al.*, 2014) que são descritas em diversos tipos de tumores.

O mecanismo de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR, em inglês), amplamente descrito, consiste na resistência tumoral a um determinado fármaco quimioterápico, acompanhada pela resistência a outras drogas que não necessariamente possuem estrutura ou mecanismo de ação similares. Os processos potencialmente envolvidos na MDR consistem em indução de apoptose, indução de autofagia, regulação via células-tronco tumorais, regulação de micro-RNAs, indução de hipóxia, reparo de dano ao DNA e regulação epigenética (Figura 4) (WU *et al.*, 2014).



Figura 4: Principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento de MDR (adaptado de de WU *et al.* (2014)).

A família de transportadores ABC (ATP-Binding Cassette, em inglês), é um grupo de 48 proteínas transmembrana responsável pelo efluxo das drogas para o exterior da célula. Três delas são amplamente descritas na literatura, e fazem parte do mecanismo de MDR: Glicoproteína-P (Pgp, codificada no gene ABCB1, também conhecida como MDR1 – Multidrug Resistance Protein 1), MDR-Associated protein 1 (MRP1, do gene ABCC1) e BCRP (Breast Cancer Resistance Protein, sintetizada pelo gene ABCG2). A proteína MDR1 é frequentemente encontrada super-expressa em diversos tumores e também pode ter sua expressão alterada pelo tratamento quimioterápico (DAMIA e GARATTINI, 2014).

Outro elemento importante encontrado em tumores, inclusive em Sarcoma de Ewing, é a presença de células-tronco tumorais. São células naturalmente quimioresistentes, capazes de difundirem a resistência através da seleção dessa linhagem via proliferação. Alguns mecanismos foram propostos para elucidar a tolerância quimioterápica, dentre os quais a quiescência (baixa ciclagem, ou seja, reprodução lenta e menos frequente; conseqüentemente, menos sujeita a efeitos que tenham como alvo, por exemplo, etapas do ciclo celular), aumento no reparo de danos de DNA (possíveis defeitos nos mecanismos de apoptose, ou exacerbação dos mecanismos de reparo), características anti-apoptose (células tumorais inibem as vias de apoptose expressando altos níveis de proteínas anti-apoptóticas), microRNAs (podem também suprimir vias de apoptose, como a p53) e contribuição para o desenvolvimento de MDR, aumentando e selecionando proteínas de efluxo e transportadores ABC (AHMED *et al.*, 2014).

1.2.2 Mecanismos específicos à doxorrubicina

Além dos processos de resistência comuns a diversos tipos de tumor, tanto à vincristina quanto doxorrubicina podem induzir resistência específica, conforme o sítio e o mecanismo de ação de cada droga. Os principais componentes envolvidos na resistência específica à doxorrubicina estão descritos na Figura 5. No estudo, os experimentos foram realizados em tumor mamário (células MCF-7) e as diferenças de expressão foram obtidas comparando linhagens celulares não resistentes a linhagens celulares resistentes. A especificidade dos processos à doxorrubicina foi evidenciada ao observar que a expressão relativa dos genes da linhagem MCF-7 tratada com doxorrubicina foi 2,5 vezes superior quando comparada à linhagem tratada com paclitaxel (VILLENEUVE *et al.*, 2006).

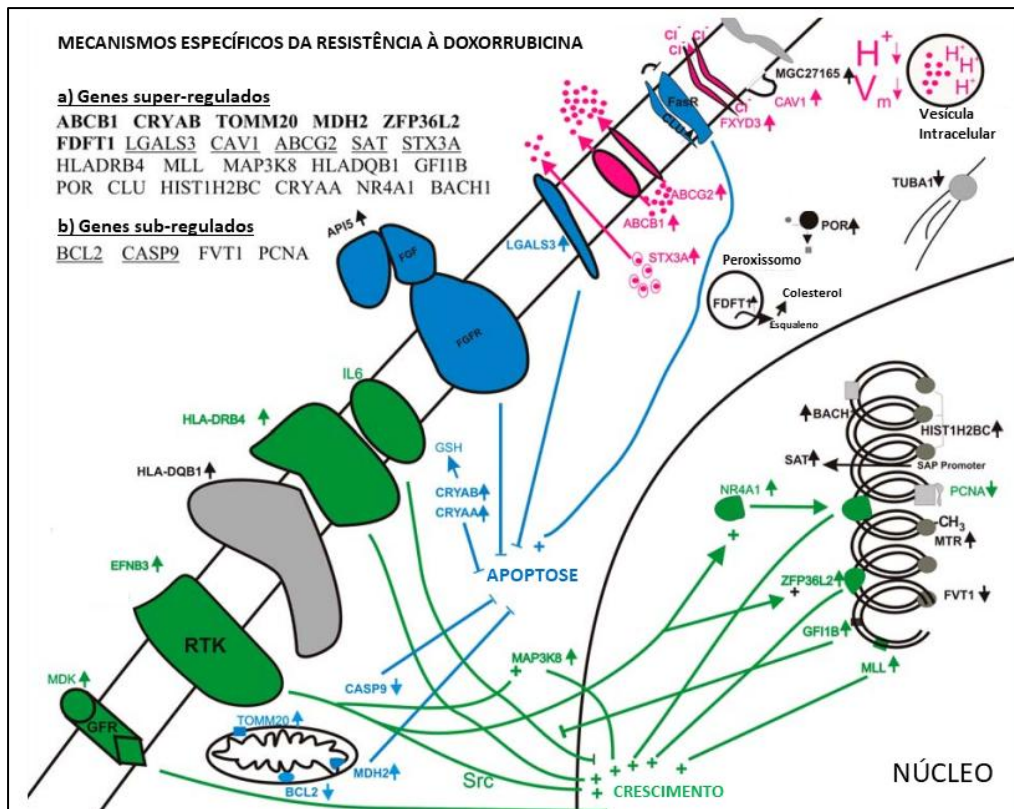


Figura 5: Vias envolvidas na seleção de resistência à doxorrubicina. Vias de apoptose em azul, de crescimento e proliferação em verde e de transporte de drogas em rosa. Os genes em negrito foram identificados por técnica de microarranjo e posteriormente confirmados por qPCR ou *immunoblotting*. Os genes sublinhados foram apenas confirmados por qPCR ou *immunoblotting* (adaptado de VILLENEUVE *et al.* (2006)).

1.2.1 Mecanismos específicos à vincristina

A vincristina, por atuar diretamente sobre a tubulina e os micronúcleos, desencadeia mecanismos específicos de resistência. Podem ser divididos em cinco categorias: mecanismo MDR envolvendo o efluxo das drogas para o exterior da célula e consequente baixa concentração citoplasmática do fármaco; alteração direta da tubulina via mutações induzidas pelo agente; aumento ou diminuição na expressão tanto de microtúbulos e proteínas associadas quanto da β -tubulina; alterações nos microtúbulos relacionadas a outras proteínas envolvidas de citoesqueleto, como γ -actina, que podem influenciar a habilidade dos agentes induzirem apoptose e defeitos nas vias de apoptose influenciam na resistência aos ALTs (Figura 6). Ainda, a expressão alterada da β III-Tubulina pode ser associada a altos níveis de

agressividade (malignidade, potencial de metástase e baixa diferenciação tumoral) e resistência quimioterápica em tumores. Há evidências do potencial da beta tubulina III como fator de sobrevivência celular, visto que sua expressão pode ser induzida em situações de estresse tais como hipóxia e deprivação de, inclusive quando induzidos por fármacos citotóxicos (KAVALLARIS, 2010).

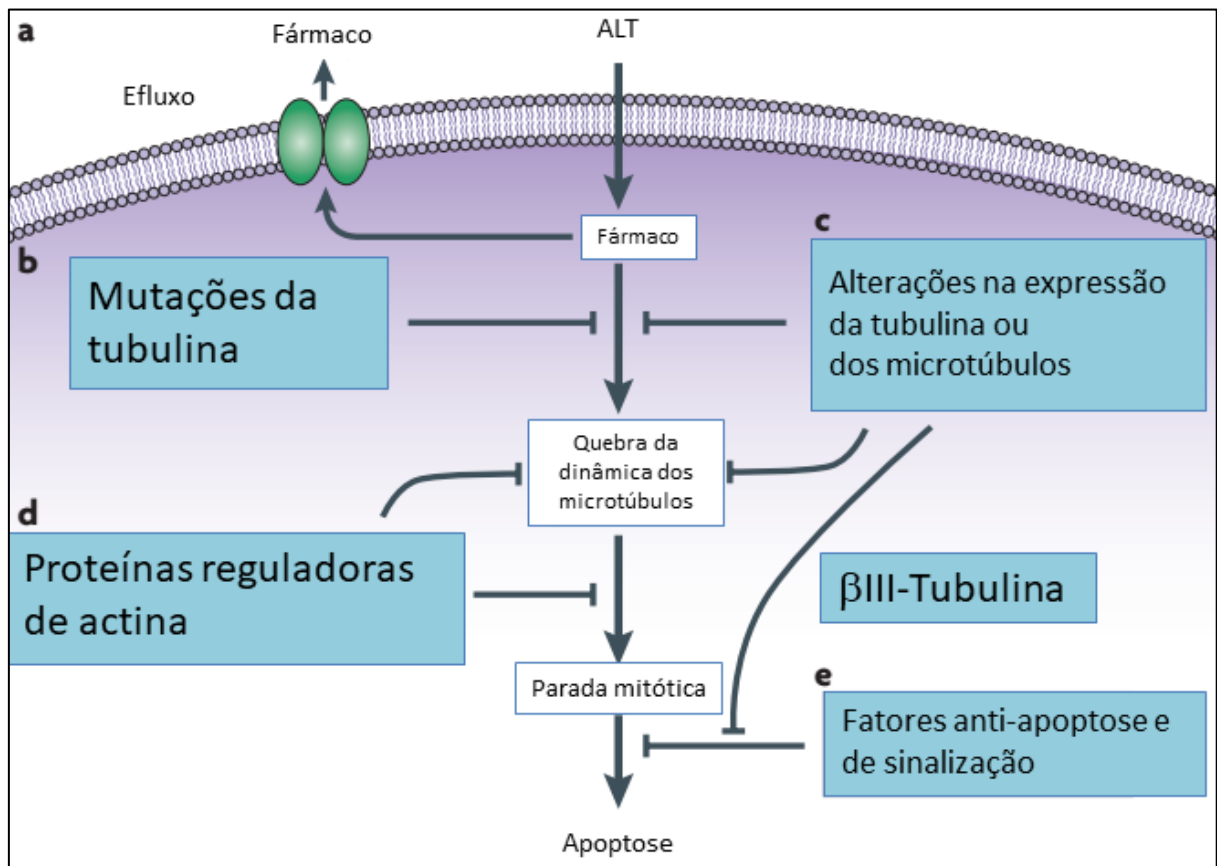


Figura 6: Mecanismos de resistência a agentes ligantes de tubulina (ALT). (adaptado de KAVALLARIS (2010)).

Apesar da evolução significativa no tratamento do Sarcoma de Ewing e aumento da sobrevida, a resistência aos fármacos administrados continua sendo um dos principais desafios da clínica do tumor.

2 JUSTIFICATIVA

O Sarcoma de Ewing, apesar de ser o segundo tipo mais comum de neoplasia de ossos e tecidos moles em crianças e jovens adultos, é um tumor de rara ocorrência. Nas publicações do INCA de 2008 e 2012 no Brasil, não há dados referentes ao tumor. Um levantamento feito por um estudo nos Estados Unidos da América reportou 906 casos ocorridos em um período de mais de 30 anos (ESIASHVILI *et al.*, 2008). Consequentemente, estudos a cerca do tumor ainda são pouco frequentes e grande parte da sua biologia não foi elucidada.

Entretanto, sabe-se que diversos alvos moleculares são potenciais atuantes em vias de tolerância à quimioterapia em Sarcoma de Ewing, apesar de seus mecanismos não estarem completamente esclarecidos. Dessa forma, um maior entendimento do papel desses alvos no desenvolvimento da resistência tumoral pode contribuir para a elaboração de estratégias de tratamento mais eficazes, que venham a proporcionar melhores desfechos na clínica dos pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a expressão dos alvos moleculares relacionados à resistência tumoral de fármacos quimioterápicos em linhagens celulares de Sarcoma de Ewing com e sem perfil de resistência.

3.2 ESPECÍFICOS

- Buscar, através de revisão literária e mineração de dados, alvos moleculares relacionados à resistência dos fármacos vincristina e doxorrubicina;
- Construir um banco de dados de resistência com os alvos moleculares validados experimentalmente e enriquecido com informações de bases de dados online;
- Induzir e manter linhagens celulares de Sarcoma de Ewing, SK-ES-1, com e sem resistência aos fármacos vincristina e doxorrubicina;
- A partir da extração de mRNA e produção de cDNA via RT-PCR, avaliar por qPCR a expressão dos alvos moleculares nas linhagens celulares com e sem resistência.

4 ARTIGO

Pediatric Blood & Cancer

**Gene Expression Changes Associated with Chemotherapy
Resistance in Ewing Sarcoma Cells**

| | |
|-------------------------------|--|
| Journal: | <i>Pediatric Blood & Cancer</i> |
| Manuscript ID | PBC-17-1246 |
| Wiley - Manuscript type: | Research Article |
| Date Submitted by the Author: | 09-Nov-2017 |
| Complete List of Authors: | Horbach, Leonardo; Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center Sinigaglia, Marialva ; Children`s Cancer Institute da Silva, Camila ; Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center; Federal University of Rio Grande do Sul Olguns, Danielly ; Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center Gregianin, Lauro ; Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Pediatric Oncology Service; Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Brunetto, Algemir; Children`s Cancer Institute, Chairman Brunetto, André ; Children`s Cancer Institute Roesler, Rafael; Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center; Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences de Farias, Caroline; Children`s Cancer Institute; Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center; Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences |
| Keywords: | Ewing Sarcoma, molecular target, Drug resistance, doxorubicin, vincristine |

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons

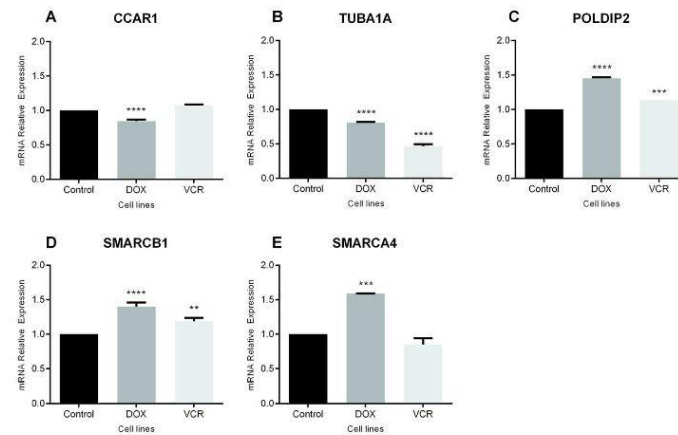


FIG. 1. Gene expression analysis of (A) CCAR1, (B) TUBA1A, (C) POLDIP2, (D) SMARCB1 and (E) SMARCA4. The values represent the relative expression of genes in doxorubicin and vincristine resistant Ewing Sarcoma cell line SK-ES-1 compared to non-resistant control. (1-way ANOVA; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$).

114x72mm (300 x 300 DPI)

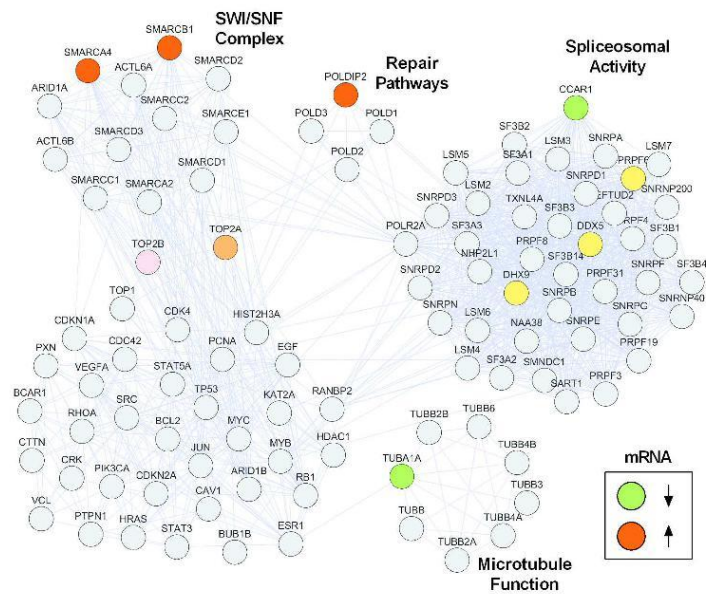
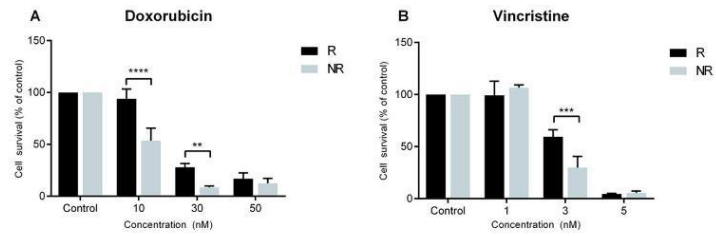


FIG. 2. Protein interaction network between genes involved in chemotherapeutic resistance. Genes selected for this study are represented in red or green according to higher or lower relative mRNA expression, respectively, between control and resistant ES cell line. Additionally, genes TOP2A and TOP2B were added and interact with the network for being targets for doxorubicin (in pink/orange). Genes involved with spliceosomal activity and EWS/FLI1 protein are in yellow. The network was constructed using STRING Database version 10.5.

169x140mm (300 x 300 DPI)



93x33mm (300 x 300 DPI)

Peer Review

RESEARCH ARTICLE

Gene Expression Changes Associated with Chemotherapy Resistance in Ewing Sarcoma Cells

Leonardo Horbach¹, Marialva Sinigaglia², Camila Alves da Silva¹, Danielly Brufatto Olguias¹, Lauro José Gregianin^{3,4}, Algemir Lunardi Brunetto², André Tesainer Brunetto², Rafael Roesler^{1,5}, Caroline Brunetto de Farias^{1,2,5*}

¹Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Children's Cancer Institute (ICI), Porto Alegre, RS, Brazil

³Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding Author: Caroline Brunetto de Farias, Email: labpesquisa@ici-rs.org.br

Word count:

Abstract: 183 words

Main text: 1,710 words

Figures: 2

Supplementary figures: 1

Running title: Chemotherapy Resistance in Ewing Sarcoma Cells

Key words: Ewing Sarcoma; molecular target; drug resistance; doxorubicin; vincristine;

For Peer Review

ABSTRACT

Background: Ewing Sarcoma (ES) is a rare bone and soft tissue tumor with a characteristic chromosomal translocation, the fusion protein EWS/FLI-1, that drives several oncogenic processes. The development of resistance to chemotherapy is common and remains as the main cause of treatment failure. The goal of this study was to evaluate the expression of selected genes in ES cell lines after induction of resistance.

Procedure: A set of genes (CCAR1, TUBA1A, POLDIP2, SMARCA4 and SMARCB1) was data mined from tumoral resistance literature for two drugs used in ES therapy, doxorubicin and vincristine. We describe the expression of each selected gene before and after SK-ES-1 cell lines were exposed to a drug resistance inducing protocol for doxorubicin and vincristine.

Results: Cell lines were successfully induced to be resistant to doxorubicin and vincristine. The relative mRNA expression levels were upregulated for genes SMARCA4, SMARCB1 and POLDIP2 and downregulated for genes TUBA1A and CCAR1, when comparing resistant and non-resistant ES cell lines for each drug.

Conclusions: The results suggest involvement of repair pathways, SWI/SNF chromatin remodeling, microtubule and spliceosomal activity processes in drug resistance mechanisms in ES.

INTRODUCTION

Ewing Sarcoma (ES) is a rare bone and soft tissue tumor with occurrence in children and young adults. Approximately 20-25% of cases are metastatic at diagnosis and survival rates are poor in the advanced setting.^{1,2} The tumor has a characteristic cytogenetic translocation of the EWSR1 (22q12) and FLI-1 (11q24) genes in approximately 90% of tumors. The resulting fusion protein EWS-FLI-1³ is responsible for oncogene activation, inhibition of tumor suppression, chromatin remodeling and epigenomic reprogramming.^{4,5}

Standard multimodality treatment consists of induction chemotherapy followed by local control with surgery and/or radiotherapy and then consolidation chemotherapy with multiple drugs. Active chemotherapy agents in the first line setting include doxorubicin, vincristine, cyclophosphamide, etoposide and ifosfamide. Treatment efficacy has reached a plateau after alkylator dose intensification and interval compression of all active agents^{6,7} in the last two decades. The development of resistance to chemotherapy⁸ is common and remains as the main cause of treatment failure.⁹ Cooperative groups have been looking at different chemotherapy combinations, dose-intensifying chemotherapy with bone-marrow transplantation, metronomic therapy and other synergistic mechanisms associated with the EWS fusion protein role in ES; however, these approaches have failed so far to improve survival rates in clinical trials.^{10,11}

Understanding the molecular mechanisms of chemotherapy resistance in ES may shed light to developing new agents with improved synergy. Doxorubicin belongs to the class of anthracyclines and acts in Topoisomerase II poisoning, creates double-strand DNA breaks, impairs DNA repair and supercoiling, which affects several epigenetic processes.^{12,13} Vincristine, a natural alkaloid extracted from *Vinca rosea*, interferes with microtubules formation and stability through depolymerization, resulting in cell cycle arrest and apoptosis^{14,15}. In addition to affecting chromatin stability¹⁶ by involvement in DNA binding and histone eviction, the drug also affects Topoisomerase IIa levels.¹⁷

In this study, we data mined the literature for tumoral resistance associated with drugs used in ES treatment, particularly doxorubicin and vincristine. Selected genes involved in resistance processes were evaluated via real time PCR to determine their role in ES.

METHODS

Data mining and refining

In order to select drug resistance genes, we searched for scientific tumoral resistance literature for studies involving drugs doxorubicin and vincristine for all tumor types. From an initial number of 240 genes, a database was catalogued with only molecular targets validated through experimentation. Then, it was further enriched with information from online tools, such as Drugbank, Gene Ontology and Uniprot and finally, a set of five genes was selected for evaluation.

Cell lines and treatment

Standard ATCC Ewing Sarcoma cell line, SK-ES-1, was cultured in RPMI Medium-1640 (Gibco®, USA) supplemented with 10% bovine serum, 4mg/mL gentamicin (Nova Farma, Brazil) and amphotericine B (Fungizone®, Invitrogen Life Technologies, USA).

Resistance induction

For chemotherapy resistance induction, cells underwent treatment for 72 h, with increasing drug concentration every two weeks, for a period of at least 10 weeks. Concentrations were 10, 20, 30, 40 and 50 nM for doxorubicin (Libbs, Brazil) and 0.5, 1, 2, 3 and 4 nM for vincristine (Pfizer, USA). A third untreated cell line served as control.⁹

Cellular proliferation assay

SK-ES-1 cells were seeded at a density of 2.10^4 cells per well in 48-well plates. After 24 h, they were treated with vincristine and doxorubicin, individually, including control. Concentrations for this treatment were 10, 30 and 50 nM for doxorubicin and 1, 3 and 5 nM for vincristine. The medium was removed after 72 h of treatment; cells were washed with PBS, detached with 0.25 % trypsin solution no EDTA (Invitrogen, USA) and then counted via trypan blue exclusion method in a hemocytometer.¹⁸ Mean of three experiments for each dose was utilized for calculations.

RNA extraction and cDNA synthesis

RNA was extracted using Trizol® (Invitrogen, USA) according to manufacturer protocol. cDNA was synthesized using RT-PCR kit Superscript™ III First-strand Synthesis Super Mix (Invitrogen, USA).

Real Time PCR conditions

Quantitative real time PCR was performed using AB 7500 system (Thermo Fisher, USA), with positive and negative controls. Reactions were prepared with KiCqStart® qPCR Ready Mix™ (Sigma Aldrich, USA), utilizing 0.5 uL sample cDNA. Expression levels were evaluated utilizing $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, with GAPDH used as housekeeping gene.

Statistical analysis

Statistical differences were analyzed using one-way ANOVA, with Sidak method for multiple comparison tests. Experiments were conducted three times and in triplicates. All statistical analyses were performed utilizing SPSS. Results were considered statistically significant when p-value < 0.05.

RESULTS

Data mining and gene selection

From our database, we selected the genes CCAR1, TUBA1A, POLDIP2, SMARCA4 and SMARCB1 for mRNA expression evaluation.

Drug resistance induction

Chemotherapy resistance was successfully induced for both doxorubicin and vincristine in SK-ES-1 cell line. Doxorubicin resistance was evidenced at 10 and 30 nM concentrations and vincristine, at 3 nM concentration (Supplementary Fig. S1).

Gene expression analysis

Gene expression analysis show there was a significant downregulation of CCAR1 and TUBA1A in doxorubicin resistant cell line, with low expression of TUBA1A also observed in the vincristine resistant cell line (Fig. 1A and Fig. 1B). In contrast, POLDIP2 was found upregulated in both resistant cell lines (Fig. 1C). For SMARCB1 and SMARCA4, gene expression was upregulated in doxorubicin resistant cell line related to control, although for vincristine, SMARCA4 remained similar to its control. (Fig. 1D and Fig. 1E).

Protein network integration

For better integration and visualization of our results, we built a protein network showing the interaction between the genes evaluated in this work, TOP2A (DNA-topoisomerase II alpha) as target of doxorubicin and genes directly

binding to EWS-FLI1 fusion protein in ES and related with spliceosomal activity (Fig. 2).

DISCUSSION

ES is an aggressive bone and soft tissue tumor and resistance to chemotherapy remains the main reason for treatment failure. In this study, we selected a group of genes (TUBA1A, POLDIP2, SMARCA4, SMARCB1 and CCAR1) known in other tumors to be involved in resistance processes for common drugs used in ES treatment and validate their expression in resistant ES cells.

We demonstrate that TUBA1A expression levels were lower in resistant cell lines when compared with the non-resistant cells, for both doxorubicin and vincristine. The results are compatible with the drugs method of action, either by interference in DNA replication or cell cycle interruption. Since vincristine is a microtubule-depolymerizing agent, resistance may develop from alteration in tubulin levels.¹⁹ Doxorubicin can interfere in TUBA1A levels, with lower gene expression being involved in resistance maintenance²⁰ and this corroborates to our findings.

Furthermore, we observed upregulation of POLDIP2 in doxorubicin and vincristine resistant ES cell line. POLDIP2 encodes a protein implicated in the activity of translesional polymerases Pol λ , Pol η , Rev1 and Rev7. POLDIP2 can also regulate the translesion synthesis polymerase and primer extension activities of PrimPol, demonstrating its role in DNA damage tolerance.²¹ This involvement in repair processes could explain increases in cell sensitivity to oxidative stress when POLDIP2 is silenced.²² In addition, it has an important role in DNA replication/repair and regulation of reactive oxygen species and participates in cytoskeletal reorganization as well as key pathways in cancer, such as autophagy and cell cycle.²³ Other studies have shown that POLDIP2 is found to be involved in vascular integrity and function,²⁴ along with vascular smooth cell migration and adhesion.²⁵ There is evidence of its role in cell viability, proliferation and cell cycle regulation in mouse.²³ All those processes

are important in tumor development and survival, and its upregulation in drug resistance cells may be contributing to increase tumor aggressiveness.

Both SMARCB1 and SMARCA4 are part of the SWI/SNF chromatin-remodeling complex, which recruits TOP2A to DNA and leads doxorubicin-induced double-strand breaks (DSB) and cell death (Fig. 2). The loss of the SWI/SNF complex results in drug resistance, including DSB and repair pathways.²⁶ Dubey and colleagues report that the knockdown of SMARCA4 and SMARCB1 led to increase in resistance;²⁷ however, our results show high expression levels for SMARCA4 and SMARCB1 in doxorubicin-resistant ES cell lines. This suggests that ES may have a different landscape. The oncogenic EWS-FLI1 fusion induces chromatin-remodeling patterns, stimulating or repressing enhancers and establishing a modified oncogenic regulatory and interaction network that could explain divergences in the drug resistance mechanism between different tumors.²⁸

Moreover, our results agree with data from another study, where the loss of SMARCB1 protein can be found in a very small percentage of ES patients and this may interfere favorably in outcomes. Perhaps the combination of EWSR1 translocation with SMARCB1 loss may increase treatment susceptibility, or ES specific therapy could have contributed with a favorable outcome for those patients.²⁹ Since this behavior is specific to ES, high expression levels found in our results can be related to resistance development or greater tumor aggressiveness post treatment.

CCAR1 is a biphasic regulator of cell growth and apoptosis and plays important role in tumorigenesis in gastric cancer³⁰ and hepatocellular carcinoma.³¹ CCAR1 can target gene activation by estrogen receptor (ER) and glucocorticoid receptor (GR) in breast cancer cells³² and androgen receptor (AR) in prostate cancer.³³ A study has demonstrated that the aberrant fusion EWS-FLI1 alters mRNA splicing in ES cells originating several protein isoforms implicated as an oncogenic process³⁴ and CCAR1 is associated with spliceosomal activity (Fig. 2). Here we demonstrate an unexpected decrease in CCAR1 expression levels for the doxorubicin resistant cell line, therefore, additional data is required to

elucidate how this gene behavior in ES is related to chemotherapy resistance and alternative splicing.

Although the genes selected in this study have different functions and are involved in very diverse pathways, the integration network in (Fig. 2) demonstrates there is a connection between those mechanisms. Therefore, repair pathways, SWI/SNF chromatin remodeling, microtubule and spliceosomal activity processes may be interacting to maintain drug resistance mechanisms in ES. The EWS/FLI-1 fusion may also be modifying the tumor environment, changing the behavior of genes in ES

In summary, our results demonstrate there are differences between resistant and non-resistant SK-ES-1 cell line for this set of genes, suggesting their involvement in the resistance development mechanism. Gene knockout assays and resistance pathways evaluation may be the next step for validation of their role and further analysis utilizing patient's samples along with standard cell lines are encouraged.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by PRONON/Ministry of Health, Brazil (number 25000.162.034/2014-21 to C.B.F); the Rafael Koff Acordi Research Fund, Children's Cancer Institute (ICI); and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/ HCPA - 150419).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Grohar PJ, Helman LJ. Prospects and challenges for the development of new therapies for Ewing sarcoma. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013;137(2):216-224.
2. Casaroto AR, MB DASS, Soares CT, et al. Ewing's Sarcoma Family Tumors in the Jaws: Case Report, Immunohistochemical Analysis and Literature Review. *In vivo (Athens, Greece)*. 2017;31(3):481-491.
3. Bethesda MN. National Cancer Institute: PDQ® Ewing Sarcoma Treatment. 2015. Accessed 11/07/2015.
4. Balamuth NJ, Womer RB. Ewing's sarcoma. *The Lancet Oncology*. 2010;11(2):184-192.
5. Sheffield NC, Pierron G, Klughammer J, et al. DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. *Nat Med*. 2017;23(3):386-395.
6. Womer RB, West DC, Krailo MD, et al. Randomized controlled trial of interval-compressed chemotherapy for the treatment of localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(33):4148-4154.
7. Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *The New England journal of medicine*. 2003;348(8):694-701.
8. Ahmed A, Zia H, Wagner L. Therapy resistance mechanisms in Ewing's sarcoma family tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;73(4):657-663.
9. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(23):34860-34880.
10. Anderson PM, Bielack SS, Gorlick RG, et al. A phase II study of clinical activity of SCH 717454 (robatumumab) in patients with relapsed

- osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Pediatric blood & cancer*. 2016;63(10):1761-1770.
11. Wagner LM, Fouladi M, Ahmed A, et al. Phase II study of cixutumumab in combination with temsirolimus in pediatric patients and young adults with recurrent or refractory sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatric blood & cancer*. 2015;62(3):440-444.
 12. Pang B, Qiao X, Janssen L, et al. Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. *Nature communications*. 2013;4:1908.
 13. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1845(1):84-89.
 14. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature reviews Cancer*. 2010;10(3):194-204.
 15. Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS. Vincristine revisited. *Critical reviews in oncology/hematology*. 1999;29(3):267-287.
 16. Mohammadgholi A, Rabbani-Chadegani A, Fallah S. Mechanism of the interaction of plant alkaloid vincristine with DNA and chromatin: spectroscopic study. *DNA and cell biology*. 2013;32(5):228-235.
 17. Skladanowski A, Come MG, Sabisz M, Escargueil AE, Larsen AK. Down-regulation of DNA topoisomerase IIalpha leads to prolonged cell cycle transit in G2 and early M phases and increased survival to microtubule-interacting agents. *Molecular pharmacology*. 2005;68(3):625-634.
 18. Flores DG, de Farias CB, Leites J, et al. Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 Glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Current neurovascular research*. 2008;5(2):99-105.
 19. Huzil JT, Chen K, Kurgan L, Tuszynski JA. The roles of beta-tubulin mutations and isotype expression in acquired drug resistance. *Cancer informatics*. 2007;3:159-181.
 20. Villeneuve DJ, Hembruff SL, Veitch Z, Cecchetto M, Dew WA, Parissenti AM. cDNA microarray analysis of isogenic paclitaxel- and doxorubicin-resistant breast tumor cell lines reveals distinct drug-specific genetic signatures of resistance. *Breast cancer research and treatment*. 2006;96(1):17-39.

21. Guillian TA, Bailey LJ, Brissett NC, Doherty AJ. PoldIP2 interacts with human PrimPol and enhances its DNA polymerase activities. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(7):3317-3329.
22. Maga G, Crespan E, Markkanen E, et al. DNA polymerase delta-interacting protein 2 is a processivity factor for DNA polymerase lambda during 8-oxo-7,8-dihydroguanine bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(47):18850-18855.
23. Brown DI, Lassegue B, Lee M, et al. Poldip2 knockout results in perinatal lethality, reduced cellular growth and increased autophagy of mouse embryonic fibroblasts. 2014(1932-6203 (Electronic)).
24. Sutliff RL, Hilenski LL, Amanso AM, et al. Poldip2 sustains vascular structure and function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2013;33(9):10.1161/ATVBAHA.1113.301913.
25. Datla SR, McGrail DJ, Vukelic S, et al. Poldip2 controls vascular smooth muscle cell migration by regulating focal adhesion turnover and force polarization. 2014(1522-1539 (Electronic)).
26. Wijdeven RH, Pang B, van der Zanden SY, et al. Genome-Wide Identification and Characterization of Novel Factors Conferring Resistance to Topoisomerase II Poisons in Cancer. 2015(1538-7445 (Electronic)).
27. Dubey R, Lebensohn AM, Bahrami-Nejad Z, et al. Chromatin-Remodeling Complex SWI/SNF Controls Multidrug Resistance by Transcriptionally Regulating the Drug Efflux Pump ABCB1. 2016(1538-7445 (Electronic)).
28. Riggi N, Knoechel B, Gillespie SM, et al. EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. *Cancer cell.* 2014;26(5):668-681.
29. Jahromi MS, Putnam Ar Fau - Druzgal C, Druzgal C Fau - Wright J, et al. Molecular inversion probe analysis detects novel copy number alterations in Ewing sarcoma. 2012(2210-7762 (Print)).
30. Chang TS, Wei KL, Lu CK, et al. Inhibition of CCAR1, a Coactivator of beta-Catenin, Suppresses the Proliferation and Migration of Gastric

- Cancer Cells. LID - E460 [pii] LID - 10.3390/ijms18020460 [doi]. 2017(1422-0067 (Electronic)).
31. Ha SY, Kim JH, Yang JW, Kim J, Kim B, Park CK. The Overexpression of CCAR1 in Hepatocellular Carcinoma Associates with Poor Prognosis. 2016(2005-9256 (Electronic)).
 32. Kim JH, Yang CK, Heo K, Roeder RG, An W, Stallcup MR. CCAR1, a key regulator of mediator complex recruitment to nuclear receptor transcription complexes. *Molecular cell*. 2008;31(4):510-519.
 33. Seo W-Y, Jeong BC, Yu EJ, et al. CCAR1 promotes chromatin loading of androgen receptor (AR) transcription complex by stabilizing the association between AR and GATA2. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(18):8526-8536.
 34. Selvanathan SP, Graham GT, Erkizan HV, et al. Oncogenic fusion protein EWS-FLI1 is a network hub that regulates alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(11):E1307-E1316.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Gene expression analysis of (A) CCAR1, (B) TUBA1A, (C) POLDIP2, (D) SMARCB1 and (E) SMARCA4. The values represent the relative expression of genes in doxorubicin and vincristine resistant Ewing Sarcoma cell line SK-ES-1 compared to non-resistant control. (1-way ANOVA; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$).

FIG. 2. Protein interaction network between genes involved in chemotherapeutic resistance. Genes selected for this study are represented in red or green according to higher or lower relative mRNA expression, respectively, between control and resistant ES cell line. Additionally, genes TOP2A and TOP2B were added and interact with the network for being targets for doxorubicin (in pink/orange). Genes involved with spliceosomal activity and EWS/FLI1 protein are in yellow. The network was constructed using STRING Database version 10.5.

SUPPLEMENTARY FIG. S1. Chemotherapeutic resistance after induction protocol (R=Resistant, NR=Non-resistant). Evidence of resistance is shown at concentrations of 10nM and 30nM for doxorubicin and 3nM for vincristine. Values are percentage of survival of resistant vs. non-resistant SK-ES-1 cell lines. (2-way ANOVA; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$)

5 DISCUSSÃO GERAL

O Sarcoma de Ewing é o segundo tipo mais frequente de neoplasia de ossos e tecidos moles em crianças e jovens adultos. A doença pode se apresentar apenas de forma localizada ou possuir um perfil metastático agressivo, que frequentemente desenvolve resistência aos quimioterápicos utilizados no tratamento. Ainda que a quimioterapia tenha proporcionado crescente melhora na sobrevivência dos pacientes, a tolerância aos fármacos é um problema constante, muitas vezes resultando em falha terapêutica nos casos metastáticos. Por esse motivo, a busca por alternativas de tratamento capazes de contornar ou evitar o surgimento da resistência tem se tornado cada vez mais importante.

O presente estudo se propôs a definir e analisar potenciais alvos terapêuticos envolvidos em processos de resistência quimioterápica em Sarcoma de Ewing. Para isto, realizamos uma mineração da literatura quanto à resistência à doxorubicina e vincristina, independentemente do tipo de tumor. Posteriormente, geramos um banco de dados composto pelos genes encontrados na mineração que foram validados experimentalmente. O banco de dados foi enriquecido com informações de bases online como Drugbank, Gene Ontology e Uniprot. Selecionamos então os genes TUBA1A, POLDIP2, CCAR1, SMARCA4 e SMARCB1 como alvos de estudo.

Fomos bem sucedidos na indução de resistência quimioterápica em linhagens SK-ES-1, de Sarcoma de Ewing. O protocolo consiste na exposição constante e gradual das linhagens aos fármacos, em um período mínimo de 10 semanas, utilizando concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 nM para doxorubicina e 0,5, 1, 2, 3 e 4 nM para vincristina (HEINEN *et al.*, 2016). São mantidas três linhagens simultâneas, uma para cada quimioterápico e uma sem tratamento, a ser utilizada como controle. Concluído o protocolo, a resistência é avaliada em um ensaio de proliferação celular, onde as células de cada linhagem são plaqueadas em placas de 48 poços. Após 24 horas, as células são tratadas novamente com os fármacos por um período de 72 horas em doses de 10, 30 e 50 nM para doxorubicina e 1, 3 e 5 nM para vincristina. Nessa etapa, o controle recebe tratamento para ambas as drogas, separadamente, originando uma linhagem de controle para cada fármaco. Ao término o tratamento, as células são analisadas através do método de exclusão com azul de Tripán (HEINEN *et al.*, 2016), utilizando um hemocítômetro. A partir desta técnica, foi possível observar uma maior sobrevivência celular das linhagens submetidas ao protocolo de indução quando comparadas a linhagens de controle, evidenciando o desenvolvimento da resistência aos quimioterápicos.

Para explicar os resultados de análise dos níveis de expressão de mRNA de uma forma integrada, foi construída uma rede de interação proteína-proteína (fig. 7). Nela, é possível observar que os genes SMARC estão ligados ao complexo SWI/SNF de remodelamento da cromatina, POLDIP2 ao reparo de dano ao DNA, CCAR1 à atividade de spliceossoma/splicing alternativo, TUBA1A nas funções de microtúbulo e a TOP2A integrando as redes como alvo da doxorrubicina.

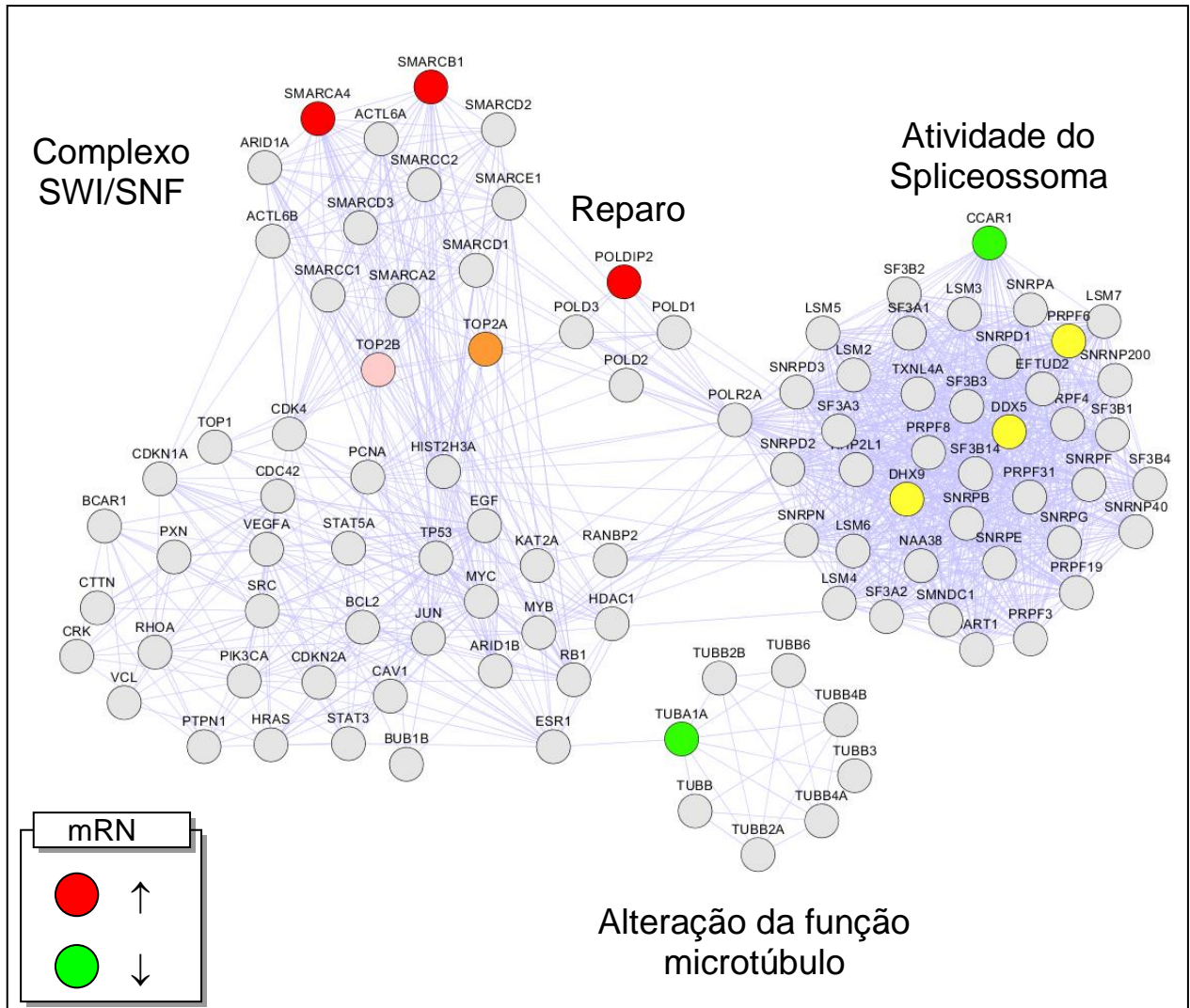


Figura 7: Rede de interação proteína-proteína entre genes com expressão alterada em células resistentes à doxorrubicina em Sarcoma de Ewing. Para a montagem da rede, foram incluídos os 5 genes selecionados nesse estudo (em verde ou vermelho, conforme os níveis de expressão), 3 genes que interagem diretamente com a fusão EWS-FLI (em amarelo) e a TOP2A, por ser alvo da doxorrubicina (em laranja). A rede foi construída utilizando o software STRING Database, versão 10.5.

Recentemente, foi demonstrado que a POLDIP2 pode recrutar diversas polimerases de síntese translesão para reparo dos danos ao DNA. Conforme a fidelidade das sub-unidades à lesão, o reparo pode ser propenso a gerar erros. Unidades como a *Primpol* tem maior fidelidade, enquanto as polimerases *Pol λ*, *Pol η*, *Rev1* e *Rev7* tem maior chance de ocasionar erro no reparo (GUILLIAM *et al.*, 2016). Outro estudo demonstrou que o silenciamento do gene POLDIP2 aumentou a sensibilidade das células ao estresse oxidativo (MAGA *et al.*, 2013), um dos principais mecanismos de ação da doxorubicina. Esses achados contribuem para evidenciar o envolvimento do gene em processos de reparo de dano ao DNA. Ainda, diversos estudos sugerem que o gene POLDIP2 desempenha um papel importante na manutenção da função e integridade vascular (SUTLIFF *et al.*, 2013), assim como migração e adesão celular (DATLA *et al.*, 2014). Em modelos animais, foram observados envolvimento na viabilidade celular, proliferação e regulação de ciclo celular (BROWN *et al.*, 2014). Como esses processos são de vital importância para o desenvolvimento e sobrevivência tumoral, e considerando que níveis elevados da expressão do gene foram encontrados na linhagem resistente de Sarcoma de Ewing, sugere-se uma relação entre os mecanismos responsáveis pela agressividade do tumor e o desenvolvimento da resistência quimioterápica.

Observamos redução nos níveis de expressão do gene TUBA1A compatíveis com o efeito desestabilizador da vincristina sobre os microtúbulos e com um mecanismo de resistência já detalhado para a droga, de alteração nos níveis de expressão da tubulina (HUZIL *et al.*, 2007). Apesar de não ser seu principal método de ação, a doxorubicina também pode influenciar nos níveis de tubulina. Em um estudo realizado por Villeneuve e colaboradores (2006), células de tumor mamário resistentes à doxorubicina foram comparadas a células não-resistentes via ensaio de miniarranjo e qPCR, onde constataram redução nos níveis de expressão do gene da tubulina nas linhagens resistentes do tumor. Dessa forma, nossos resultados de baixa expressão do gene TUBA1A em linhagens SK-ES-1 resistentes à doxorubicina são condizentes com a literatura e demonstram que o comportamento do gene em Sarcoma de Ewing é similar a outros tumores.

Inicialmente, verificamos na literatura que a perda dos genes SMARCA4 e SMARCB1 resulta no desenvolvimento de resistência à doxorubicina em câncer de mama (WIJDEVEN *et al.*, 2015; DUBEY *et al.*, 2016). Entretanto, considerando que nossos resultados indicam o aumento da expressão dos genes, o cenário em Sarcoma de Ewing pode ser diferente dos demais tumores. Uma das possíveis explicações pode ser a presença da proteína de fusão EWS/FLI-1. Ao ativar oncogenes e suprimir repressores tumorais, em

conjunto com o remodelamento da cromatina, a translocação estabeleceria uma rede regulatória diferenciada em Sarcoma de Ewing. Considerando que os genes SMARC fazem parte da família SWI/SNF, cuja função inclui remodelamento de cromatina e recrutamento da TOP2A em sítios com elevada taxa de quebra dupla de DNA, essa pode ser a causa da divergência nos mecanismos de resistência entre os tumores (RIGGI *et al.*, 2014; LEDFORD, 2017). Na mesma linha, um estudo demonstrou, em Sarcoma de Ewing, que a perda do SMARCB1 foi encontrada em um pequeno percentual de pacientes e contribuiu para um desfecho positivo nesses casos (JAHROMI *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível que a combinação da perda do gene com a translocação EWS/FLI-1 esteja aumentando a susceptibilidade ao tratamento. Portanto, os níveis elevados de expressão encontrados nas linhagens SK-ES-1 podem estar representando o desenvolvimento da resistência à doxorrubicina e o aumento da agressividade tumoral pós-tratamento.

O gene CCAR1 apresenta grande variação em tumores, conforme a célula que o expressa (MUTHU *et al.*, 2015). Em câncer gástrico, sua expressão é necessária para a sobrevivência, proliferação e aumento da carcinogênese (CHANG *et al.*, 2017). Em câncer de próstata, é necessário para o crescimento celular, atuando como mediador da transcrição de receptores de androgênio (SEO *et al.*, 2013). Já em tumor mamário, a expressão do gene é necessária para apoptose induzida por quimioterápicos, além de desempenhar um papel na ativação de receptores de estrogênio e glucocorticóides, demonstrando envolvimento no crescimento hormônio-dependente (KIM *et al.*, 2008). No carcinoma hepatocelular, altos níveis de expressão do CCAR1 estão relacionados a invasão microvascular, metástase e recidiva (CHERIYAN *et al.*, 2016). Entretanto, o gene CCAR1 atua diretamente com um complexo de atividade de spliceossoma envolvido com genes que, por sua vez, interagem com a proteína de fusão EWS/FLI-1. A combinação dos genes com a fusão origina uma série de isoformas de proteínas oncogênicas responsáveis pelo fenótipo do Sarcoma de Ewing (SELVANATHAN *et al.*, 2015). Visto que nossos resultados apontam uma baixa expressão do gene na linhagem resistente a doxorrubicina, e que o aumento dos níveis do gene são requeridos para a sobrevivência do tumor, estudos adicionais são necessários para entender a relação do CCAR1 com o desenvolvimento da resistência tumoral em Sarcoma de Ewing, considerando que o gene pode apresentar um comportamento diferente na biologia desse tumor.

Através deste estudo, foi possível induzir a resistência quimioterápica tumoral em linhagens de Sarcoma de Ewing aos fármacos doxorrubicina e vincristina. Entretanto, é

importante esclarecer os efeitos do tratamento na expressão dos alvos em linhagens sem resistência. Considerando que o protocolo de indução de resistência é dispendioso de tempo e recursos, essa avaliação possibilita verificar se as células já exibem comportamento resistente a partir do primeiro tratamento e, conseqüentemente, evitar a necessidade do procedimento de indução.

Ensaio adicionais de validação dos genes por *knockout* ou silenciamento são necessários para validação do envolvimento dos alvos no processo de resistência. Ainda, a avaliação das vias dos processos de apoptose, transportadores de efluxo, crescimento, diferenciação e células-tronco tumorais podem ajudar a esclarecer seu papel junto aos genes no desenvolvimento de tolerância aos fármacos em Sarcoma de Ewing.

Os mecanismos de resistência tumoral são numerosos, complexos e estão longe de serem completamente esclarecidos. Ainda que nossos resultados sugiram o envolvimento dos genes no processo de resistência à doxorrubicina e vincristina em Sarcoma de Ewing, futuramente, para esse estudo, a inclusão de amostras de pacientes, assim como a utilização de ferramentas de bioinformática para a seleção de um maior número de alvos, pode ajudar a compreender melhor esses processos, possibilitando o desenvolvimento de terapias alternativas mais seguras e eficazes no tratamento do tumor.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, foi possível:

- Criar uma base de dados de resistência, contendo genes potencialmente envolvidos em processos de tolerância quimioterápica em tumores;
- Induzir resistência aos fármacos doxorrubicina e vincristina em linhagem celular SK-ES-1 de Sarcoma de Ewing;
- Observar alterações de expressão nos níveis do gene TUBA1A compatíveis com os mecanismos de ação dos fármacos;
- Avaliar os genes SMARCA4 e SMARCB1, demonstrando que possuem variação de expressão conforme o tumor envolvido. Os resultados encontrados indicam que pode haver envolvimento desses alvos no processo de resistência de Sarcoma de Ewing, que difere dos demais tumores devido à presença da proteína de fusão EWS/FLI-1;

- Analisar a expressão do gene CCAR1, onde encontramos baixos níveis de expressão embora os resultados não tenham sido conclusivos, considerando que há grande variabilidade do gene conforme o tipo celular e a expressão desse alvo geralmente é requerida para a evolução em diversos tipos de tumor;
- E, quantificar os níveis de POLDIP2 encontrados elevados nos experimentos, indicando uma relação entre o desenvolvimento de resistência e processos de reparo, estresse oxidativo, vascularização, migração e proliferação celular e invasão tumoral

REFERÊNCIAS

AHMED, A.; ZIA, H.; WAGNER, L. Therapy resistance mechanisms in Ewing's sarcoma family tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 73, n. 4, p. 657-663, 2014/04/01 2014. ISSN 0344-5704.

AHMED, A. A.; SHERMAN, A. K.; PAWEL, B. R. Expression of therapeutic targets in Ewing sarcoma family tumors. **Human Pathology**, v. 43, n. 7, p. 1077-1083, 7// 2012. ISSN 0046-8177.

ALFAROUK, K. O. et al. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. **Cancer Cell Int**, v. 15, p. 71, 2015. ISSN 1475-2867.

ALPSOY, A.; YASA, S.; GUNDUZ, U. Etoposide resistance in MCF-7 breast cancer cell line is marked by multiple mechanisms. **Biomed Pharmacother**, n. 1950-6007 (Electronic), 20140428 DCOM- 20141212 2014.

BALAMUTH, N. J.; WOMER, R. B. Ewing's sarcoma. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 2, p. 184-92, Feb 2010. ISSN 1470-2045.

BETHESDA, M. N. C. I. National Cancer Institute: PDQ® Ewing Sarcoma Treatment. 03/04/2015 2015. Acesso em: 11/07/2015.

BOSILKOVSKA, M. et al. Severe Vincristine-Induced Neuropathic Pain in a CYP3A5 Nonexpressor With Reduced CYP3A4/5 Activity: Case Study. **Clinical Therapeutics**, 2015. ISSN 0149-2918.

BROWN, D. I. et al. Poldip2 knockout results in perinatal lethality, reduced cellular growth and increased autophagy of mouse embryonic fibroblasts. n. 1932-6203 (Electronic), 20140506 DCOM- 20150129 2014.

BRUNETTO, A. L. et al. Carboplatin in the treatment of Ewing sarcoma: Results of the first Brazilian collaborative study group for Ewing sarcoma family tumors-EWING1. **Pediatr Blood Cancer**, v. 62, n. 10, p. 1747-53, Oct 2015. ISSN 1545-5009.

CHANG, T. S. et al. Inhibition of CCAR1, a Coactivator of beta-Catenin, Suppresses the Proliferation and Migration of Gastric Cancer Cells. LID - E460 [pii] LID - 10.3390/ijms18020460 [doi]. n. 1422-0067 (Electronic), 20170223 2017.

CHERIYAN, V. T. et al. CARP-1 functional mimetics are novel inhibitors of drug-resistant triple negative breast cancers. **Oncotarget**, v. 7, n. 45, p. 73370-73388, Nov 08 2016. ISSN 1949-2553.

CORNAZ-BUROS, S. et al. Targeting cancer stem-like cells as an approach to defeating cellular heterogeneity in Ewing sarcoma. **Cancer Res**, v. 74, n. 22, p. 6610-22, Nov 15 2014. ISSN 0008-5472.

COTE, G. M.; CHOY, E. Update in Treatment and Targets in Ewing Sarcoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 5, p. 1007-1019, 10// 2013. ISSN 0889-8588.

CROMPTON, B. D. et al. The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. **Cancer Discov**, v. 4, n. 11, p. 1326-41, Nov 2014. ISSN 2159-8274.

DAMIA, G.; GARATTINI, S. The pharmacological point of view of resistance to therapy in tumors. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 8, p. 909-916, 9// 2014. ISSN 0305-7372.

DATLA, S. R. et al. Poldip2 controls vascular smooth muscle cell migration by regulating focal adhesion turnover and force polarization. n. 1522-1539 (Electronic), 20141002 DCOM-20141215 2014.

DUBEY, R. et al. Chromatin-Remodeling Complex SWI/SNF Controls Multidrug Resistance by Transcriptionally Regulating the Drug Efflux Pump ABCB1. n. 1538-7445 (Electronic), 20160924 2016.

ESIASHVILI, N.; GOODMAN, M.; MARCUS, R. B., JR. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 30, n. 6, p. 425-30, Jun 2008. ISSN 1077-4114 (Print) 1077-4114.

EWER, M. S.; EWER, S. M. Cardiotoxicity of anticancer treatments. **Nat Rev Cardiol**, v. 12, n. 9, p. 547-58, Sep 2015. ISSN 1759-5002.

GIDDING, C. E. et al. Vincristine revisited. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 29, n. 3, p. 267-87, Feb 1999. ISSN 1040-8428 (Print) 1040-8428.

GROHAR, P. J.; HELMAN, L. J. Prospects and challenges for the development of new therapies for Ewing sarcoma. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 137, n. 2, p. 216-224, 2// 2013. ISSN 0163-7258.

HEINEN, T. E. et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 34860-80, Jun 07 2016. ISSN 1949-2553.

HOUSMAN, G. et al. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers (Basel)**, v. 6, n. 3, p. 1769-92, Sep 05 2014. ISSN 2072-6694.

HUZIL, J. T. et al. The roles of beta-tubulin mutations and isotype expression in acquired drug resistance. **Cancer Inform**, v. 3, p. 159-81, Apr 27 2007. ISSN 1176-9351.

INCA. 2017. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=345 >.

JAHROMI, M. S. et al. Molecular inversion probe analysis detects novel copy number alterations in Ewing sarcoma. n. 2210-7762 (Print), 20120807 DCOM- 20121009 2012.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253-65, Apr 2004. ISSN 1474-175X (Print)1474-175x.

KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 3, p. 194-204, Mar 2010. ISSN 1474-175x.

LIN, S. T. et al. Proteomic analysis of proteins responsible for the development of doxorubicin resistance in human uterine cancer cells. **J Proteomics**, n. 1876-7737 (Electronic), 20121010 DCOM- 20130307 2012.

MOHAMMADGHOLI, A.; RABBANI-CHADEGANI, A.; FALLAH, S. Mechanism of the interaction of plant alkaloid vincristine with DNA and chromatin: spectroscopic study. **DNA Cell Biol**, v. 32, n. 5, p. 228-35, May 2013. ISSN 1044-5498.

MONUMENT, M. J. et al. Microsatellites with macro-influence in ewing sarcoma. **Genes (Basel)**, v. 3, n. 3, p. 444-60, Jul 23 2012. ISSN 2073-4425.

MUTHU, M.; CHERIYAN, V. T.; RISHI, A. K. CARP-1/CCAR1: a biphasic regulator of cancer cell growth and apoptosis. n. 1949-2553 (Electronic), 20150421 DCOM- 20160119 2015.

PANG, B. et al. Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. **Nat Commun**, v. 4, p. 1908, 2013. ISSN 2041-1723.

PERSIDIS, A. Cancer multidrug resistance. **Nat Biotech**, v. 17, n. 1, p. 94-95, 01//print 1999. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/5289> >.

RAZAVI-AZARKHIAVI, K. et al. The Cardiotoxic Mechanism of Doxorubicin (DOX) and Pegylated Liposomal DOX in Mice Bearing C-26 Colon Carcinoma: a Study Focused on microRNA Role for Toxicity Assessment of New Formulations. **Pharm Res**, May 30 2017. ISSN 0724-8741.

RIGGI, N. et al. EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. **Cancer Cell**, v. 26, n. 5, p. 668-81, Nov 10 2014. ISSN 1535-6108.

RODRIGO, R.-S. et al. Topoisomerase II-alpha protein expression and histological response following doxorubicin-based induction chemotherapy predict survival of locally advanced soft tissues sarcomas. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 9, p. 1319-1327, 6// 2011. ISSN 0959-8049.

SHEFFIELD, N. C. et al. DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. **Nat Med**, v. 23, n. 3, p. 386-395, 03//print 2017. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4273> >.

SHUKLA, N. et al. Biomarkers in Ewing Sarcoma: The Promise and Challenge of Personalized Medicine. A Report from the Children's Oncology Group. **Front Oncol**, v. 3, p. 141, 2013. ISSN 2234-943x.

SKLADANOWSKI, A. et al. Down-regulation of DNA topoisomerase IIalpha leads to prolonged cell cycle transit in G2 and early M phases and increased survival to microtubule-interacting agents. **Mol Pharmacol**, v. 68, n. 3, p. 625-34, Sep 2005. ISSN 0026-895X (Print)0026-895x.

SUTLIFF, R. L. et al. Poldip2 sustains vascular structure and function. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 33, n. 9, p. 10.1161/ATVBAHA.113.301913, 07/03 2013. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837414/> >.

THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, n. 1744-6880 (Electronic), 20110615 DCOM- 20111021 2011.

TSUBAKI, M. et al. Overexpression of survivin via activation of ERK1/2, Akt, and NF- κ B plays a central role in vincristine resistance in multiple myeloma cells. **Leukemia Research**, 2015. Acesso em: 2015/02/18.

VILLENEUVE, D. J. et al. cDNA microarray analysis of isogenic paclitaxel- and doxorubicin-resistant breast tumor cell lines reveals distinct drug-specific genetic signatures of resistance. **Breast Cancer Res Treat**, v. 96, n. 1, p. 17-39, Mar 2006. ISSN 0167-6806 (Print)0167-6806.

WERNER, B. et al. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 353-364, 2005. ISSN 1676-2444. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442005000500011&nrm=iso >.

WIJDEVEN, R. H. et al. Genome-Wide Identification and Characterization of Novel Factors Conferring Resistance to Topoisomerase II Poisons in Cancer. n. 1538-7445 (Electronic), 20151002 DCOM- 20160130 2015.

WU, Q. et al. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. **Cancer Letters**, v. 347, n. 2, p. 159-166, 6/1/ 2014. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030438351400158X> >.

YANG, F. et al. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochim Biophys Acta**, v. 1845, n. 1, p. 84-9, Jan 2014. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002.

YANG, M. et al. Detection and characterization of side population in Ewing's sarcoma SK-ES-1 cells in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 1, p. 1062-1066, 1/1/ 2010. ISSN 0006-291X.

ZHANG, J. et al. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 444, n. 0, p. 182-192, 4/15/ 2015. ISSN 0009-8981.

ZHUO, R. et al. Targeting Glutathione S-transferase M4 in Ewing sarcoma. **Front Pediatr**, v. 2, p. 83, 2014. ISSN 2296-2360.