

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia

Metabolismo da glutathione e atividade
ATPase de S-conjugados de glutathione no
câncer

Angela Kolberg

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Fisiologia, para obtenção do título de Mestre**

Porto Alegre
2000

**Ao meu marido Carlos, e meus
filhos Carolina e Wagner, com
todo meu amor**

AGRADECIMENTOS

"Temos tão pouco a pedir e tanto a agradecer".

Meu primeiro pensamento é dedicado ao meu Deus, sempre infinito em sua bondade tem me agraciado com tantas bênçãos nesta vida: minha família, meus amigos, minha saúde e meu trabalho. Admiro a Sua obra, que faz os pátios da UFRGS cobrirem-se de lilás em todas as primaveras, quando os Ipês florescem para enfeitar a residência dos sabiás.

Agradeço ao Prof. Paulo Ivo, este incansável batalhador da pesquisa, que tem sido muito mais do que o orientador deste trabalho, mas sim um mestre atento em cada instante, e que, como tal acredita, ensina e orienta com a magnitude e a simplicidade que é inerente aos sábios. Obrigado Paulo Ivo, não só pelos ensinamentos, mas pela sua amizade.

"amigo é aquele que a gente sabe que vai responder, quando necessário, com um ato de afeto, compreensão, ou até mesmo de sacrifício".

Prof^a Roselis, muito obrigado pela oportunidade de participar deste mestrado e por ter feito a indicação do meu orientador. Seu desempenho enquanto Coordenadora do Pós-Graduação é merecedor de nosso respeito e admiração, pela seriedade, objetividade e competência.

Nenhum de nossos atos nesta vida tem sucesso se não for realizado em parceria. Muitos foram os parceiros que seguraram os cordames, puxaram as velas, recolheram as âncoras, dividiram a água e enfrentaram as calmarias e tempestades desta jornada.... sem eles eu, com certeza, teria soçobrado.

A Míriam, com sua, dedicação e paciência ajudando alunos, professores e coordenadores do departamento. A Sueli, esta criatura maravilhosa que Deus colocou no nosso caminho, sempre pronta a colaborar com todos no laboratório, a Tatiana, que me ensinou a ser perfeccionista na cultura das células, A Denise, o Alexandre, a Lisiane, o Benjamim, a Minéia, e é claro a B₂ (Angela Tavares), pelas horas de trabalho conjunto, alegria e companheirismo.

Maristela, Jaqueline, Lucila, e "Pity" (Angela, também), e todos com quem pude partilhar dúvidas e certezas, sucessos e fracassos, o medo, a coragem, e muita alegria. Patrícia Bock, obrigado pelas horas de estudo em química orgânica, que me arrancaram da escuridão.

À Dna. Ritinha pelo cuidado com nosso laboratório.

Obrigado Mãe por ter me mostrado o universo dos livros, o prazer da leitura, e ter me feito assim curiosa e obstinada.

Carlos, meu marido e companheiro, obrigado por esta cumplicidade de 22 anos, e a infinita paciência. Não dá para falar de amor sem lembrar seu rosto amado.

Aos meus filhos, Carolina e Wagner, por estarem sempre perto com seu amor e sua compreensão, mesmo quando estive ausente apesar de estar ao lado de vocês.

Ao Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela acolhida.

E a todos que alguma maneira colaboraram para realização deste trabalho.

Este trabalho teve o apoio da FAPERGS (Porto Alegre, RS, Brasil, Proc. 96/1120-1, 97/0285-2, 98/1653-6, 98/1062-6), FAPESP (São Paulo, SP, Brasil, Proc. 93/3498-4), PROPESQ-UFRGS (Editais 01/98, 02/98, 2000) e Ministério de Ciências e Tecnologia/Ministério de Educação PRONEX (168/97).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
SUMÁRIO	6
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	12
INTRODUÇÃO	13
1.1 Considerações Gerais	13
1.2 Metabolismo das prostaglandinas	17
1.3 Metabolismo da glutathiona e seus derivados	23
1.4. Interconversão de prostaglandinas e a imunossupressão no câncer	26
1.5 Fisiologia do transporte através da bomba GS-X/MRP e a resistência múltipla a drogas no câncer.	30
1.6 Resistência aos efeitos antiproliferativos das CP-PGs e o papel da MRP/bomba GS-X na imunossupressão no câncer	33
OBJETIVOS	38
MÉTODOS	39
3.1 Animais	39
3.2 Preparações celulares	39
3.2.1 Replicação de células tumorais	39
3.2.2 Preparação de células intraperitoneais do tumor de Walker 256	40
3.2.3 Preparação de linfócitos de linfonodos mesentéricos de ratos	41
3.2.4 Linhagens permanentes	42
3.3 Medida da capacidade de exportação de conjugados de GSH em células intactas incubadas	42
3.4 Síntese de DNP-SG	47
3.5 Separação do DNP-SG por cromatografia em colunas Sep-Pak C18	48

3.6 Separação do DNP-SG por TLC	49
3.7 Medida da atividade da ATPase de GSH (Bomba GS-X) em membranas de linfócitos e células tumorais	50
3.8 Determinação do conteúdo intracelular de GSH e GSSG	53
3.9 Determinação da atividade total das glutathione S-transferases	57
3.10 Medida da atividade da γ-glutamylcysteine sintetase	57
3.11 Expressão de proteínas de choque térmico (HSP) e análises por SDS-PAGE	58
3.12 SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	59
3.14 Preparação de tampões e outros procedimentos	63
3.14.1 Protocolo para hemólise de eritrócitos	63
3.14.2 Tripsinização de culturas de células em monocamadas	63
3.15 Reagentes e soluções utilizadas	64
3.15.1 Tampão fosfato (PBS)	64
3.15.2 Solução de Hank's – (Hanks' Balanced salt solution - HBSS)	64
3.15.3 Solução de Hemólise	65
3.15.4 Tampão de homogeneização para a extração da bomba GS-X (Fosfato 10mM – pH 7,0)	65
3.15.5 Tampão de extração (Tris-Triton – pH 7,4)	65
3.15.8 Outros materiais e reagentes analíticos	65
<i>RESULTADOS</i>	67
4.1 Performance do sistema imunológico em presença de tumor	67
4.2 Cinética de exportação de DNP-SG pela técnica de incubação de células intactas com CDNB	69
4.3 Atividade da Bomba GS-X em membranas celulares	74
4.4 Metabolismo da GSH	76
4.5 Atividade total das glutathione S-transferases (GST)	81
4.6 γ-glutamylcysteine sintetase	82
4.7 Expressão de HSP70 e sua relação com o estresse oxidativo em linfócitos de animais portadores do TW256	84
<i>DISCUSSÃO</i>	88
<i>CONCLUSÃO</i>	102

<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*</i>	<u>106</u>
<i>RELAÇÃO DAS FIGURAS</i>	<u>122</u>
<i>ABSTRACT</i>	<u>124</u>

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AINES	Antiinflamatórios não-esteróides
ATPase	adenosina trifosfatase
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	albumina sérica bovina
BSO	butionina-sulfoximina
CDNB	1-Cl-2,4-dinitrobenzeno
Con A	concanavalina A
COX	ciclooxigenase
CP-PG	prostaglandina ciclopentenônica
DAG	diacilglicerol
DEM	maleato de dietila
DHETE	ácido diidróxi-eicosatetraenóico
DMSO	sulfóxido de dimetila
DNP-SG	(2,4-dinitrofenil)-S-glutaciona
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTT	didiotreitol
EGF	fator de crescimento epidérmico
EPA	ácido eicosapentenoico
EPOX	epoxigenase
ETYA	ácido eicosatetraenoico
FCS	soro fetal bovino
gadd	growth arrest DNA damage
GC	glicocorticóides
GS-conjugado	S-conjugados de glutaciona
GSH	glutaciona (forma reduzida)
GSPx	glutaciona peroxidase
GSRd (GSSG)	redutase de dissulfeto de glutaciona
GSSG	dissulfeto de glutaciona
GST	glutaciona S-transferase
GS-X	bomba de glutaciona
γ -GCS	enzima γ -glutamilcisteína

HEp-2.....	carcinoma de laringe humano
HeLa.....	adenocarcinoma de cérvix uterino humano
HETE.....	ácido hidróxi-eicosatetraenóico
HPETE.....	ácido hidroperóxi-eicosatetraenóico
HPLC.....	”High Performance Lipid Cromatography”
HSE.....	elemento de ligação dos HSF ao DNA
HSF.....	fator de transcrição para HSP
HSP.....	proteína de choque térmico
HSP70.....	proteína de choque térmico de 70 kDa
HSP90.....	proteína de choque térmico de 90 kDa
IL.....	interleucina
KETE.....	ácido ceto-eicosatetraenóico
LDL.....	lipoproteína de baixa densidade
LPS.....	lipolissacarídeo
LT.....	leucotrieno
LX.....	lipoxina
MAP quinase.....	quinase ativada por mitógenos
MAPKK.....	MAP quinase quinase
MDR.....	resistência múltipla a drogas
MOPS.....	ácido morfolinopropanossulfônico
MPA.....	ácido meta-fosfórico
MRP.....	proteína associada à MDR
NDGA.....	ácido nor-diidroguaiarético
NEM.....	N-etil-maleimida
NK.....	matadoras naturais
P-170.....	glicoproteína MDR de 170 kDa
P-glicoproteína.....	glicoproteína MDR de 170 kDa
PBS.....	salina tamponada com fosfato
PDGF.....	fator de crescimento derivado de plaquetas
PG.....	prostaglandina
PGA.....	prostaglandina A
PGE.....	prostaglandina E
PGD.....	prostaglandina D
PGI.....	prostaciclina
PGJ ₂	prostaglandina J ₂
PGs.....	prostaglandinas
PIPES.....	ácido piperazina N-N’-bis-(etanossulfônico)
PKA.....	proteína quinase A
PKC.....	proteína quinase C
PLA ₁	fosfolipase A ₁
PLA ₂	fosfolipase A ₂

Plase.....	fosfolipase
PLC.....	fosfolipase C
PLD.....	fosfolipase D
PMSF.....	fluoreto de fenil-metil-sulfonila
PPAR- γ	receptor - γ , ativado por peroxissomos
PUFA.....	ácidos graxos poliinsaturados
SFB.....	soro fetal bovino
TAG.....	triacilgliceróis
TBA.....	ácido 2-tiobarbitúrico
TBHP.....	hidroperóxido de <i>t</i> -butila
TCA.....	ácido tricloroacético
TEM.....	tampão tris-EDTA-NaCl
TGF.....	fator de crescimento transformante
TNF.....	fator de necrose tumoral
TX.....	tromboxana
U.....	unidades de atividade enzimática
UI.....	unidades internacionais

RESUMO

Pacientes terminais de câncer apresentam um quadro de caquexia que está associado ao estado de imunossupressão que acompanha esta patologia. Nestes pacientes é possível detectar aumento das taxas de prostaglandinas ciclopentenônicas plasmáticas, as quais são reconhecidamente antiproliferativas. Na presença de câncer ocorre a superprodução destas CP-PGs, que são rapidamente captadas pelas células, tanto do sistema imune quanto do próprio tumor. Porém, esta atividade antiproliferativa é mais significativa nas células do tecido imune, enquanto as células de tecido tumoral seguem seu crescimento, aparentemente sem sofrer os distúrbios de proliferação inferidos pelas CP-PGs. É sabido que estas CP-PGs de anel ciclopentano α,β -insaturado são eletrofilicas, o que permite sua conjugação com substâncias nucleofílicas, como a glutatona (GSH). A presença da ATPase MRP/bomba GS-X, responsável pela extrusão de conjugados de glutatona para o espaço extracelular seria uma explicação razoável para o fato das células tumorais serem resistentes à ação antiproliferativa das CP-PGs. Estas ponderações foram confirmadas, anteriormente, através de estudos *in vitro*, porém ainda não haviam sido determinadas *in vivo*. Neste estudo foi investigado o papel da MRP/bomba GS-X em animais normais e portadores do tumor de Walker 256. Verificou-se que os animais com tumor, ao longo de, aproximadamente, 21 dias perderam massa corporal, que se fez acompanhar por um quadro de caquexia. Observou-se que a capacidade de exportação de S-conjugados de GSH através da MRP/bomba GS-X (um indicativo da capacidade de eliminação de CP-PG para o espaço extracelular) foi 21 vezes menor em linfócitos que nas células do tumor de Walker 256. Identificou-se que as taxas de GSH estavam diminuídas nas células do tecido imune mas esta depleção não teve caráter oxidativo, uma vez que estiveram mantidos os níveis de GSSG. Isto sugere que linfócitos devam estar sendo desafiados com alguma substância eletrofílica não oxidante que depleta GSH (por exemplo, uma CP-PG). Não houve diferença entre a atividade da glutatona-S-transferase e da γ -glutamilcisteína sintetase (enzimas responsáveis, respectivamente, pela conjugação e síntese de GSH) entre linfócitos de animais normais e portadores do tumor de Walker 256. Como dado corroborante, foi observada, em linfócitos de animais com tumor, indução da expressão de proteínas de choque térmico (HSP70), as quais são induzidas, entre outros agentes, pelas CP-PGs. Os resultados sugerem que a MRP/bomba GS-X, responsável pela extrusão de conjugados de GSH/CP-PG, tem baixa atividade nos linfócitos o que pode ser uma das causas do quadro de imunossupressão nos estágios terminais de câncer.

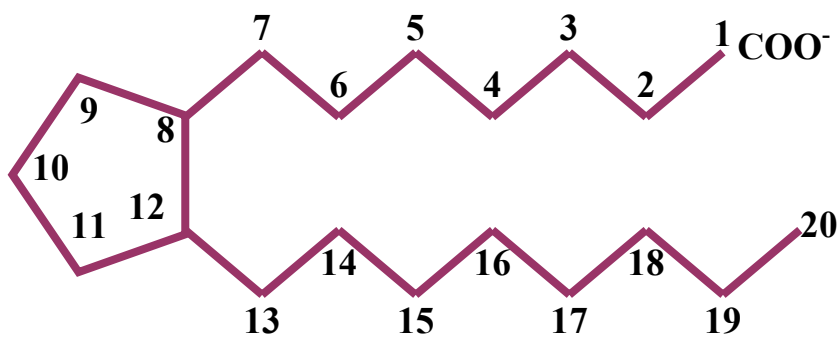
INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

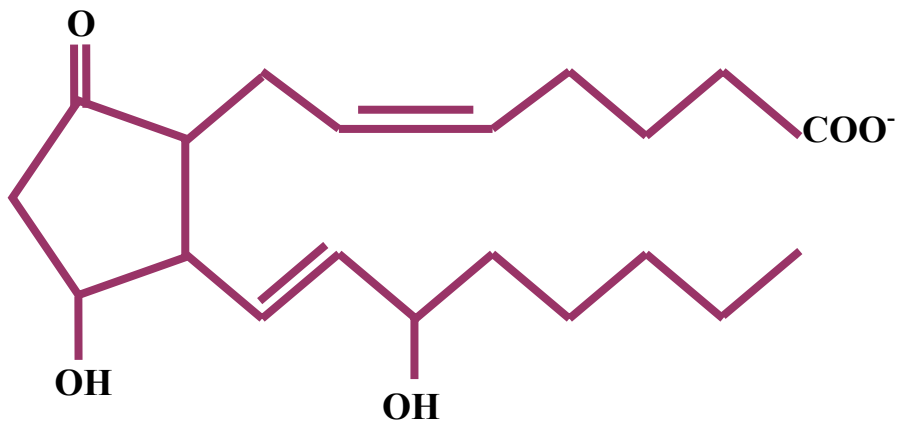
A produção maciça de prostaglandinas (PGs) no plasma de indivíduos com câncer pode estar relacionada à imunossupressão observada nos estágios finais da doença, levando o paciente à morte.

Prostaglandinas (PGs) são substâncias naturais dos organismos vivos (BERGSTRÖM, CARLSON & WEEKS, 1968), que desempenham papel regulatório significativo em várias funções, entre elas, ação citoprotetora, promoção ou inibição de proliferação celular (BERGELSON, PINKUS & DANIEL, 1979; OHNO, *et alii*, 1986), atividade contrátil, e outras. Particularmente, as prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) inibem a proliferação celular, paralisando a divisão na interface entre a fase G₁ para S do ciclo celular (FUKUSHIMA, *et alii*, 1989; 1982 a; BHUYAN, *et alii*, 1986), o que pode ser uma explicação razoável para o estado de imunossupressão que ocorre em presença de câncer, quando a produção plasmática destas PGs está aumentada.

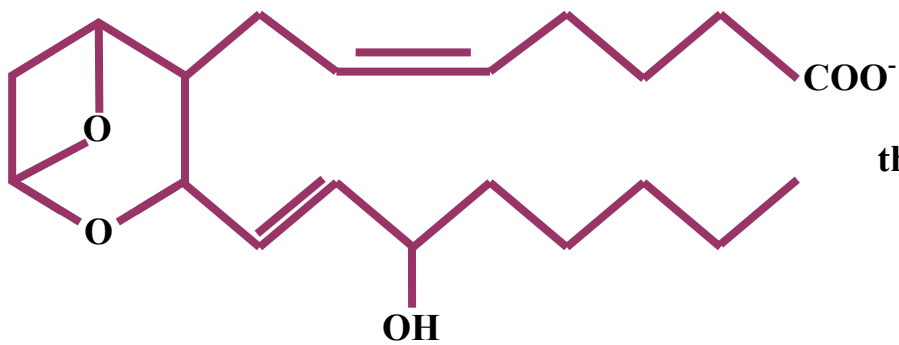
As PGs são ácidos graxos de vinte carbonos (veja **Fig. 1**, por favor), contendo um anel ciclopentano, duas cadeias alifáticas, um grupo carboxila e uma hidroxila no carbono 15 (NEWSHOLME & LEECH, 1995). Os precursores das PGs são ácidos graxos do tipo: ácido 8,11,14-eicosatrienóico para PGs do tipo 1, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico, ou Ácido Araquidônico (AA), precursor das PGs do tipo 2 e Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (EPA), precursor das PGs do tipo 3.



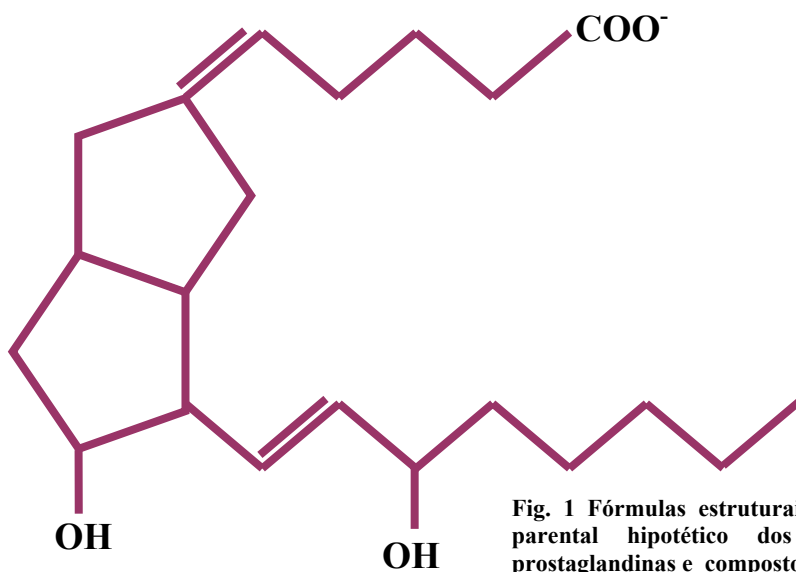
Ácido prostanóico



prostaglandina E₂
(PGE₂)



thromboxana A₂



prostaciclina (PGI₂)

Fig. 1 Fórmulas estruturais do ácido prostanóico (composto parental hipotético dos prostanóides) e de algumas prostaglandinas e compostos relacionados

A síntese de PGs pode ser mediada por eventos fisiológicos tais como resposta inflamatória, crescimento tumoral, estresse celular, e ser inibida por ação dos antiinflamatórios não-esteróides (AINES), do tipo aspirina (THUN *et alii*, 1991; HOMEM de BITTENCOURT, *et alii*, 1989). Na presença de tumores, não apenas as células tumorais são responsáveis pela estimulação da síntese de PGs para o plasma, mas também células do sistema imunológico como macrófagos, que as sintetizam a partir de AA. Considerável quantidade de PGs, em especial as PGEs e PGDs, são detectadas em plasma de indivíduos com câncer (**Fig. 2**) (HOMEM de BITTENCOURT, *et alii*, 1998, WILLIAMS, *et alii*, 1968). Considerando-se que estas PGs são extremamente instáveis e suscetíveis ao ataque enzimático pela albumina (FITZPATRICK & WYNALDA, 1983), existe a possibilidade de que ocorra interconversão destas em CP-PGs, que por sua vez são mais estáveis e eletrofilicas (HONN & MARNETT, 1985), permitindo conjugação com grupamentos sulfidrilas (-SH) intracelulares, como GSH e cisteínas reativas (ATSMON, *et alii*, 1989; OHNO, *et alii*, 1986). A ação antiproliferativa das PGs, em especial as CP-PGs (OHNO, *et alii*, 1986, HONN, *et alii*, 1985), tem sido relacionada com a condição imunossupressora que ocorre na fase terminal de situações oncopatogênicas (HOMEM de BITTENCOURT JR. & CURI, 1992). Esta relação parece ser dependente da capacidade de captação destas PGs pelas células, um fenômeno que é tão efetivo que torna a presença de CP-PGs na forma livre no plasma, praticamente indetectável (NARUMYA & FUKUSHIMA, 1986), o que explicaria a dificuldade de encontrá-las nestas condições.

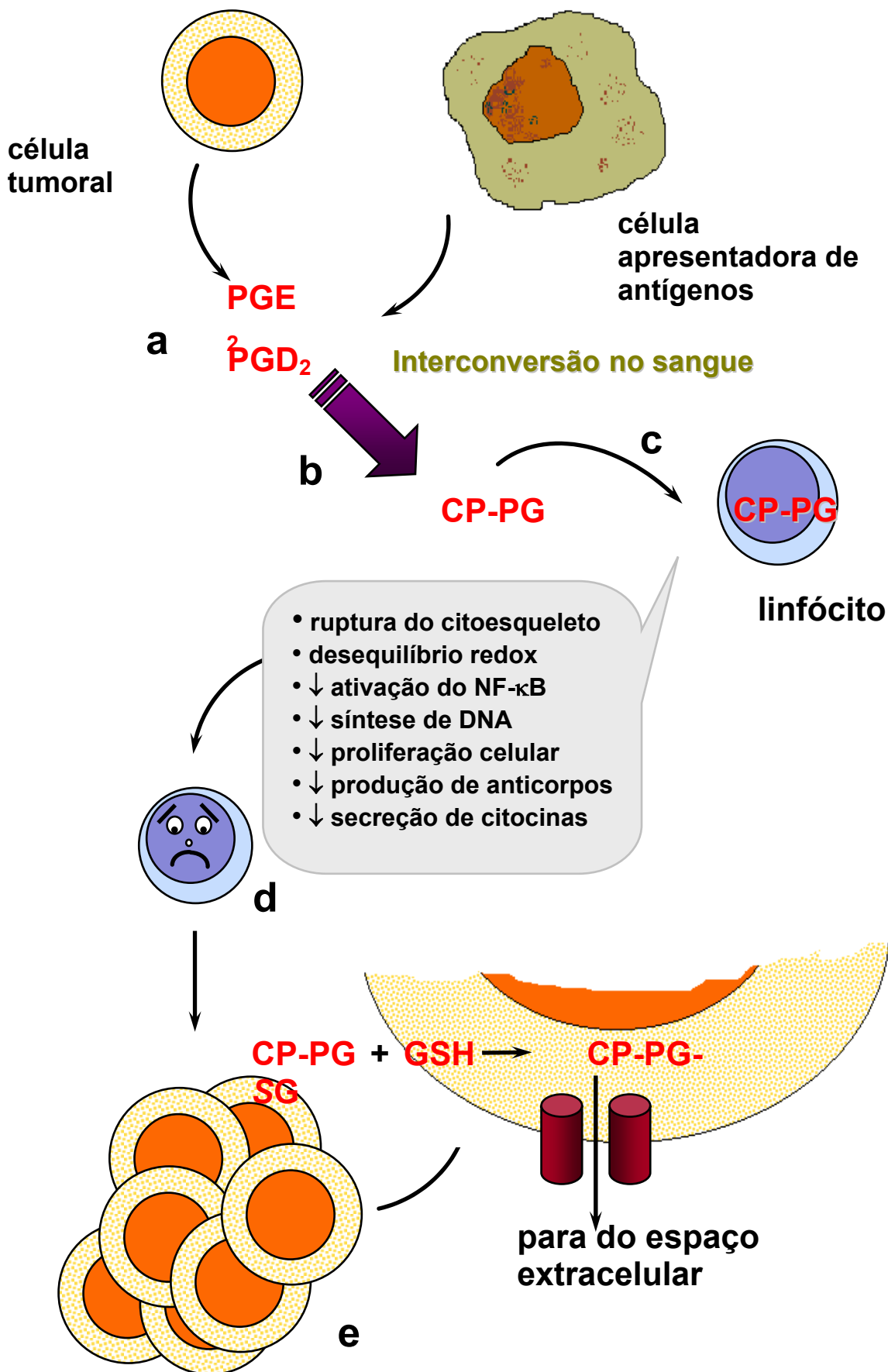


Fig. 2 Impacto da produção de prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) sobre o sistema imunológico de indivíduos com câncer. (a) Células tumorais bem como células apresentadoras de antígenos estimuladas pela presença do tumor produzem grandes quantidades de prostaglandinas do tipo E e D, que podem ser (b) convertidas em CP-PGs no sangue do portador do tumor. (c) Uma vez no plasma, as CP-PGs são protamente captadas pelos linfócitos onde causam dramáticas alterações na fisiologia destas células levando (d) à imunossupressão. Na ausência de uma resposta imunológica eficiente, as células tumorais são favorecidas e podem proliferar-se livremente nos estágios finais da doença (e). Ao contrário do observado em linfócitos, células de muitos tipos de tumores (particularmente os sólidos) tendem a expressar fortemente a ATPase MRP/bomba GS-X, que tem a capacidade de eliminar as CP-PGs para o espaço extracelular na forma de GS-conjugados ficando livres dos efeitos citostáticos e citotóxicos destas PGs.

Células tumorais também captam estas PGs, mas de alguma forma, têm capacidade de exportá-las, evitando, assim, sua ação antiproliferativa, o que permitiria o crescimento tumoral. Por outro lado, demais células do sistema imunológico, em particular linfócitos, parecem ser ineficientes em exportar as CP-PGs (HOMEM de BITTENCOURT & CURI, 1992), sofrendo, então, a ação antiproliferativa das mesmas. Desta forma, o sistema imunológico fica impedido de agir contra as células tumorais, o que facilita o desenvolvimento dos tumores (CURI, *et alii*, 1995).

Existem inúmeras evidências de que uma ATPase de membrana, que exporta conjugados de GSH com substâncias eletrofilicas (bomba GS-X) possa ser a responsável pela expulsão de CP-PGs pelas células tumorais. As CP-PGs pode ser conjugadas com moléculas de GSH através das glutathione *S*-transferases (GST), e serem então exportadas pela bomba GS-X para o espaço extracelular.

Apesar de as evidências experimentais sugerirem que a baixa atividade da bomba GS-X em linfócitos possa ser responsável pelo acúmulo de CP-PGs nestas células e conseqüente imunossupressão no câncer (HOMEM de BITTENCOURT *et alii*, 1995; CURI, *et alii*, 1992), esta possibilidade ainda não foi testada em modelo de câncer *in vivo*.

1.2 Metabolismo das prostaglandinas

O ácido araquidônico, principal precursor da síntese de PGs encontra-se na forma esterificada nos fosfolípidos de membrana, e é necessário que seja liberado para o citossol (**Fig. 3**), para que possa gerar as PGs (IRVINE, 1982). Acredita-se que mudanças nos níveis de AA, as quais levam ao aumento da síntese de eicosanóides (PGs, leucotrienos,

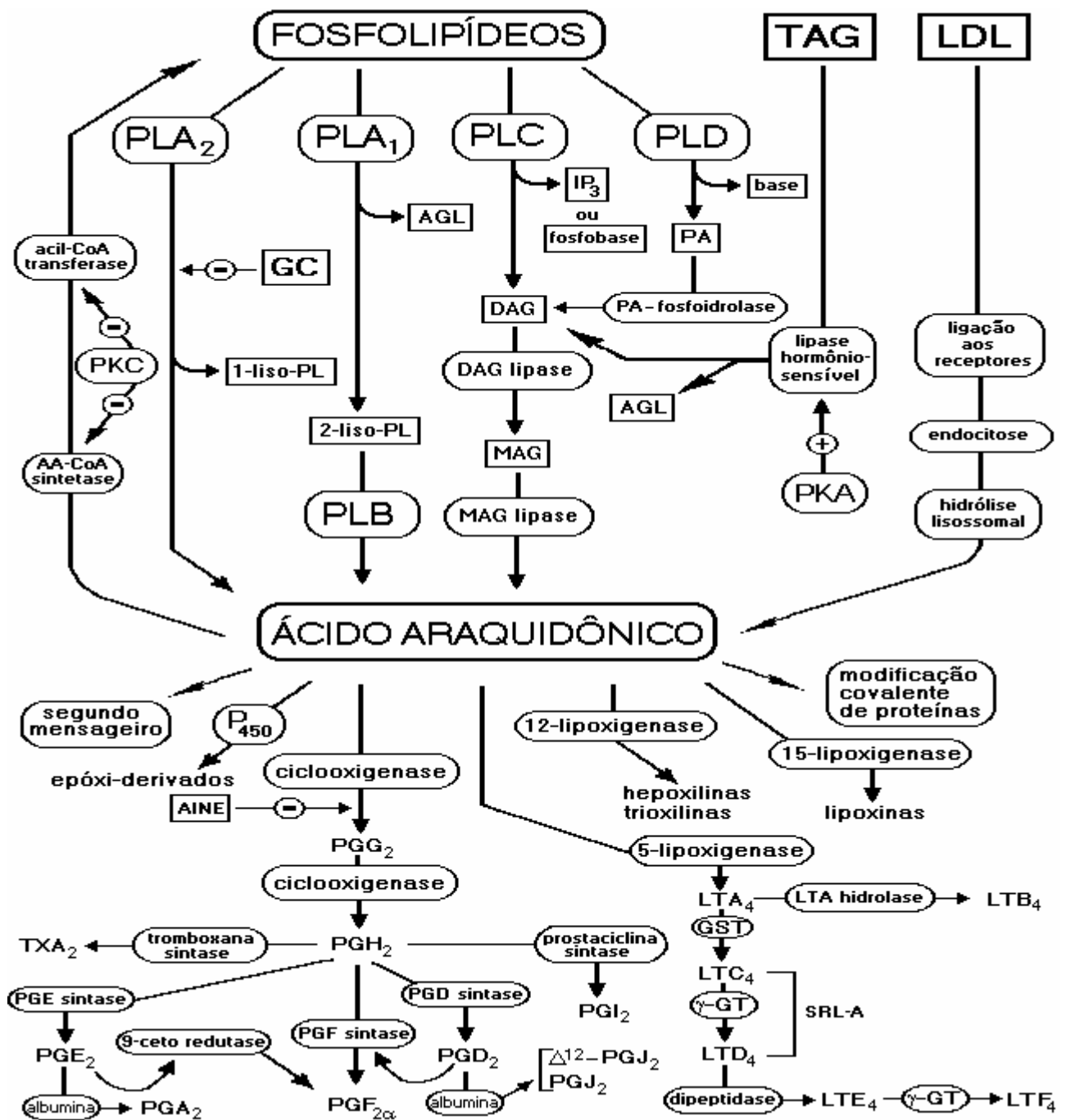


Fig. 3. Vias de liberação e metabolização do ácido araquidônico. Os passos representados por (-) e (+) significam, respectivamente, inibição e ativação das vias ou enzimas em questão. As abreviações utilizadas são: γ -GT, γ -glutamil transpeptidase; AA-CoA sintetase, araquidonil-coenzima A sintetase; AGL, ácido graxo livre; AINE, antiinflamatórios não-esteróides; base representa colina, etanolamina ou serina; ciclooxygenase, prostaglandina H endoperóxido sintase; DAG, diacilgliceróis (diglicerídeos); fosfobase representa fosfocolina, fosfoetanolamina ou fosfoserina; GC, glicocorticóides (antiinflamatórios corticosteróides); GST, glutationa S-transferases; IP₃, trisfosfato de inositol; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; liso-PL, lisofosfolípidos; LT, leucotrieno; MAG, monoacilgliceróis (monoglicerídeos); P₄₅₀, complexo microsossomal monooxigenase P₄₅₀; PA, ácido fosfatídico; PG, prostaglandina; PKA, proteína quinase A ativada por cAMP; PKC, proteína quinase C; PLA₁, fosfolipase A₁; PLA₂, fosfolipase A₂; PLB, fosfolipase B ou lisofosfolipase; PLC, fosfolipase C; PLD, fosfolipase D; SRL-A, substância de reação lenta de anafilaxia; TAG, triacilgliceróis (triglicerídeos); TX, tromboxana.

etc.) resultam de hidrólise lipídica, estimulada por receptores, devida particularmente à fosfolipase C e A₂ (ARITA, *et alii*, 1990, BURGOYNE & MORGAN, 1990; CHANG, MUSSER & MCGREGOR, 1987). A liberação de AA ocorre diretamente através da fosfolipase A₂ (PLA₂), ou indiretamente pelas fosfolipases A₁, C e D (BILLAH, *et alii*, 1990). A regulação dos níveis celulares de AA e o aumento da síntese de prostaglandinas pode se dar através da expressão de LDL ou atividade de seus receptores.

A ativação destas fosfolipases ocorre por ação de proteínas, dentre as quais está a cascata de fosforilação das proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK). A transmissão de sinais extracelulares para os alvos intracelulares é mediada por uma rede de interação de proteínas que regulam um grande número de processos celulares. O mecanismo envolve a ativação de várias moléculas sinalizadoras, seguido pela estimulação seqüencial de várias proteínas citoplasmáticas e é conhecido como cascata de sinalização das proteína-quinases ativadas por mitógeno. Uma vez estimulado o processo, ocorre a fosforilação da MAPKKK (erk) em MAPKK (MEK) e a fosforilação desta em MAPK, ativando a PLA₂ citossólica também por fosforilação (SEGER & KREBS, 1995).

Para que haja síntese de prostaglandinas a partir do AA é necessária uma modulação, que ocorre em função da presença de outros derivados metabólicos dos AA, formando o grupo conhecido como eicosanóides. O AA, depois de liberado para o citoplasma, irá produzir uma série destes eicosanóides, por diferentes vias metabólicas, a ciclooxigenase 1 e 2 (COX1 e COX2), as lipoxigenases (LOX) e outras. Os AINEs,

anteriormente citados, bloqueiam justamente a ação destas ciclooxygenases, e, portanto a síntese das prostaglandinas.

Estes eicosanóides, em especial as PGs, tem ação sobre eventos importantes, como sinalização transmembrana, diferenciação celular, proliferação (BOOYENS, *et alii*, 1984), ativação para divisão celular (COWLEN & ELING, 1992) , ou paralisação da mesma (D'ONOFRIO, *et alii*, 1986, 1992) como já citado. Além disso, estão presentes na resposta ao estresse, resposta imunológica, inativação da proliferação viral (CONTI, *et alii*,) ativação de proteínas de choque térmico (HSP) (AMICI *et alii*, 1992, 1992b; AMICI & SANTORO, 1991), e produção de radicais livres (HEMPEL, *et alii* 1993 , KALEY & KOLLER, 1993). As PGs interferem no processo de proliferação celular de tumores e também em células do sistema imunológico. A presença das mesmas no plasma dos indivíduos com tumor, é um sinalizador que parece modular a resposta imunológica negativamente no câncer (HOMEM de BITTENCOURT & CURI, 1992).

Tecidos neoplásicos, obtidos de humanos e animais experimentais produzem grandes quantidades de prostaglandinas “in vivo”, dentre as quais PGE₂ e PGD₂ (HOMEM de BITTENCOURT JR. *et alii*, 1992), levando ao aumento da produção de PGA₂ e PGJ₂ ciclopentenônicas (CP-PGs). A interconversão das PGEs e PGDs em CP-PGs ocorre em função da instabilidade das primeiras, conforme discutido anteriormente. As PGE e D desidratam gerando PGA₂ e PGJ₂, seguindo neste processo para Δ^{12} PGJ₂, e, finalmente para 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (veja **Fig.4**). Assim quando ocorre a superprodução destas CP-PGs, altamente citostáticas e citotóxicas, as mesmas são captadas por células do sistema imunológico e tumoral, através carreadores específicos (**Fig.5**).

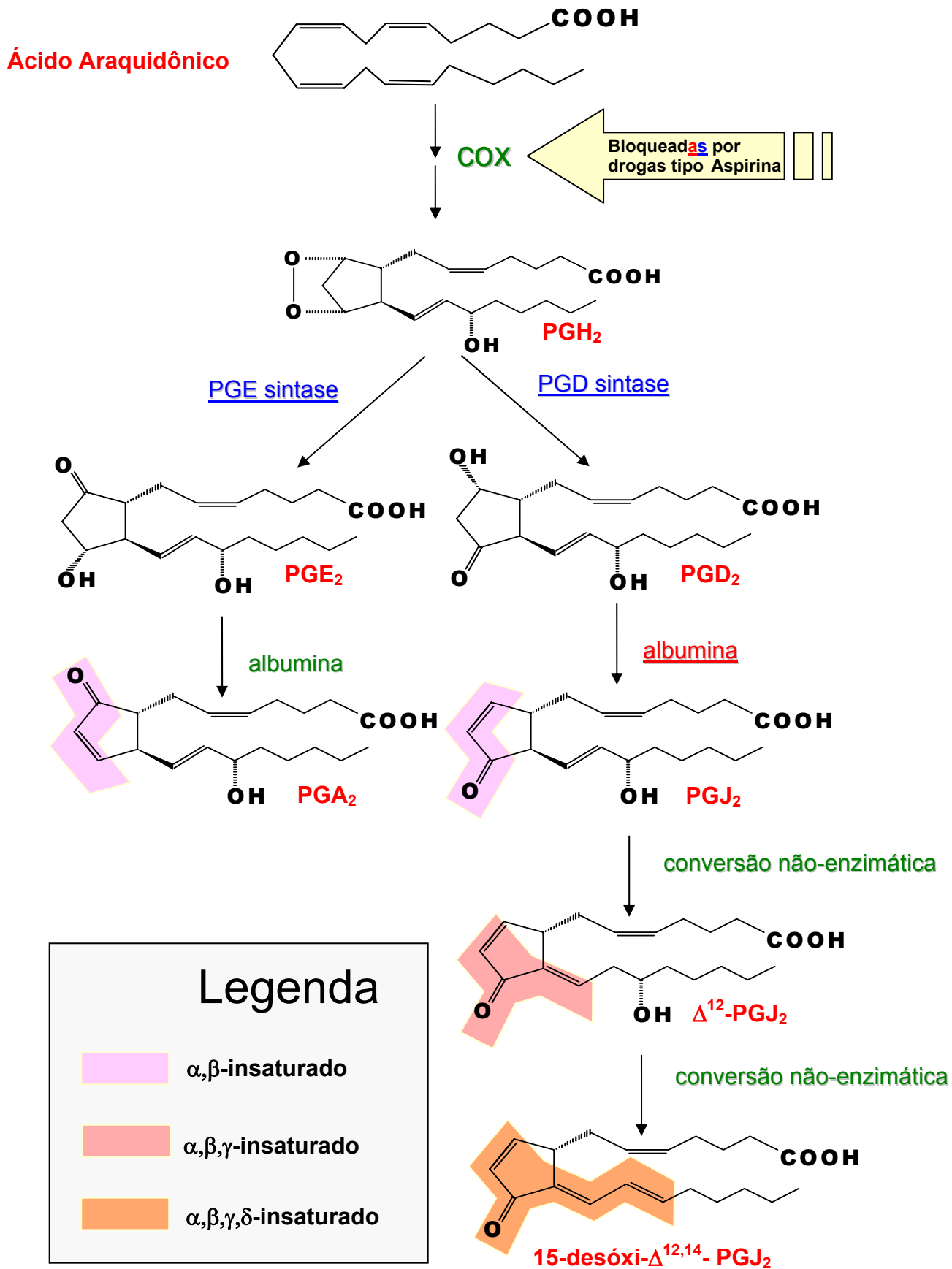


Fig. 4 Vias de geração de prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) e suas estruturas químicas. Em células de mamíferos, o ácido araquidônico é o principal precursor de prostaglandinas (PGs), apesar de outros ácidos graxos essenciais de 20 carbonos poderem gerar PGs através dos 2 passos enzimáticos catalisados pelas ciclooxigenases (COX), que são sensíveis a drogas do tipo aspirina. Depois de ser liberado dos fosfolípidos de membrana (maior estoque de ácido araquidônico) e convertido prontamente em PGH₂ via COX, PGs parentais do tipo E e D-type podem ser sintetizadas pela ação das PGE e/ou PGD sintases, dependendo do tipo celular. Na presença de albumina, estas PGs parentais podem ser transformadas nas famílias das PGA₂ e PGJ₂ respectivamente. Os centros eletrofílicos α,β-insaturados (no mínimo), que são obrigatórios para o desempenho dos efeitos biológicos das CP-PGs estão mostrados também.

Este é um evento observado no plasma de indivíduos com câncer e que pode contribuir para imunossupressão dos mesmos. Tecidos linfóides de ratos portadores do tumor de Walker 256 (TW256) acumulam grandes quantidades de CP-PGs, porém o próprio tecido tumoral não acumula (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 1992; HOMEM de BITTENCOURT JR. *et alii*, 1998b).

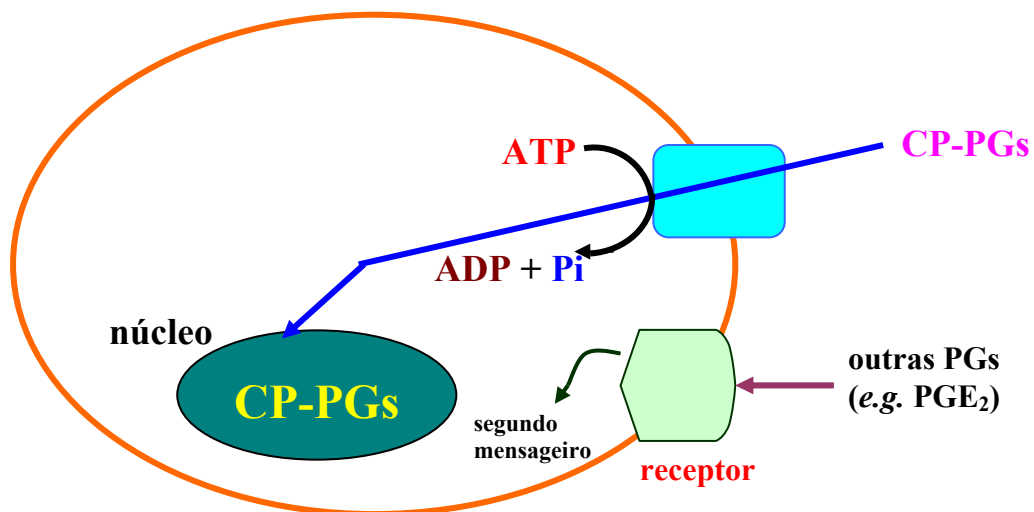


Fig. 5. Esquema da captação de prostaglandinas ciclopentenônicas por transporte ativo primário. Diferentemente daquilo que se observa para a maioria das prostaglandinas, que agem através de receptores extracelulares e geração de segundos-mensageiros intracelulares, as prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) são internalizadas por carreadores específicos por transporte ativo primário ligando-se aos núcleos das células-alvo, onde desempenham sua atividade antiproliferativa.

1.3 Metabolismo da glutatona e seus derivados

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo (γ -glutamilcisteinilglicina),
de estrutura:
$$\text{H}_3\text{N}^+ \text{CH}(\text{COO}^-) \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}(\text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COO}^-) \text{CH}_2 \cdot \text{SH}$$

cuja presença pode ser detectada em praticamente todas as células vivas com exceção de algumas bactérias. Na córnea, por exemplo, em sua forma reduzida (GSH), pode ser importante para a manutenção dos grupos sulfidrilos reduzidos em proteínas, e para remoção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e reparo dos lípidos peroxidados por superóxido e radicais hidroxila (NEWSHOLME & LEECH, 1995). A GSH é importante, também, no transporte ativo transmembrana de aminoácidos, e tem participação fundamental na resposta imunológica, uma vez que a relação entre a forma oxidada (GSSG) e a reduzida (GSH) parece ditar a entrada de linfócitos na fase *S* do ciclo celular. (DRÖGE, *et alii*, 1994).

HEMPEL & WESSELS (1993) estudaram a síntese de PGE após estresse oxidativo observando que há perda de atividade da PGH sintase endotelial em presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e que este efeito é acentuado pela depleção de GSH. Várias especulações são desenvolvidas na pesquisa destes autores, verificando a interferência da sintase de prostaciclina (PGI) no disparo da PGE isomerase, porém os mesmos identificaram que esta interferência não existe *per se*, o que ocorre é uma estreita relação entre a produção de PGEs ou PGIs e a concentração intracelular de GSH. Afirmam que a depleção de GSH pode alterar a razão de $\text{PGE}_2/\text{PGI}_2$, deslocando-a para a produção das prostaciclinas (PGIs), ou

seja, permitindo que estas se tornem predominantes. Outro estudo envolvendo estresse oxidativo e GSH demonstrou que ocorre depleção intracelular da GSH em presença de injúria oxidativa (AUCOIN, *et alii*, 1995, ANYIA & NAITO, 1993), sendo que a relação [GSSG]/[GSH] é considerada índice do estado redox intracelular.

A GSH é sintetizada praticamente em todas as células, e lá mantida em altas concentrações. A síntese da GSH é catalisada, primordialmente, por duas enzimas, γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS), e GSH sintetase. A γ -GCS é a enzima-chave e passo limitante da síntese de GSH e é conhecida por regular todo o “turnover” de controle de GSH intracelular (KONDO, *et alii*, 1993). PARKER e colaboradores (1992) demonstraram que a GSH controla sua própria síntese, ou seja, quando a concentração intracelular de GSH está baixa, a γ -GCS é liberada da retroalimentação negativa e mais GSH é produzida. Prova disto é que a adição de PGA_2 , que reage com GSH, a sistemas celulares leva à depleção de GSH, a qual é suficiente para estimular a transcrição do gene de γ -GCS (ANDERSON, 1985; AKERBOOM, *et alii*, 1981). A atividade da γ -GCS é regulada não-alostericamente por retroalimentação inibitória pela GSH (KONDO, *et alii*, 1993).

ANDERSON & MEISTER (1983) estudando o transporte e a direta utilização de γ -glutamilcisteína na síntese de GSH mostraram que a administração de γ -glutamilcistina ou dissulfeto de γ -glutamilcisteína, a camundongos, leva ao considerável aumento dos níveis de GSH no rim, comparado aqueles aos quais foi administrado glutamato mais cisteína, indicando uso preferencial de γ -glutamilcisteína para síntese de GSH.

A relação entre GSH e CP-PGs é também objetivo de estudo de muitos autores. ATSMON, e colaboradores (1989) sugerem que, quando as CP-PGs entram nas células, uma parte é transportada para organelas-alvo (*e.g.* núcleo) onde podem ligar-se a resíduos sulfidrilas das proteínas, enquanto o restante conjuga-se rapidamente com a GSH citossólica ou eflui para fora da célula, sendo esta conjugação dependente da concentração de GSH. Altas concentrações produzem conjugação mais rápida, e, quando as concentrações de GSH estão reduzidas, a velocidade de conjugação diminui. Isto permite que uma maior quantidade do composto não conjugado interaja com fatores críticos envolvidos na proliferação celular.

Estudos de nosso grupo (HOMEM de BITTENCOURT e colaboradores, 1998) sugerem que os mecanismos homeostáticos de manutenção da concentração de GSH sejam fundamentais para defesa celular contra agentes oxidantes e eletrofílicos. As CP-PGs são substâncias endógenas antiproliferativas, podendo atuar como reguladoras eletrofílicas, em virtude do grupo carbonila α,β -insaturado existente no anel ciclopentano, e que a atividade da γ -glutamilcisteína sintetase, enzima-chave da regulação da GSH, pode ser ativada por eletrófilos, incluindo as CP-PGs. Portanto, a quantidade de CP-PG intracelular pode ditar as concentrações de GSH nas células e vice-versa.

A GSH está presente nos eritrócitos em altas concentrações e é um fator vital de proteção antioxidante para estas células. Quando expostos a estresse oxidativo, os eritrócitos irão ativamente extrudar GSH oxidada (dissulfeto de GSH - GSSG), sendo que este transporte requer ATP (AWATSI *et alii*, 1981; LUNN, *et alii*, 1979; AKERBON, *et alii*, 1989).

Os conjugados de GSH são transportados dos eritrócitos humanos através de um processo ativo primário dependente de ATP, o qual é mediado pela ATPase bomba GS-X, que estimula a hidrólise de ATP na presença de 2,4-dinitrofenil-S-glutationa (DNP-SG), e outros conjugados de GSH. (BOARD, 1981, SHARMA, *et alii*, 1990, SINGHAL, *et alii*, 1991, AKERBOOM, *et alii* 1991). Vesículas preparadas a partir de membranas de eritrócitos humanos mostraram hidrólise de ATP estimulada por DNP-SG, dependente da temperatura e de Mg^{2+} , e independente de outros processos ativos que utilizam ATP presente nas membranas dos eritrócitos. (LABELLE, *et alii*, 1989.)

Células animais são capazes de sintetizar GSH, quando desafiadas com agentes eletrofílicos. Esta capacidade pode ser mais importante que o próprio nível de GSH intracelular no momento do desafio. Quando as células são expostas à radiação, por exemplo, ocorre um marcado aumento da velocidade de síntese de GSH, indicando a relevância da GSH na proteção contra radiação, bem como contra outros agentes tóxicos (MOORE, *et alii*, 1988, AMICI & SANTORO, 1991).

1.4. Interconversão de prostaglandinas e a imunossupressão no câncer

A observação de que o plasma de indivíduos portadores de câncer apresenta altas concentrações de PGE_2 e PGD_2 e o fato de que estas PGs podem ser facilmente transformadas em CP-PGs levou-nos à proposição de que a interconversão de PGs (**Fig. 2**) poderia ser responsável, pelo menos em parte, pela dramática imunossupressão observada em pacientes terminais de câncer (veja **Fig. 6**, para a explicação detalhada da hipótese, por favor). Esta possibilidade vem sendo testada em

nosso laboratório utilizando-se do tumor de Walker 256 em ratos como modelo experimental (HOMEM de BITTENCOURT & CURI, 1992). Este tumor é um carcinossarcoma caracterizado pela conspícua imunossupressão e caquexia que produz nos animais experimentais (FERNANDES *et alii*, 1990). Ratos portadores do tumor de Walker 256 mostram altas concentrações plasmáticas de PGE₂ (SIDDIQUI & WILLIAMS, 1987), enquanto que a administração a esses animais de doses subantiinflamatórias de AINES do tipo aspirina (que inibem a síntese de PGs) reduz dramaticamente o crescimento tumoral, melhorando o ganho de massa corpórea, ingestão alimentar e insulinemia (que se encontram francamente diminuídos com o desenvolvimento da caquexia associada ao crescimento deste tipo de tumor) (HOMEM de BITTENCOURT *et alii*, 1989; CURI *et alii*, 1995). Além disso, como discutido anteriormente, tecidos imunológicos destes animais acumulam grandes quantidades da CP-PG PGA, o que não acontece com o próprio tecido tumoral destes animais, onde não se detectam CP-PGs (HOMEM de BITTENCOURT & CURI, 1992). Essa observação experimental levantou, então, a seguinte questão: se a interconversão de PGs em CP-PGs realmente ocorre no plasma de indivíduos com câncer como seria possível que o acúmulo de CP-PGs dê-se exclusivamente em tecidos imunológicos e não nos tumores? Isso é especialmente intrigante tendo em vista que todas as células eucarióticas já testadas captam ativamente e prontamente CP-PGs oferecidas em meios de cultura sendo susceptíveis a seus efeitos antiproliferativos. A caracterização de uma ATPase de membrana (a bomba GS-X), responsável pela extrusão, por parte de muitas células, de eletrófilos hidrofóbicos na forma de S-conjugados de glutatona (ISHIKAWA 1992) forneceu os primeiros subsídios para que se encontrasse a resposta a esta pergunta.

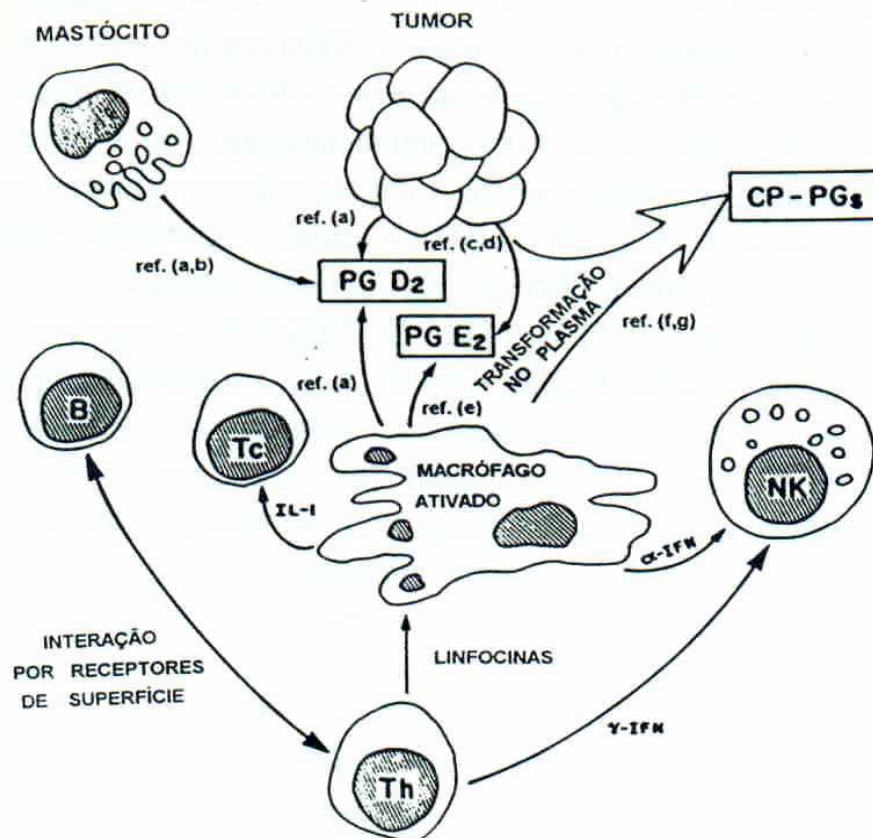


Fig. 6. Representação esquemática da interconversão de prostaglandinas no plasma de animais com câncer. No estágio inicial da doença, tumores e células apresentadoras de antígenos, especialmente macrófagos, produzem grandes quantidades de PGE_2 e PGD_2 que podem ser transformadas enzimaticamente no plasma dos animais portadores de tumores em PGA_2 e $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$, respectivamente. No esquema, **B** representa linfócitos B; **T**, linfócitos T; **T_h**, células T auxiliares; **T_c**, células T citotóxicas; **NK**, células "natural killer" ou matadoras naturais; **IFN**, interferon; **IL**, interleucina. Referências: (a) Urade *et alii*, 1989; (b) Ito *et alii*, 1989; (c) Williams *et alii*, 1968; (d) Williams & Siddiqui, 1990; (e) Scott *et alii*, 1982; (f) Ohno *et alii*, 1986; (g) Kikawa *et alii*, 1984.

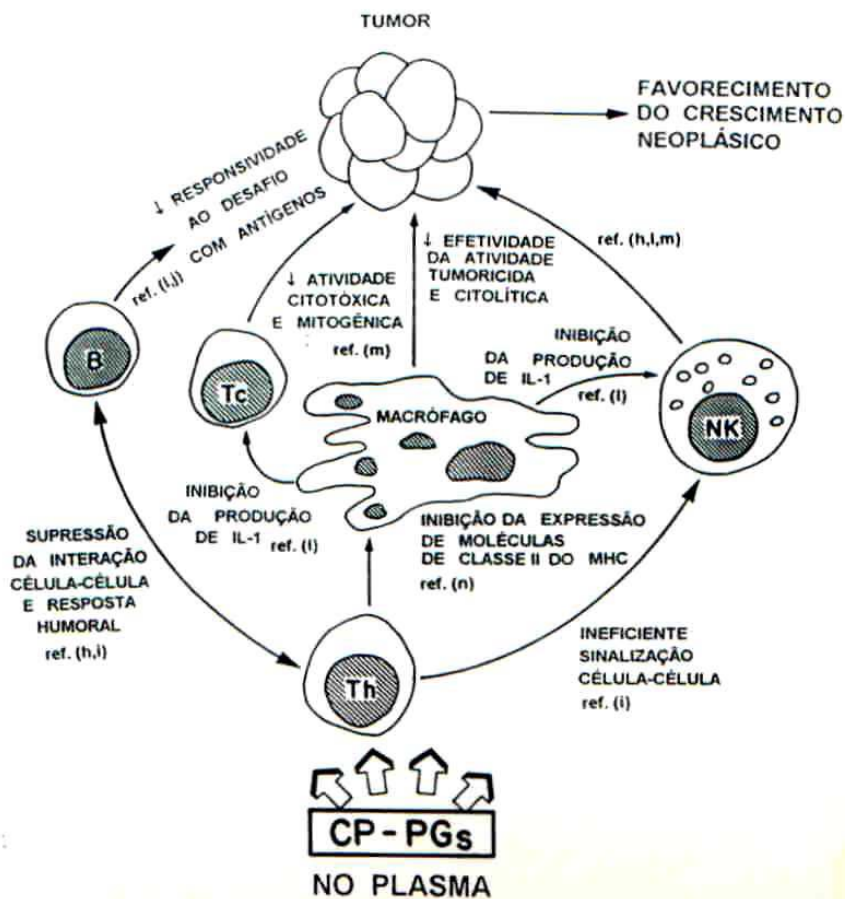


Fig. 7. Esquema do efeito imunossupressor de prostaglandinas ciclopentenônicas no câncer. Nos estágios finais do câncer, as prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) PGA_2 e $\Delta^{12} PGJ_2$, presentes em altas concentrações no plasma dos animais portadores de tumores, são captadas por células do sistema imunológico através de transportadores específicos. Após captação, as CP-PGs ligam-se aos núcleos destas células impedindo a progressão do ciclo celular além da fase G_0/G_1 . Além disso, estas prostaglandinas apresentam uma série de outros efeitos deletérios sobre a resposta imunológica o que favorece o crescimento do tumor. No esquema, **B** representa linfócitos B; **T**, linfócitos T; **Th**, células T auxiliares; **Tc**, células T citotóxicas; **NK**, células "natural killer" ou matadoras naturais; **IFN**, interferon; **IL**, interleucina. Referências: (h) Yurochko *et alii*, 1990; (i) Leung & Mihichi, 1980; (j) Phipps *et alii*, 1989; (l) Jakob *et alii*, 1990; (m) Petrini *et alii*, 1988; (n) Pelus *et alii*, 1988.

1.5 Fisiologia do transporte através da bomba GS-X/MRP e a resistência múltipla a drogas no câncer.

Células vegetais e animais são capazes de eliminar um amplo espectro de toxinas hidrofóbicas do citossol para o espaço extracelular após a conjugação das mesmas com GSH (para revisão, veja ISHIKAWA *et alii*, 1997, por favor). Este transporte é mediado por uma nova classe de transportadores de ânions orgânicos pertencentes à família dos transportadores do tipo ABC (do Inglês, *ATP-binding cassette carriers*), as bombas GS-X (ISHIKAWA *et alii*, 1997). Esses carreadores medeiam um transporte ativo primário dependente de ATP e Mg^{2+} e sensíveis à inibição por íons vanadato (à seguir ilustrado na **Fig. 8**).

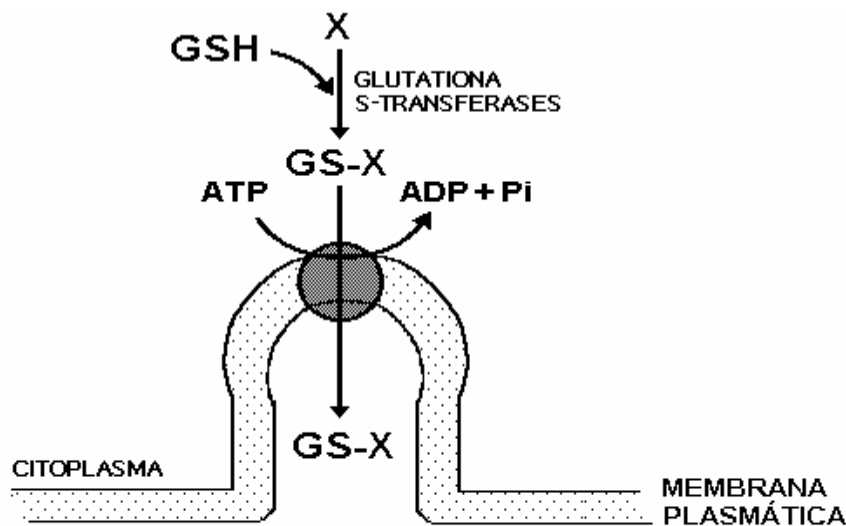


Fig.8 Localização e funcionamento da bomba GS-X. A ATPase de S-conjugados de glutatona ou bomba GS-X localiza-se, pelo menos em todas as células até então testadas, na membrana plasmática das mesmas e exporta substâncias eletrofílicas (X) para o extracelular após a conjugação das mesmas com moléculas de glutatona (GSH), o que se dá no citoplasma pela ação das glutatona S-transferases.

Trata-se de ATPases que extrudam S-conjugados (GS-conjugados) de GSH e exibem alta afinidade por GS-conjugados contendo longas cadeias carbônicas alifáticas sendo os transportadores fisiológicos de uma série de GS-conjugados, incluindo GSSG e leucotrieno C₄ (LTC₄) (ISHIKAWA,1992; ISHIKAWA *et alii*, 1997; LAM *et alii*, 1992). A velocidade do transporte de GS-conjugados de GSH e S-(2,4-dinitrofenil-S-glutathiona) pelas membranas está diretamente relacionada com a expressão da proteína de multiresistência a drogas (MRP) (DE BRUIJN, 1990; JEDLITSCHKY, *et alii*, 1994). A atividade da bomba GS-X já foi detectada em uma grande variedade de tecidos, como nas membranas canalicular e basolateral de hepatócitos, vesículas de sarcolema cardíaco, eritrócitos humanos e células tumorais (ISHIKAWA *et alii*, 1997; MÜLLER *et alii*, 1994), sendo que a deficiência na expressão desta proteína resulta na hiperbilirrubinemia de conjugada observada em ratos Wistar mutantes TR⁻ (KITAMURA *et alii*, 1990), uma condição patológica similar à hiperbilirrubinemia do tipo II ou síndrome de Dubin-Johnson encontrada em humanos. A expressão da bomba GS-X e o aumento da biosíntese de GSH juntos podem ser importante fator no metabolismo celular por regular o estado redox e a proliferação celular (ISHIKAWA *et alii*,1996, SHEN *et alii*, 1996).

Uma vez que as bombas GS-X extrudam GS-conjugados de eletrófilos anticâncer, como cisplatina, e outras drogas anticâncer não modificadas, como vimblastina e metotrexato, estas ATPases ameaçam as estratégias de quimioterapia contra o câncer porque causam resistência ao tratamento e as drogas utilizadas não acumulam dentro das células tumorais

como esperado. Além disso, células leucêmicas humanas resistentes à cisplatina superexpressam a atividade bomba GS-X o que causa resistência adquirida e cruzada a uma grande quantidade de outras drogas anticâncer (como revisão, veja, por favor, ISHIKAWA *et alii*, 1997).

Células tumorais podem suplantar o desafio por drogas anticâncer e outras substâncias hidrofóbicas biologicamente ativas de natureza endógena exportando-as por intermédio de diferentes sistemas de efluxo unidirecional. Vários transportadores de membrana da família dos ABC foram descritos neste contexto sendo que estas proteínas de transporte muitas vezes estão envolvidas na eliminação de substâncias antiproliferativas. A família dos transportadores ABC compreende uma variedade de carreadores cuja expressão está envolvida no fenótipo de resistência múltipla a drogas (MDR, do Inglês: *multidrug resistance*) e inclui a pequena família de glicoproteínas de membrana de 170 kDa (glicoproteínas-P, ou P-170) codificadas pelos genes MDR (RUETZ & GROS, 1984). Além destes produtos gênicos, recentemente foi identificada uma outra subfamília de transportadores do tipo ABC não-glicoproteína-P caracterizadas pela indução do fenômeno de MDR (COLE *et alii*, 1992). Curiosamente, esta nova classe de proteínas associadas ao fenômeno MDR, conhecidas como MRP (do Inglês, *MDR-associated protein*) lembra, em muitos aspectos, as bombas GS-X. Logo, tornou-se claro que o produto do gene MRP1 de 190 kDa era uma bomba GS-X (PAULUSMA *et alii*, 1996). Como observado para as bombas GS-X, a MRP transporta uma variedade de GS-conjugados, incluindo leucotrieno C₄, hidrolisando, para tanto, ATP (LOE *et alii*, 1996). Muitas linhagens de células cancerosas resistentes a quimioterapia exibem um notável efluxo de GS-conjugados

dependente da expressão da MRP (CHUMAN *et alii* 1996; ISHIKAWA *et alii*, 1996). Por outro lado, a transfecção de células com o gene MRP1 e sua super expressão sozinhos são suficientes para causar um processo de MDR não mediado por glicoproteína-P (MÜLLER *et alii*, 1994; PAULUSMA *et alii*, 1996). Ao contrário, a co-transfecção de mRNAs anti-senso para a MDR1 e MRP1 anula o efeito de multi-resistência a quimioterápicos normalmente apresentado por células de câncer de pulmão humano, que super expressam ambos os genes (GAO *et alii*, 1998). Cinco genes homólogos MRP (MRP2-6) incluindo o novo homólogo do transportador canalicular hepático multiespecífico de ânions orgânicos (cMOAT, do Inglês *hepatic canalicular multispecific organic anion transporter*) foram recentemente clonados em diferentes linhagens celulares nas quais a expressão destes genes parecem estar correlacionados com a resistência a drogas. Assim, até o presente momento, pelo menos seis homólogos MRP são conhecidos: MRP1 (ou MRP), MRP2 (também conhecido como cMOAT), MRP3 (também conhecido como MOAT-D), MRP4 (também conhecido como MOAT-B), MRP5 (também conhecido como MOAT-C) e MRP6 (BELINSKY *et alii*, 1998; KOOL *et alii*, 1999; LOE *et alii* 1998). Além disso, estudos recentes sugerem que as bombas MRP/GS-X podem mediar o co-transporte de drogas anticâncer (*e.g.* alcalóides da vinca) juntos com GSH (LOE *et alii*, 1998).

1.6 Resistência aos efeitos antiproliferativos das CP-PGs e o papel da MRP/bomba GS-X na imunossupressão no câncer

O grupamento carbonila α,β -insaturado das CP-PGs (veja **Fig.4**, por favor) é eletrofílico e, portanto, susceptível à ligação covalente com o grupamento tiol da cisteína da GSH, numa reação catalisada pelas GSH

S-transferases (GST). Esta reação produz GS-conjugados de CP-PGs biologicamente inativos (HONN & MARNETT, 1985; ATSMON *et alii*, 1990). É razoável propor-se, então, que a MRP/bomba GS-X possa exportar GS-conjugados de CP-PGs, como sugerido por Ishikawa (1992), fazendo desta ATPase um modulador dos efeitos biológicos das CP-PGs. A PGA_1 , que é uma CP-PG, é também um potente inibidor do efluxo de metotrexato pela MRP/bomba GS-X através da formação de GS-conjugados que competem com o metotrexato nas células tumorais (HENDERSON *et alii*, 1994). Além disso células leucêmicas humanas que superexpressam a MRP/bomba GS-X são também resistentes ao tratamento com derivados eletrofilicos da PGA. A sensibilidade ao tratamento com CP-PGs pode variar enormemente (HOMEM DE BITTENCOURT *et alii*, 1998a; c), e parece estar associada à atividade MRP/bomba GS-X (HOMEM de BITTENCOURT *et alii*, 1998c). Por via de regra, tumores sólidos exibem a mais alta atividade MRP/bomba GS-X detectável nos estudos realizados. Estes tumores apresentam uma atividade comparável apenas àquela encontrada em hepatócitos, enquanto que células leucêmicas e células normais derivadas da linhagem branca do sangue mostram níveis extremamente baixos desta atividade (HOMEM de BITTENCOURT *et alii*, 1998b).

Estudos realizados com células tumorais demonstraram que diferentes linhagens de células são caracterizadas por diferentes atividades da bomba GS-X. Dentre as células estudadas destacam-se as linhagens de carcinoma de laringe humano HEp-2 e a leucemia humana pro-mielocítica HL-60 (AHMED, WILLIAMS & WEIDEMANN, 1991) por apresentarem, respectivamente, a maior e a menor atividade MRP/bomba GS-X detectada.

Mesmo tendo sido encontrados níveis ligeiramente mais altos de GSH em HEp-2 (câncer de laringe humano) do que nas células de HL-60 (leucemia humana pró-mielocítica), as atividades da γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS), da GSH peroxidase (GSPx), GSH S-transferase (GST) e GSSG redutase (GSRd) foram muito maiores nas células HL-60 do que na Hep-2, indicando que as primeiras são capazes de gerar GSH suficiente para permitir a conjugação com os eletrófilos, sugerindo que as diferenças na exportação de DNP-SG entre as duas não são devidas ao decréscimo da atividade de GST ou impedimento da síntese *de novo* de GSH, mas devido às diferenças da atividade da bomba GS-X nas membranas celulares (HOMEM DE BITTENCOURT *et alii*, 1998a).

Apesar de macrófagos de rato exibirem uma baixa atividade MRP/bomba GS-X, macrófagos ativados imunologicamente por BCG (Bacillus Calmette-Guérin) mostram um conspícuo aumento na atividade de transporte através desta ATPase (HOMEM de BITTENCOURT *et alii*, 1998b), o que sugere que, sob estímulos adequados (*e.g.* durante o disparo de uma resposta imunológica), os macrófagos sejam capazes de se defender contra as CP-PGs, que são eletrofilicas, exportando-as para o extracelular por intermédio da MRP/bomba GS-X. Este não é o caso, entretanto, de linfócitos; mesmo depois de estimulação mitogênica, que induz dramáticas alterações no metabolismo e ativação dos linfócitos (HOMEM de BITTENCOURT *et alii*, 1994) a atividade MRP/bomba GS-X nestas células é desproporcionalmente baixa em relação àquela encontrada em outros tipos celulares, incluindo outras linhagens hematopoéticas (HOMEM de BITTENCOURT *et alii*, 1998b). Assim, linfócitos exibem uma “ausência funcional” da MRP/bomba GS-X que pode ser insuficiente

para eliminar as CP-PGs num microambiente onde a concentração de CP-PGs pode ser muito elevada (e.g. em sítios inflamatórios ou nas proximidades de células tumorais). Então, as observações anteriores suportam a proposição inicial de que o acúmulo das CP-PGs nos tecidos linfóides de ratos portadores do tumor de Walker 256 (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 1992) pode estar relacionada com a deficiência na atividade MRP/bomba GS-X em linfócitos. Estes resultados contrastam com a alta atividade da MRP/bomba GS-X detectada em muitos tumores sólidos, o que pode facilitar a eliminação de CP-PGs nestas células. Estes achados estão também em acordo com o fato de que, em ratos portadores do tumor de Walker 256, o tecido tumoral *per se* não acumula nenhuma quantidade detectável de CP-PGs (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 1992). Finalmente, uma deficiente expressão da MRP/bomba GS-X em linfócitos de indivíduos portadores de câncer poderia ter um impacto adverso sobre a função imunológica destes pacientes, já que permitiria o acúmulo de CP-PGs em células imunológicas e a conseqüente imunossupressão, o que aceleraria a caquexia e a morte do indivíduo (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 1992; HOMEM DE BITTENCOURT et alii, 1998b).

Em síntese, os resultados dos estudos realizados até então sugerem que células de tumores sólidos apresentam atividade da MRP/bomba GS-X muito mais elevada do que a encontrada em células imunológicas. Entretanto, esta possibilidade, embora provável a partir de estudos *in vitro*, não fora testada em modelos animais *in vivo*. Neste trabalho, foi investigada a possibilidade de que a baixa atividade da MRP/bomba GS-X em linfócitos de ratos portadores do tumor de Walker 256 pudesse estar

contrastando com uma possível alta atividade das células do próprio tumor, e que isso possa levar ao acúmulo de CP-PGs nos linfócitos (induzindo imunossupressão), enquanto que as células tumorais permaneceriam livres dos efeitos das CP-PGs.

OBJETIVOS

Conforme apresentado na Introdução, as evidências acumuladas sugerem que exista a possibilidade de que linfócitos apresentem atividade da MRP/bomba GS-X muito mais baixa que a observada em tecidos tumorais e que isso contribua para a imunossupressão e favorecimento do crescimento tumoral. Entretanto, esta possibilidade ainda não havia sido testada *in vivo*. Neste trabalho será investigado:

1º - a atividade da MRP/bomba GS-X em tecido tumoral, especificamente no tumor de Walker 256,

2º - em comparação com a atividade da MRP/bomba GS-X em linfócitos do mesmo animal portador de tumor de Walker 256;

3º - a relação entre os dados encontrados, comparando-se a atividade da MRP/bomba GS-X em linfócitos de animais normais, linfócitos de animais portadores do TW 256, e com o tecido do próprio tumor;

4º - a expressão de enzimas do metabolismo da GSH neste modelo experimental, para assegurarmos que as diferenças encontradas na capacidade de exportação pela referida ATPase fossem realmente devidas à presença ou não da MRP/bomba GS-X.

MÉTODOS

3.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), machos, adultos com idade entre 2,5 à 5,5 meses, obtidos no Biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais receberam, *ad libitum*, dieta comercial padrão, contendo 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4 % de lípidos, e água da rede comum.

3.2 Preparações celulares

3.2.1 Replicação de células tumorais

A obtenção de células tumorais subcutâneas é feita pela aplicação de 1,5 ml de suspensão contendo aproximadamente 10^7 células tumorais, subcutaneamente, no flanco direito, na região médio-posterior da pata traseira, ou intraperitonealmente (i.p.).

A referida suspensão é preparada a partir de tecido obtido de animais utilizados para manutenção da cepa do TW256 (conforme HOMEM de BITTENCOURT & CURI, 1992). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o tecido tumoral retirado, limpo

dos resíduos de necrose e fibrose, e conservado em solução salina (NaCl 154 mM), ou solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Este tecido foi, então, triturado com o auxílio de homogeneizador do tipo Mixer Wallita[®] e filtrado em gaze, adicionando-se em torno de 1.200.000 unidades/ml de penicilina (Benzetacil), para cada 10 a 12 ml de suspensão obtida, para evitar possível processo e conseqüente resposta inflamatória, a qual poderia ativar a produção por células imunológicas do fator de necrose tumoral (TNF) impedindo o crescimento do tumor. No caso de aplicação i.p., a penicilina foi suprimida.

3.2.2 Preparação de células intraperitoneais do tumor de Walker 256

Para obtenção de células do tumor de TW 256 em suspensão, os animais foram infiltrados com cerca de 10^7 células do referido tumor, 3 semanas antes dos experimentos. No momento da preparação das células, os animais foram sacrificados, como antes descrito, e, em seguida as células do lavado peritoneal foram recolhidas em 15 ml de Hank's, em banho de gelo, conforme HOMEM de BITTENCOURT *et alii* (1993).

Os macrófagos contaminantes foram separados das células do TW256, por plaqueamento da suspensão intraperitoneal, em meio RPMI 1640, por 2 horas a 37°C, e 5% CO₂/ar. Depois deste período, as células do TW256 (em suspensão) foram separadas dos macrófagos (aderidos), e, posteriormente, centrifugadas a 1000 x g por 5 min. Após, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular submetido a tratamento com solução de hemólise (GADD & HANSBROUGH, 1990) em banho de gelo por 5 min depois do que, e a suspensão foi diluída com solução de Hank's e centrifugada a 1000 x g por 5 min.

3.2.3 Preparação de linfócitos de linfonodos mesentéricos de ratos

Para realização dos experimentos com linfócitos, foram sacrificados de 3 a 4 animais e, então, os linfonodos mesentéricos foram removidos cirurgicamente, retirada a gordura circundante, e os mesmos foram conservados em PBS, em banho de gelo, como descrito em HOMEM DE BITTENCOURT *et alii* (1993). A seguir, os linfócitos foram separados do tecido linfóide por esmagamento (em obtentor gradeado de tecidos), (VIEIRA *et alii*, 1992), filtrados em filtro de Whatmann, e centrifugados a 1000 x g por 5min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, após quebra, submetido à solução de hemólise por 5 min, em banho de gelo (queira ver **Protocolo para Hemólise de Eritrócitos Contaminantes**, por favor) a 4°C por 5 min para a remoção de eritrócitos conforme descrito em GADD & HANSBROUGH (1990). Depois de terem sido preparadas, as células foram pré-incubadas a 37°C, 5% CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 10% (v/v) SFB por 2 h em placas de poliestireno (Corning) a fim de se eliminarem as células contaminantes aderentes. Este tipo de preparação garante uma suspensão altamente pura em linfócitos (mais de 99,5%) conforme avaliado previamente por exame de preparações histológicas coradas pela técnica da hematoxilina/eosina (HOMEM DE BITTENCOURT *et alii*, 1993). A determinação da viabilidade celular, feita pelo método da exclusão do azul Trypan, indicou sempre uma proporção maior que 98% de células viáveis. Quando submetidos a cultura celular, os linfócitos assim obtidos foram mantidos em meio RPMI 1640 adicionado de 10% (v/v) de SFB sob condições idênticas às descritas para as células obtidas de culturas permanentes. Testes de viabilidade celular indicaram uma proporção sempre maior que 97% de linfócitos viáveis após 48 h de

cultivo nestas condições. Preparação idêntica foi realizada para a obtenção de linfócitos de animais portadores do TW256.

3.2.4 Linhagens permanentes

Foram utilizadas as linhagens tumorais humanas: Hep-2 (carcinoma de laringe) e HeLa (adenocarcinoma de cérvix uterino). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO BRL Life Technologies Ltda. Scotland, UK), contendo L-glutamina 2 mM, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), a 37°C em atmosfera umidificada de 5% (v/v) de CO₂ em ar, numa estufa-incubadora (Harris, USA).

3.3 Medida da capacidade de exportação de conjugados de GSH em células intactas incubadas

No sentido de se avaliar a capacidade de produção e exportação de S-conjugados de glutathiona, as células foram incubadas por diferentes períodos de tempo (15, 30, 45 e 60 min) na presença de 1-Cl-2,4-dinitrobenzeno 50 µM (CDNB, Sigma) em tampão PBS (GIBCO). O corante CDNB é substância de escolha para este tipo de determinação bioquímica uma vez que é substrato universal para todas as isoformas conhecidas das glutathiona S-transferases (GST, E.C. 2.5.1.18) (HABIG & JAKOBY, 1981; AKERBOON & SIES, 1989) que medeia a conjugação de moléculas de GSH com substâncias eletrofílicas. CDNB é uma substância altamente eletrofílica reagindo prontamente com GSH para produzir o conjugado (2,4-dinitrofenil)-S-glutathiona (DNP-SG) que, por sua vez, é bastante estável e apresenta um espectro UV (com absorção máxima a 340 nm) que difere claramente daquele do precursor CDNB ($\lambda_{\text{máx}}$ a

252 nm). Estas características permitem, então, a medida espectrofotométrica do conjugado em formação (**Fig. 9**). Pelo menos numa faixa de concentração de até 100 μM , o CDNB mostrou-se ser não-tóxico para as células estudadas conforme avaliado pela viabilidade celular que, após 120 min de incubação, apresentou-se inalterada (dados não mostrados).

Para as incubações, foram preparados linfócitos de linfonodos mesentéricos e células do TW256 obtidas do lavado peritoneal de ratos inoculados i.p. conforme descrito anteriormente. Na preparação de linfócitos, os linfonodos mesentéricos foram retirados e limpos, como anteriormente descrito, e as células conservadas em solução de Hank's Balanced salt solution – (HBSS), sem adição de penicilina, até o momento das dosagens. O período entre a obtenção das suspensões celulares e as dosagens esteve entre 2-3 horas. Por sua vez, as células do TW256 i.p. foram obtidas e purificadas como descrito na seção 3.2.2 (acima).

Após as preparações, as células foram ressuspensas em 21 ml de solução HBSS e aliqotadas em 20 tubos de microcentrífuga (Eppendorf 2 ml), na razão de 1 ml em cada (o restante da suspensão foi utilizado posteriormente para contagem de células). Em seguida, as alíquotas foram centrifugadas em microcentrífuga de mesa, por 30 s à velocidade máxima (15.000 x g) e os sobrenadantes descartados para que fossem iniciados os experimentos de captação-exportação, pela ressuspensão das células ($1-2 \times 10^6$ por preparação) em solução de CDNB (50 μM) ou no veículo (PBS). Soluções-estoque de CNDB foram preparadas em etanol absoluto na concentração de 100 mM tendo sido utilizado 1 μl desta solução para cada 2 ml de solução final em PBS. Os tubos foram mantidos em banho

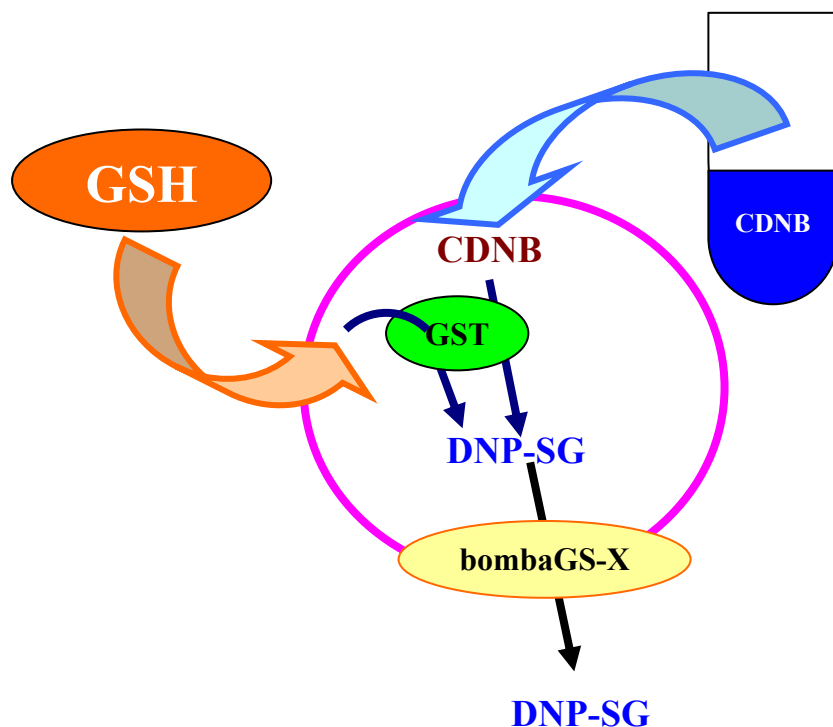


Fig. 9 Determinação espectrofotométrica da exportação de S-conjugados de glutatona. s Células de interesse foram incubadas na presença de 1-Cl-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, 50 μ M) (A) ou do diluente (C), por vários períodos de tempo, tendo sido avaliado o incremento na absorvância a 340 nm (formação do conjugado 2,4-dinitrofenil-S-glutathione, DNP-SG) sob as condições descritas no texto desta seção. Paralelamente, foram efetuadas incubações do CDNB em PBS (B).

maria, com agitação, e as medições foram realizadas em espectrofotômetro (340 nm) em intervalos de 15 min, a partir do tempo zero. Experimentos preliminares mostraram que a atividade máxima de exportação do conjugado nas células estudadas deu-se 15 min após a adição do CDNB, nas condições empregadas.

Os "brancos" espectrofotométricos foram conduzidos em PBS igualmente. No tempo zero, as células receberam CDNB (ou PBS) em gelo e foram imediatamente submetidas a incubação a 37°C ou banho de gelo. Os valores obtidos para as amostras conservadas em gelo durante todo o período de incubação foram, então, subtraídos dos demais pontos. Sob as condições experimentais descritas, as absorvâncias das preparações-controle entre 250 e 400 nm permaneceram sempre constantes durante os períodos de incubação, de maneira que o aumento detectado na

absorbância a 340 nm refletiu sempre incremento na concentração do conjugado DNP-SG. Embora as células tenham sido tratadas com CDNB e o conjugado DNP-SG tenha sido analisado sem prévia lavagem das células para a remoção do CDNB não importado (*i.e.*, um na presença do outro), experimentos preliminares mostraram que a lavagem das células após incubação com CDNB não afeta as taxas de exportação do conjugado. Além disso, experimentos onde os estoques intracelulares de glutathione foram marcados com [2-³H]-glicina indicaram que as células estudadas sintetizam DNP-SG ([2-³H]-glicina) quando incubadas com CDNB (HOMEM DE BITTENCOURT *et alii*, 1998a). Também não foi observada

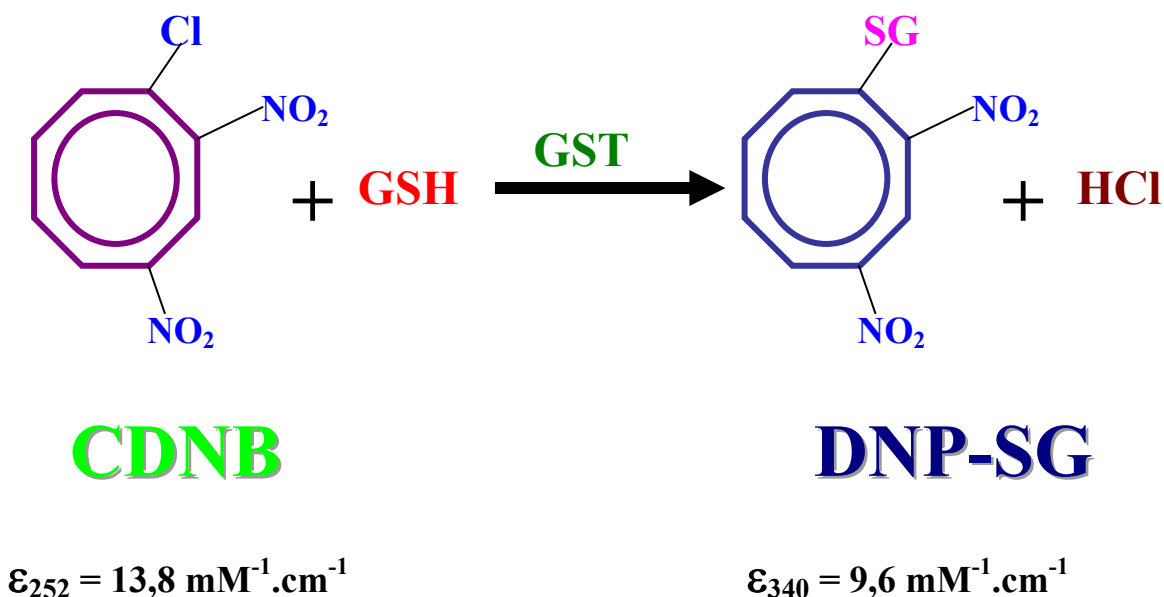


Fig. 10 Esquema da reação de conjugação intracelular do CDNB com GSH pela ação das glutathione S-transferases. A figura mostra a reação de conjugação e os respectivos coeficientes de absorção (ϵ) dos participantes nos comprimentos de onda de absorção máxima.

alteração na absorbância a 340 nm na análise dos sobrenadantes de meios de incubação de CDNB com as células em gelo (quando não ocorre exportação do conjugado para o espaço extracelular). Isso indica que a conjugação do CDNB com moléculas de GSH (**Fig. 9**) deva ocorrer intracelularmente. As taxas de produção de DNP-SG foram expressas em termos das médias \pm EPM das amostras em duplicatas e foram calculadas com base no coeficiente de absorção milimolar do DNP-SG a 340 nm ($9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em $\text{pmol}/\text{min}/10^6$.

Este protocolo, no entanto, não identifica falhas na captação de CDNB e/ou na conjugação do mesmo com moléculas de GSH no meio intracelular; apenas consegue avaliar a exportação total dos conjugados sintetizados intracelularmente. O que, em poucas palavras, significa que não é possível afirmar-se que não ocorre exportação pela bomba GS-X quando não se observa incremento na absorbância a 340. Através deste experimento, somente, é impossível saber se a baixa, ou inexistente, taxa de aparecimento do conjugado no banho de incubação possa ser devida a alterações na conversão, ou ineficácia da bomba. Assim sendo, para que se tenha um quadro fidedigno do processo completo é necessário estudar-se três pontos simultaneamente nos modelos experimentais investigados: **a)** medida da atividade da bomba GS-X na membrana plasmática das células estudadas, **b)** medida das concentrações intracelulares de GSH (sem a qual não existe conjugação) e, finalmente, **c)** medida da capacidade de conjugação de moléculas do substrato CDNB com a GSH intracelular através das GSH *S*-transferases (GST).

As medidas da atividade das GST e das concentrações intracelulares de GSH foram conduzidas através da utilização de

determinações clássicas descritas na literatura. No entanto, para a determinação da atividade da ATPase bomba GS-X, existem apenas métodos que utilizam substratos radioativos (como DNP-SG [³H] ou LTC₄ [³H]) (HOMEM de BITTENCOURT *et alii*, 1998a,b,c; ISHIKAWA *et alii*, 1990). Porém, como se sabe, estes procedimentos envolvem riscos, são onerosos e apresentam o inconveniente de serem técnicas cuja aquisição de dados não é “online”. Por esta razão, passamos a desenvolver uma série de procedimentos onde se pudesse evitar o uso de materiais radioativos. Realizamos, assim, a padronização de uma técnica para a determinação espectrofotométrica da atividade ATPásica da bomba GS-X, na presença de conjugados de GSH, nas membranas das células estudadas. Passamos, então, a descrever as etapas realizadas.

3.4 Síntese de DNP-SG

A fim de ser utilizado como substrato e padrão cromatográfico, o S-conjugado de glutathione, DNP-SG, foi preparado enzimaticamente através da incubação de GSH (3 mM), CDNB (4 mM) e 1 UI de glutathione S-transferase (GST, E.C. 2.5.1.18, Sigma) em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5 por 1,5 h a 37°C. O procedimento descrito é uma modificação dos protocolos experimentais descritos em KONDO *et alii* (1982) e AWASTHI *et alii* (1981). O conjugado sintético, preparado como descrito, foi purificado em colunas Sep-Pak C18 (Waters) e por TLC, sendo usado como substrato nos ensaios realizados para a determinação da atividade da bomba GS-X em membranas.

3.5 Separação do DNP-SG por cromatografia em colunas Sep-Pak C18

Depois de preparado, conforme descrito na seção anterior, o conjugado DNP-SG foi separado da mistura de reação por cromatografia em colunas Sep-Pak C18 (Waters). Para tanto, com a finalidade de protonar os resíduos de GSH do conjugado recém-sintetizado, tornando-o mais hidrofóbico, o pH da solução de DNP-SG foi acertado para 3,5 com HCl concentrado. As colunas Sep-Pak C18 foram preparadas, uma para cada 30 μ mol de DNP-SG esperados, sendo lavadas (à gravidade) com 5 ml de etanol absoluto e 5 ml de água Milli-Q, tendo sido equilibradas, a seguir, com tampão fosfato pH 3,5 (5 ml). Em seguida, a solução contendo DNP-SG a ser separado foi aplicada nas colunas.

Para a eluição, as colunas foram lavadas com cerca de 50 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 3,5 e o eluato monitorado espectrofotometricamente (de 200 a 400 nm). Foram, então, aplicados 5 ml de etanol a 10 % (v/v) em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 9,0 para recolher o conjugado. Os primeiros 2 ml de volume morto, não contendo DNP-SG, foram descartados enquanto que a partir da primeira gota amarelada-forte (DNP-SG recém-sintetizado) recolheram-se os primeiros 5 ml. Após este procedimento, iniciou-se a eluição de parte do excesso de CDNB da coluna, descartando-o para reutilização do cartucho Sep-Pak C18.

3.6 Separação do DNP-SG por TLC

Alíquotas de DNP-SG sintetizadas enzimaticamente, bem como dos sobrenadantes das células incubadas com CDNB, foram secas em SpeedVac, dissolvidas em etanol 50% (v/v) em tampão fosfato de potássio e estocadas a -20°C até serem utilizadas. Depois, as amostras foram aplicadas em placas de sílica-gel para cromatografia de camada delgada, TLC (Merck, 10 x 10 cm, 250 μm de espessura, com indicador F254 de fluorescência) previamente ativadas pelo calor (30 min a 120°C) e, então, cromatografadas à temperatura ambiente em cuba equilibrada com o sistema n-propanol/água (7:3, v/v, grau HPLC) como fase móvel, essencialmente como descrito previamente (AWASTHI *et alii*, 1981). Depois das corridas, as manchas foram visualizadas por exposição à radiação UV. DNP-SG e CDNB podem ser facilmente discriminados pelas diferenças de propriedades absorptivas e fluorescentes em comprimentos de onda na faixa do UV: DNP-SG mostra uma fluorescência violeta opaca contra um fundo lilás a 280 nm enquanto o CDNB exibe uma mancha escura fraca neste comprimento de onda. Por outro lado, o CDNB absorve fortemente a 254 nm (exibindo, portanto, manchas negras) sendo facilmente identificado contra o fundo verde-amarelado brilhante das placas nesse comprimento de onda onde o DNP-SG absorve muito pouco e é fracamente fluorescente. A separação fornece os seguintes valores de R_f : CDNB= $0,78 \pm 0,03$, DNP-SG= $0,64 \pm 0,04$ e GSH= $0,39 \pm 0,05$. Na seqüência, as manchas contendo as substâncias de interesse foram cuidadosamente raspadas das placas e eluídas em etanol 50% para posterior análise por HPLC. As amostras de DNP-SG [^3H] contidas nas manchas raspadas das placas de TLC foram, por sua vez, eluídas e lavadas duas

vezes com volumes de 4 ml de etanol 50%, secas em SpeedVac e reconstituídas em 1 ml de etanol 50%. Com base no coeficiente de absorção do DNP-SG ($\epsilon_{340\text{ nm}} = 9,6\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), foi calculada a concentração do conjugado. Análises por HPLC efetuadas em experimentos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa confirmaram a identidade do conjugado obtido.

3.7 Medida da atividade da ATPase de GSH (Bomba GS-X) em membranas de linfócitos e células tumorais

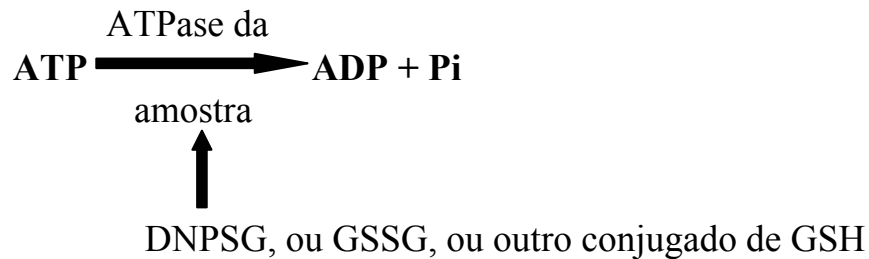
Este experimento foi realizado para avaliarmos a capacidade de exportação de S-conjugados de GSH, pelas membranas das células estudadas, independentemente de outros fatores intracelulares como concentração de GSH e atividade GST. Neste ensaio foi acoplada a hidrólise de ATP, estimulada por conjugados de GSH (DNPSG sintetizado, como descrito acima, e GSSG), ao consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), em presença de fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH).

Para tanto, as suspensões celulares (linfócitos de linfonodos mesentéricos e células tumorais) foram centrifugadas a 1000 x g por 5 min. Desprezado o sobrenadante, os precipitados foram quebrados e colocados em homogeneizador manual de vidro (tipo Potter-Elvehjem), adicionada solução de fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF, inibidor de serino-proteases do tipo quimotripsina, tripsina e trombina, bem como de cisteíno-proteases como papaína) 100 μM , e leupeptina (inibidor de serino-proteases e tiol-proteases, como tripsina, plasmina, proteinase K, calicreína, papaína, trombina e catepsina A e B) a 2 $\mu\text{g/ml}$, e homogeneizado.

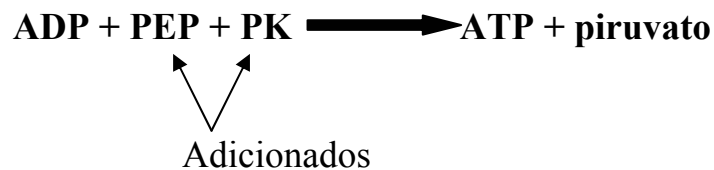
Seguiu centrifugação a 1000 x g por 10 min para a separação de restos celulares, núcleos e células inteiras. O sobrenadante foi reservado e o precipitado ressuspense em presença de PMSF 100 μ M e leupeptina a 2 μ g/ml. Em seguida, foi adicionado tampão de extração, e somados os sobrenadantes que, a seguir, foram centrifugados a 15.000 x g por 20 min para a remoção da fração mitocondrial. Descartado o precipitado, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 15.000 x g por 10 min para a exclusão eventuais mitocôndrias remanescentes. Novamente, foi descartado o precipitado e o sobrenadante centrifugado a 100.000 x g por 1 hora para a obtenção da fração microsomal (de membranas). Descartado o sobrenadante (fração solúvel), o precipitado (microsomas) foi homogeneizado em homogeneizador manual de vidro (tipo Potter-Elvehjem) em 5 volumes de tampão de extração, e centrifugado a 15.000 x g por 20 min para uma nova lavagem das mitocôndrias contaminantes. Descartado o precipitado, o sobrenadante foi centrifugado novamente a 100.000 x g por 1 hora para a purificação da fração microsomal. Depois, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado novamente homogeneizado em homogeneizador manual de vidro (tipo Potter-Elvehjem) em tampão Tris-Lubrol (veja a seguir, por favor) e centrifugado a 100.000 x g por 1 hora. Esta etapa foi realizada porque a bomba GS-X pode ser solubilizada em lubrol PX (um detergente composto de condensados de óxido de etileno com álcoois graxos normalmente utilizado para a remoção e solubilização de certas proteínas de membrana, como adenilil ciclase). Após a centrifugação, o precipitado do Tris-lubrol foi descartado e o sobrenadante (contendo a atividade enzimática a ser testada) foi reservado para ser ensaiado.

O princípio da técnica desenvolvida em nosso laboratório baseia-se na monitoração espectrofotométrica da hidrólise de ATP acoplada ao consumo de NADH na presença de amostras de membranas, e do sistema fosfoenolpiruvato, piruvato quinase e lactato desidrogenase.

1ª REAÇÃO:



2ª REAÇÃO



3ª REAÇÃO



Descrevendo: O ADP formado é fosforilado pela piruvato quinase (PK, Boehringer) na presença de fosfoenolpiruvato (PEP, Sigma), que também é adicionado à cubeta de reação, gerando piruvato que, por sua vez, é reduzido por NADH (Sigma, adicionado à cubeta), na presença da enzima lactato desidrogenase (LDH, Sigma). Como o consumo de NADH é estequiométrico com a hidrólise de ATP pela ATPase/Bomba GS-X, esta técnica permitiu-nos avaliar a atividade de bomba, monitorando o consumo de NADH a 340 nm na presença de GS-conjugados.

Seqüência de adição de substâncias à cubeta, durante o experimento:

- 700 µl de tampão de ensaio (Tris-lubrol-sacarose)
- 50 µl NADH (final 0,2 mM)
- 50 µl MgCl₂ (final 10 mM)
- 50 µl PEP (final 2 mM)
- 50 µl ATP (final 1 mM)
- 50 µl enzimas (PK e LDH, 1 U/ml de cada)
- 10 µl amostra + 20 µl tampão de ensaio
- aguardar até a solução chegar em 37°C e adicionar
- 10 µl DNPSG (100 µM final)

3.8 Determinação do conteúdo intracelular de GSH e GSSG

Para a determinação dos conteúdos intracelulares de glutathiona (GSH) e dissulfeto de glutathiona (glutathiona "oxidada", GSSG), as células (cerca de 10⁷) foram lavadas duas vezes em PBS (4°C) e imediatamente rompidas em 200 µl de ácido metafosfórico (MPA) a 5% (m/v) com homogeneização por micropipeta para análise cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditio-bis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) e GSSG redutase (GSRd) de ANDERSON (1985) (veja no Esquema-2, por favor). Quando se utilizou de tecidos na íntegra (linfonodos e tecido tumoral), as amostras foram coletadas cirurgicamente, limpas e imediatamente homogeneizadas em MPA 5% à razão de 5-10 ml/g de tecido, conforme o caso. A rápida homogeneização das células ou tecidos em meio ácido é um passo de extrema importância para a inativação das tiol-transferases e γ -glutamiltanspeptidases responsáveis pela transformação da GSH em outros derivados peptídicos, levando a

subestimativas das concentrações reais do tripeptídeo. Além disso, a acidificação previne a auto-oxidação da GSH que ocorre rapidamente em pH superior a 7,0 (ANDERSON, 1985; AKERBOOM & SIES, 1981). Por outro lado, apesar de a auto-oxidação da GSH em GSSG em meio ácido ocorrer numa taxa mínima (0,1 a 0,2% por hora), pelo fato de as concentrações intracelulares de GSSG serem naturalmente muito baixas (menos de 1% da concentração de GSH), o processamento das amostras para dosagem de GSSG deve ser efetuado o mais rapidamente possível, a fim de evitar-se resultados falsamente superiores aos valores reais (AKERBOOM & SIES, 1981). Em preparações celulares frescas (linfócitos e linhagens tumorais), as células foram submetidas a incubação com tampão de hemólise para a retirada de eritrócitos contaminantes, como descrito anteriormente (item 3.4), uma vez que eritrócitos, por apresentarem significativa atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo da GSH, podem interferir nos resultados, mesmo quando em baixa densidade celular.

A primeira parte do ensaio consistiu na determinação do conteúdo de glutathiona "total" (GSH mais GSSG) medido em equivalentes de GSH (= GSH + 2 GSSG) pelo método da reciclagem com DTNB que leva à oxidação estequiométrica da GSH em GSSG com formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e posterior regeneração da GSH pela redução altamente específica com GSSG redutase (GSRd, EC 1.6.4.2) na presença de NADPH. A taxa de formação de TNB, proporcional à soma inicial de GSH e GSSG, foi, então, monitorada a 412 nm ($\epsilon_{\text{TNB}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Alternativamente, poderia ter sido monitorada a taxa de consumo de NADPH a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ou fluorimetricamente

(excitação a 366 nm/emissão de 400-3000 nm). O método empregado é bastante sensível, específico e reprodutível. Contudo, como a velocidade da reação depende não somente da concentração inicial de GSH + GSSG, mas, também, da atividade da GSRd, fatores que interfiram na atividade enzimática, levarão invariavelmente a falsos resultados. Por isso, além de ter sido utilizada sempre uma curva de calibração (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 nmols/10 µl) com padrão de GSH precisamente preparado a cada ensaio, foram efetuadas leituras de amostras com adição de padrão, sendo os resultados obtidos idênticos aos observados para as amostras separadamente. A incubação foi iniciada pela adição de 10 µl de amostra (em MPA 5%) a microplacas com 96 poços de 0,3 cm de caminho óptico. A seguir, foram pipetados 70 µl de DTNB (final 21,49 mM) em tampão fosfato de sódio 143 mM (pH 7,5), 10 µl de NADPH em solução de bicarbonato de sódio a 0,5% para estabilizar o nucleotídeo (concentração final 0,17 mM) perfazendo um volume final de 100 µl.). Em seguida, foram adicionados 10 µl de GSRd (atividade final na cubeta de 0,5 U/ml) para dar início à reação. A cinética de formação de TNB foi registrada a 37°C a 415 nm (por uma adaptação da técnica inicial a 412 nm) em leitora de microplacas Bio-Rad (USA) termostaticada e agitação com aquisição direta e processamento cinético automático (Software Microplate Manager 4.0 for Windows da Bio-Rad, USA), até a estabilização das leituras (5 min

Antes da determinação do conteúdo de GSSG, alíquotas de 50 µl das mesmas amostras ensaiadas para GSH "total" foram retiradas para conjugação da GSH presente com N-etil-maleimida (NEM, Fluka) segundo metodologia descrita em AKERBOOM & SIES (1981). Foram adicionados, então, 17 µl de NEM 200 mM (concentração final 50 mM)

diretamente às amostras dissolvidas em MPA 5%. Depois, a mistura foi neutralizada, cuidadosamente sob agitação, até pH 5,5 pela adição de 10 µl de KOH 2 M em tampão de ácido piperazina_N, N'-bis-(etanossulfônico) (=PIPES, Boehringer, pKa = 6,8 a 25°C, faixa de trabalho de 6,1 a 7,5) 0,3 M. A inclusão de PIPES, ou outros agentes tamponantes como MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico), previne alcalinização local, durante a neutralização, o que levaria a auto-oxidação da GSH, favorecida em pHs maiores que 7,0. O excesso de NEM, que, em concentrações tão baixas quanto 10 µM inibe o processo de dosagem da GSSG por reciclagem em até 30% foi efetuado por extração com 500 µl de acetato de etila 3 vezes, tendo o excesso de solvente sido evaporado em concentrador SpeedVac (Uniequipo, Alemanha) e por passagem em corrente de nitrogênio. As amostras, depois de evaporadas até a secagem completa, foram redissolvidas em 50 µl de MPA 5%. Posteriormente, 10 µl de amostra foram ensaiados pelo método da reciclagem, como descrito para a GSH. Padrões de GSSG contendo de 0,5 a 8,0 nmols/10 µl em MPA a 5% foram processadas e ensaiadas simultaneamente com as amostras de interesse. A diferença entre os valores obtidos para glutathiona "total" e GSSG forneceu os valores dos conteúdos de GSH procurados (abaixo).

DOSAGEM DE GSSG E CÁLCULO DA [GSH]

- 1) Conjugação da GSH presente com **NEM**.
- 2) Extração do excesso de **NEM**.
- 3) Remoção do solvente.
- 4) Dosagem de GSSG pelo método da reciclagem com GSSG redutase e **DTNB**.

$$[GSH] = [\text{glutathiona "TOTAL"}] - 2 [GSSG]$$

3.9 Determinação da atividade total das glutatona *S*-transferases

A atividade total das glutatona *S*-transferases (GST, EC 2.5.1.18) foi determinada (37°C) diretamente no sobrenadante de 16000 x *g* das células (~ 10⁷) lavadas duas vezes com PBS e sonicadas a 4°C em 1 ml de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,5 (com fluoreto de fenilmetilsulfonila, PMSF 50 µM, como inibidor de proteases) pelo método descrito em MANNERVIK & GLUTHEMBERG (1981). O princípio é o da conjugação de moléculas de GSH com o 1-Cl-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com formação do 2,4-dinitrofenil *S*-glutatona (DNP-SG) pela ação das GST presentes nos sobrenadantes ensaiados. Basicamente, cerca de 100 a 400 µl de amostra foram misturados sob agitação com 50 µl de GSH 20 mM num volume final de 950 µl (completado com tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,5, quando a conjugação não-enzimática é mínima) e a reação iniciada pela adição 50 µl de CDNB perfazendo 1 ml total na cubeta. A produção de DNP-SG foi monitorada a 340 nm por cerca de 10 min a 30°C e a atividade total das GST calculada com base no $\epsilon_{\text{DNP-SG}} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e expressa em nmols/min (=1 mU, nestas condições) por mg de proteína (BRADFORD, 1974).

3.10 Medida da atividade da γ -glutamylcisteína sintetase

Para a determinação da atividade da γ -glutamylcisteína sintetase (γ -GCS, E.C. 6.3.2.2), linfócitos de linfonodos mesentéricos e células do tumor de Walker 256 (subcutâneo) foram obtidos e preparados conforme descrito acima. A seguir, as células foram sonicadas em tampão de extração

consistindo de: Tris-HCl 100 mM pH 8,0, KCl 150 mM, MgCl₂ 20 mM, EDTA 2 mM e β-mercaptoetanol 5 mM na presença de dos inibidores de protease PMSF, 100 μM, e leupeptina a 2 μg/ml. O homogenato foi, então, centrifugado a 16000 x g por 30 min e a atividade enzimática foi avaliada conforme descrito por SEELIG & MEISTER (1985). Trata-se de uma técnica onde a hidrólise de ATP, na presença da γ-GCS, é acoplada ao consumo de NADH e determinada espectrofotometricamente (340 nm), na presença de fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH) e α-aminobutirato (10 mM) e glutamato de sódio (10 mM) como substratos.

3.11 Expressão de proteínas de choque térmico (HSP) e análises por SDS-PAGE

Conforme apresentado na seção de Resultados, a expressão de proteínas de choque térmico (HSP), pode ser tomada como um indicativo de estresse celular induzido pelo acúmulo de CP-PGs nas células. Particularmente, em células humanas e de ratos, a HSPs de maior expressão são o polipeptídeo de 72 kDa (induzida por situações de estresse celular) e o de 74 kDa (forma constitutiva) coletivamente chamadas de HSP da família de 70 kDa (HSP70). No intuito de avaliarmos a correlação entre o acúmulo de CP-PGs em linfócitos de animais portadores do TW256 e a expressão de HSP70, quantidades iguais de proteína foram, então, carregadas em gel de poliacrilamida (10%) para eletroforese. Depois das corridas, foi analisada a indução de expressão de HSP por *Western blotting* com identificação das HSP70 através do uso de anticorpos monoclonais de camundongo contra HSP70 humana que dá reação cruzada contra a proteína de rato, permitindo, assim, sua identificação (veja a seguir, por

favor). Para a separação destas proteínas, foi aplicado o método de eletroforese em poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, Laemmli *et alii*, 1970), utilizando-se como amostras suspensões contendo linfócitos normais, linfócitos de animais portadores do TW256, suspensões do tecido tumoral obtido do TW256 implantado subcutaneamente no flanco direito de ratos, células obtidas do lavado peritoneal de ratos portadores do TW256 inoculado intraperitonealmente, e células das linhagens de cânceres humanos HEp-2 e HeLa. As células foram, inicialmente, precipitadas em tubos para microcentrífuga (Eppendorf), agitadas (vórtex), lisadas em solução de SDS a 0,1% e passadas em seringa de insulina (1 ml) para serem homogêneas e a quantidade total de proteína pudesse ser medida (BRADFORD, 1974). A seguir as preparações foram diluídas em tampão de amostra (veja a seguir) e quantidades iguais de proteína foram carregadas e submetidas a corridas eletroforéticas em cuba Mini-Protean II (Bio-Rad) conforme descrito na próxima seção.

A seqüência dos experimentos compreende a obtenção das amostras da mesma maneira que par o experimento utilizado na medição de conjugação e exportação de DNP-SG..

3.12 SDS-PAGE e *Western blotting*

Para cada amostra preparada, quantidades iguais de proteína (cerca de 30 µg, determinada pelo método Bradford, abaixo) foram separadas durante 4 h (a 15 mA/gel) à temperatura ambiente (25°C) por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foi utilizado sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean II (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) e tampão de corrida

constituído de Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3, usando-se 1 cm de gel de empilhamento (entrada) a 4% (m/v) e gel de separação a 10% (m/v) em termos de monômero de acrilamida, para corridas em géis de 10 cm em tampão de amostra redutor constituído de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v) e β -mercaptoetanol a 5%, conforme descrito em SANTORO *et alii* (1989). Como marcador de peso molecular foi utilizada a mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (BIO-RAD Kaleidoscope Polypeptide Standards) com as seguintes proteínas: miosina (200 kDa), fosforilase *b* (92,5 kDa), BSA (69 kDa), ovalbumina (46 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e lisosima (14 kDa). Depois das corridas, os géis foram destacados das placas de suporte, tendo os géis de separação sido removidos.

Após as corridas os géis foram corados e fixados sob agitação contínua com solução de Azul Comassie Brilhante 0,1% (m/v), metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) durante 20 min e submetidos a descoloração com agitação por cerca de 2 h em solução de ácido acético glacial a 5% (v/v) até que fossem evidenciados os padrões de peso molecular (ainda fortemente corados contra o fundo já parcialmente descorado dos géis). Os géis foram, então, transferidos para filtro de papel Whatman 3MM, envoltos em película de PVC e secos a 80°C por 2 h em secador de géis BIO-RAD Gel Dryer a vácuo programável. Depois de secos, os géis corados foram submetidos a densitometria no equipamento (Amersham Pharmacia Biotech) Video Documentation System de aquisição digital e processamento de imagens.

As amostras contidas em géis destinados a processamento por *Western blotting*, como descrito em ELIA & SANTORO (1994), foram transferidas diretamente para membranas de nitrocelulose (Millipore) em sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 70 V até um total de 150 V x h. Após a transferência, as bandas, contendo proteínas, foram evidenciadas pela coloração com Vermelho Ponceau, sal de sódio (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução de TCA a 3%. Após a verificação, as membranas foram descoradas em tampão TEN (Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM). Antes do "immunoblotting", os filtros de nitrocelulose foram hibridizados com BSA a 1% (m/v) em água a fim de recobrirem-se as porções da membrana onde não houve transferência de proteínas, promovendo-se, então, bloqueio de ligação inespecífica dos anticorpos ao filtro. Para o *Western blotting* das HSP70, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 18 h sob agitação enérgica em tampão TEN-Tween 20 a 0,05% (v/v) na presença de anticorpo monoclonal BRM-22 de ascite de camundongo (hibridoma BRM-22) contra HSP70 humana (Amersham), diluído a 1:1000, que reage especificamente com o polipeptídeo de 73 kDa, HSP73 (ou HSC70, proteína constitutiva) e com o de 72 kDa, HSP72 (ou HSP70 induzível). Depois disso, os filtros foram lavados três vezes sob agitação por 10 min com 5 ml de TEN-Tween e incubados por 1 h com 5 ml de solução contendo o segundo anticorpo, IgG RPN 1177 (de cabra, contra imunoglobulinas de camundongo, biotinilado, Amersham) em TEN-Tween sob agitação. Depois disso, repetiu-se a lavagem dos filtros, como descrito acima e os filtros foram submetidos a reação com o segundo-anticorpo de coelho contra IgG de camundongo conjugado a peroxidase de rabanete (Sigma) sob agitação por 1 h adicional. Após nova lavagem, as membranas foram submetidas a reação com o

revelador 4-Cl-Naftol (BIO-RAD) em tampão contendo NaCl 83 mM, Tris-HCl 17 mM, pH 7,4 e H₂O₂ a 0,15%. Imediatamente após o aparecimento das manchas de interesse com boa resolução, os filtros foram retirados do revelador, lavados com água a fim de evitar-se superexposição e submetidos a secagem em estufa por 30 min a 37°C. Conforme a necessidade em cada caso, as manchas foram registradas digitalmente (VDS, Amersham Pharmacia Biotech) e as imagens analisadas para os cálculos posteriores.

Anticorpos monoclonais QCRL-1, gentilmente cedidos pela Profa. Susan S. P. Cole, Queen's University, Canada, (HIPFNER *et alii*, 1994,1996).

3.13 Cálculo das concentrações de proteínas nas amostras analisadas

Na determinação das concentrações de proteínas nas amostras, quando demandado em cada caso, foi utilizado o método de BRADFORD (1976). Foi utilizado como padrão de referência, soluções de albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma). A razão para a escolha de um ou outro método foi a sensibilidade e interferência de certos componentes das preparações a serem analisadas. O método de BRADFORD, baseado na ligação do Azul Comassie Brilhante G-250 0,01% (m/v) em meio de ácido fosfórico 8,5% (m/v)-etanol 4,7% (m/v) a proteínas das amostras, com formação de complexo que absorve intensamente a 595 nm (BIO-RAD Protein Assay kit, Bio-Rad Laboratories, GmbH, DR), apresenta, na faixa de algumas dezenas de microgramas de proteína ensaiada, sensibilidade um pouco maior que o método de LOWRY *et alii*. Este, por sua vez, baseia-se na ligação do reagente de Folin-Ciocalteau a hidroxilas fenólicas presentes

em amostras protéicas hidrolisadas previamente em meio alcalino, com formação de complexo cromogênico que pode ser monitorado espectrofotometricamente a 750 nm.

3.14 Preparação de tampões e outros procedimentos

3.14.1 Protocolo para hemólise de eritrócitos

A remoção de eritrócitos contaminantes é fundamental para o estudo do metabolismo da GSH, pois evita os erros que poderiam advir de sua presença nas preparações, já que eritrócitos apresentam alta atividade da bomba GS-X (MEISTER, 1983)

Para tanto, os precipitados celulares obtidos após a centrifugação inicial a 1000 x g por 5 min, são ressuspensos em 10 ml de solução de hemólise (queira ver adiante, por favor). Em seguida, as suspensões são diluídas a 1:5 com 40 ml de PBS.

3.14.2 Tripsinização de culturas de células em monocamadas

A tripsinização é realizada quando as células atingem a confluência celular. As mesmas são então lavadas com solução salina tamponada sem cálcio e magnésio (CMF). Sobre a cultura adiciona-se, aproximadamente, 2 ml da solução de tripsina, aguarda-se 1 min para que ocorra o deslocamento da camada celular do substrato plástico.

A inativação da tripsina é feita adicionando-se 10 ml de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (SFB). a contagem do número de células é feito em câmara de Neubauer. Após a contagem é feito o plaqueamento de 5×10^5 cél./garrafa de cultivo de 25 cm^2 ou $2,5 \times 10^5$

cel./poço de 9,62 cm². Aguarda-se 1 h, retira-se o meio de cultura e as células são lavadas com solução salina tamponada (BSS), para retirada dos restos celulares e células não aderidas. Acrescenta-se o meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Após 24 h, quando as células encontram-se em período de pré-confluência, o meio de cultura é suplementado com 5% de SFB.

3.15 Reagentes e soluções utilizadas

3.15.1 Tampão fosfato (PBS)

- 136,8 mM de NaCl
- 2,7 mM de KCl
- 0,9 mM de KH₂ PO₄
- 6,4 mM de Na₂HPO₄ ou Na₂HPO₄. 7 H₂O
- em água milliQ.

O pH da solução foi acertado em 7,4 a 25°C.

3.15.2 Solução de Hank's – (Hanks'Balanced salt solution - HBSS)

- 137 mM de NaCl
- 3 mM de KCl
- 0,3 mM de Na₂HPO₄. 7 H₂O
- 0,5 mM de KH₂ PO₄
- 1,3 mM de CaCl₂. 2 H₂O
- 0,8 mM de MgCl₂. 6 H₂O
- 0,8 mM de Na₂SO₄

Esta solução pode ser preparada à 10x e conservada em geladeira, adicionando-se, no uso, glicose (5,55 mM) ou HEPES (25 mM), acertando o pH para 7,4.

3.15.3 Solução de Hemólise

(GADD & HANSBROUGH, 1990)

- 17 mM de TRIS
- 144 mM de NH₄Cl
- pH 7,4 (acertado com HCl)

3.15.4 Tampão de homogeneização para a extração da bomba GS-X (Fosfato 10mM – pH 7,0)

- K₂HPO₄ anidro (peso molecular 174,2) 1,742 g/l
- KH₂PO₄ anidro (peso molecular 136,1) 1,361 g/l
- β-mercaptoetanol 1,4 mM (100 µl/l)
- EDTA 2 mM (744 mg/l)

3.15.5 Tampão de extração (Tris-Triton – pH 7,4)

- Tris-HCl 10 mM (121,1 mg/100 ml)
- EDTA 2 mM (74,4 mg/100 ml)
- β-mercaptoetanol 1,4 mM (10 µl/100 ml de solução final)
- Triton X-100 0,1% (v/v) = 100 µl/100 ml finais

3.15.8 Outros materiais e reagentes analíticos

Os demais reagentes analíticos utilizados foram de procedência da Sigma Chemical Co. (P.O BOX 14508 St. Louis, MI, 63178 USA), Merck (Darmstadt, DR), Boehringer (Mannheim, DR), GIBCO (Scotland, UK), Ecibra Ind. e Com. de Produtos Químicos Ltda. (São Paulo) e Reagen (Rio de Janeiro) conforme indicado em cada caso. Todas as enzimas utilizadas foram obtidas junto à Sigma ou Boehringer. Filtros de nitrocelulose utilizados nas culturas foram obtidos da Millipore (USA).

3.16 Análise estatística

Conforme necessário em cada experimento, as diferenças entre os grupos controle e os tratados foram comparadas com o teste "t" de Student bicaudado para dados não-pareados tendo sido considerado para nível de significância mínimo um risco α com $p < 0,05$ para erros do tipo I.

RESULTADOS

4.1 Performance do sistema imunológico em presença de tumor

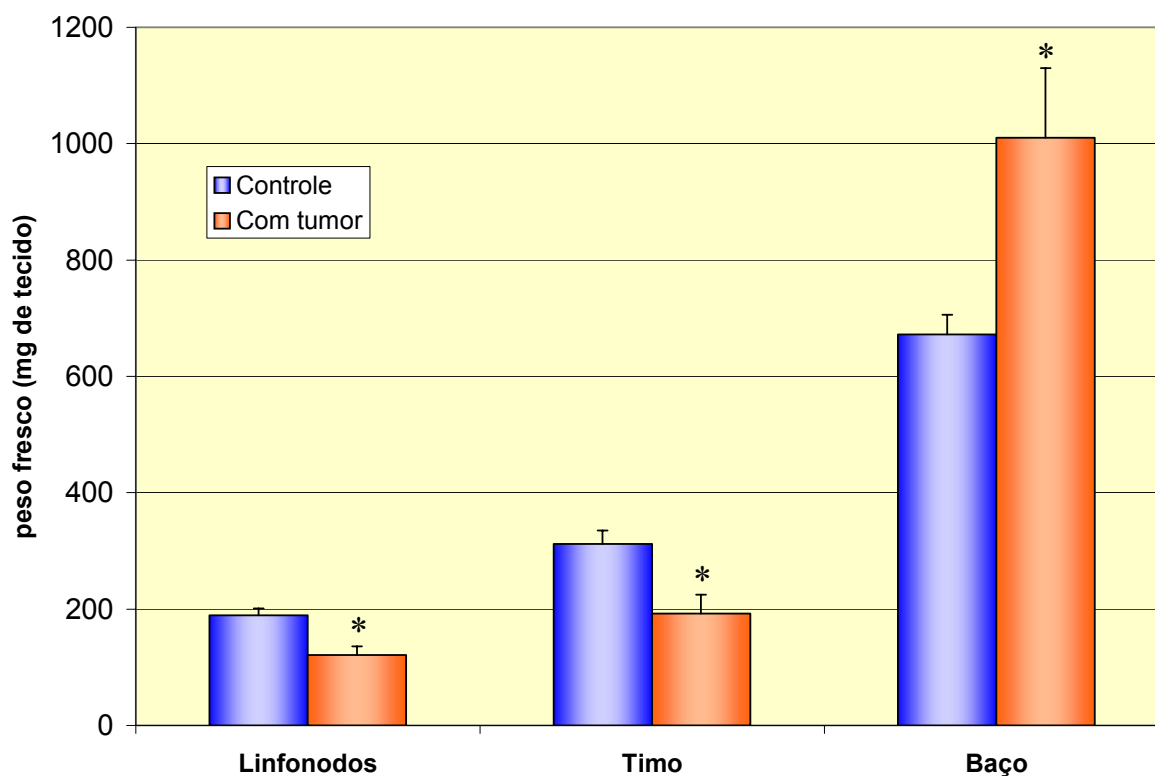


Fig. 11 Pesos frescos de tecidos imunológicos de animais controle e portadores do tumor de Walker 256 14 dias após o implante. Os animais foram inoculados com suspensão contendo cerca de 10^7 células em 1 ml em solução salina e sacrificados 14 dias depois quando os tecidos em questão foram removidos cirurgicamente e pesados. * $p < 0,05$ para comparação entre os grupos controle e os portadores do TW256 pelo teste *t* de Student.

Conforme apresentado na Introdução, animais portadores do TW265 mostram uma conspícua imunossupressão que tende a levá-los à morte. A **Fig. 11** ilustra a perda de massa tecidual de linfonodos mesentéricos (34%) e timo (38%) de ratos portadores do TW256. Observe-

se que os tecidos de alguns dos órgãos responsáveis pela resposta imunológica podem perder mais de 30% de seu peso quando na presença do crescimento tumoral, enquanto que o baço apresenta aumento de 33% devido à infiltração de células tumorais (metástases), confirmando achados anteriores resultantes de estudos histológicos (SANTOS *et alii*, 1992).

A perda de massa dos tecidos imunológicos responsáveis, principalmente, pela produção de linfócitos, indispensáveis para que o organismo possa fazer frente ao desenvolvimento do tumor, constitui-se uma das causas da severa imunossupressão observada em pacientes terminais de câncer. Uma possível explicação para esta perda, é a presença de CP-PGs, as quais são antiproliferativas, e como já comentado anteriormente, podem ser produzidas em altas quantidades nas situações de câncer, sendo captadas por todas as células do indivíduo infectado. Estudos de nosso grupo de pesquisa (HOMEM de BITTENCOURT & CURI, 1992) mostraram, no entanto, que apenas células dos tecidos imunológicos de animais portadores de câncer exibiam acúmulo de CP-PGs, enquanto que o próprio tecido tumoral não.

A caracterização da ATPase de membrana MRP/bomba GS-X, que exporta GS-conjugados para o espaço extracelular (ISHIKAWA, 1992) levou à hipótese de que uma deficiente atividade da mesma nas membranas de linfócitos pudesse ser responsável por este acúmulo. Esta possibilidade foi recentemente testada utilizando-se vários modelos de linhagens de cânceres humanos bem como uma série de outros modelos celulares de mamíferos. Estes achados sugeriram a existência de uma atividade extremamente reduzida da MRP/bomba GS-X em linfócitos de rato e em outras linhagens da série branca do sangue, sendo que, pelo menos *in vitro*,

existe uma correlação direta entre a expressão desta atividade e a resistência aos efeitos citotóxicos e citostáticos de CP-PGs (HOMEM de BITTENCOURT *et alii*, 1998a; 1998b). Esta proposição, apesar de ter sido confirmada *in vitro*, ainda não havia sido testada *in vivo*. Por esta razão, passamos a investigar a possibilidade de que a superprodução de CP-PGs no plasma de ratos portadores do tumor de Walker 256 (TW256) pudesse estar associada a uma desproporcionalmente baixa atividade da ATPase MRP/bomba GS-X nos linfócitos destes animais em comparação com a atividade detectada no próprio tecido tumoral.

4.2 Cinética de exportação de DNP-SG pela técnica de incubação de células intactas com CDNB

Para avaliarmos a capacidade de exportação de GS-conjugados, células obtidas do TW256 foram preparadas conforme descrito na seção de Métodos e incubadas na presença do corante CDNB por até 60 min. Os resultados destes experimentos estão apresentados na **Fig. 12** e mostram uma atividade média de 51,1 pmol/min/10⁶ células. Com a finalidade de compararmos os resultados obtidos para o TW256 com aqueles observados para outras linhagens tumorais, foram realizadas incubações com as células tumorais humanas HEp-2 e HeLa, cujos parâmetros cinéticos já haviam sido previamente estudados com relação à capacidade de exportação de GS-conjugados através da MRP/bomba GS-X (Homem de Bittencourt *et alii*, 1998a). Os dados obtidos para estas linhagens tumorais estão apresentados nas **Fig. 13** e **14** sendo que a capacidade média de exportação de DNP-SG encontrada foi de 506,5 pmol/min/10⁶ células para a linhagem HEp-2- e de 116,3 pmol/min/10⁶ células para a linhagem HeLa. Um quadro

comparativo para esta atividade cinética entre as células estudadas está mostrado na **Fig. 15**.

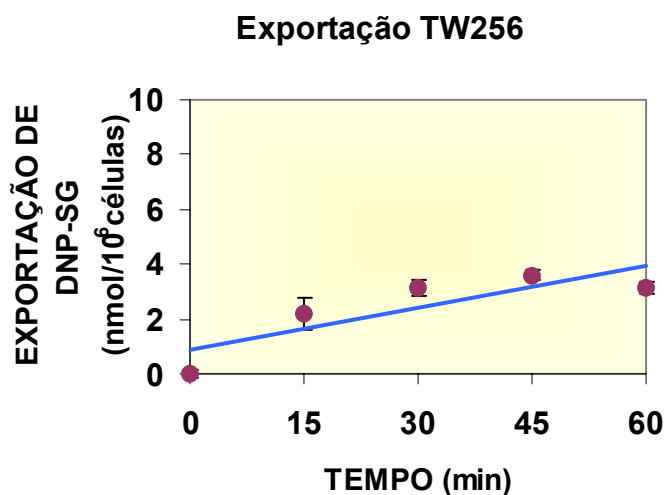


Fig. 12 Atividade de exportação do conjugado DNP-SG em células do TW256 em suspensão. Após 21 dias do implante subcutâneo de células do TW256, os tumores foram removidos cirurgicamente e as células dispersas e incubadas a 37°C por um período de 15 min na presença de CDNB 50 μ M, conforme descrito na seção de Métodos. Os dados estão expressos em termos da média \pm E.P.M. dos resultados obtidos para as células incubadas na presença de CDNB subtraídos dos valores-controle medidos com as células incubadas apenas na presença do veículo (PBS). * $p < 0,05$ para comparação entre o tempo zero o tempo 15 min pelo teste *t* de Student.

EXPORTAÇÃO DNP-SG HEP-2

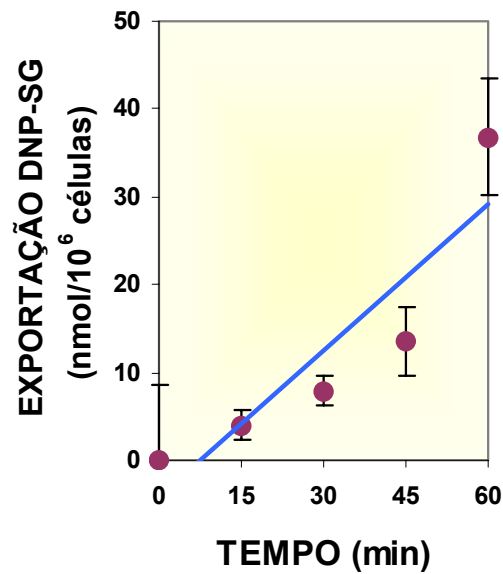


Fig.13 Atividade de exportação do conjugado DNP-SG em células tumorais humanas da linhagem HEP-2. Células do carcinoma de laringe humano da linhagem HEP-2 foram cultivadas à subconfluência em meio RPMI1640 após o que foram lavadas com PBS e submetidas a incubação na presença de CDNB ou do veículo (PBS) como descrito da seção de Métodos. Os dados estão expressos em termos da média \pm E.P.M. dos resultados obtidos para as células incubadas na presença de CDNB subtraídos dos valores-controle medidos com as células incubadas apenas na presença do veículo. * $p < 0,05$ para comparação entre o tempo zero o tempo 15 min pelo teste t de Student.

EXPORTAÇÃO DNP-SG HeLa

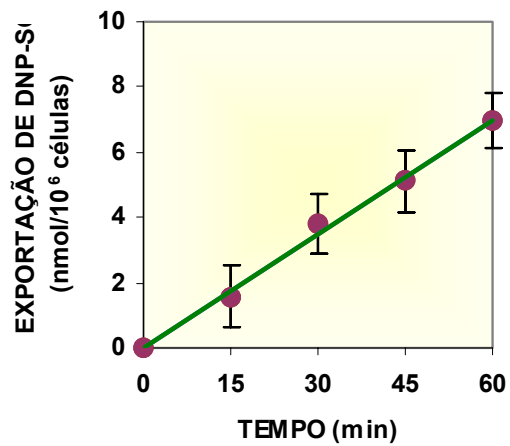


Fig.14 Atividade de exportação do conjugado DNP-SG em células tumorais humanas da linhagem HeLa. Células do carcinoma de cérvix uterino human HeLa foram cultivadas à subconfluência em meio RPMI1640 após o que foram lavadas com PBS e submetidas a incubação na presença de CDNB ou do veículo (PBS) como descrito da seção de Métodos. Os dados estão expressos em termos da média \pm E.P.M. dos resultados obtidos para as células incubadas na presença de CDNB subtraídos dos valores-controle medidos com as células incubadas apenas na presença do veículo. * $p < 0,05$ para comparação entre o tempo zero o tempo 15 min pelo teste t de Student.

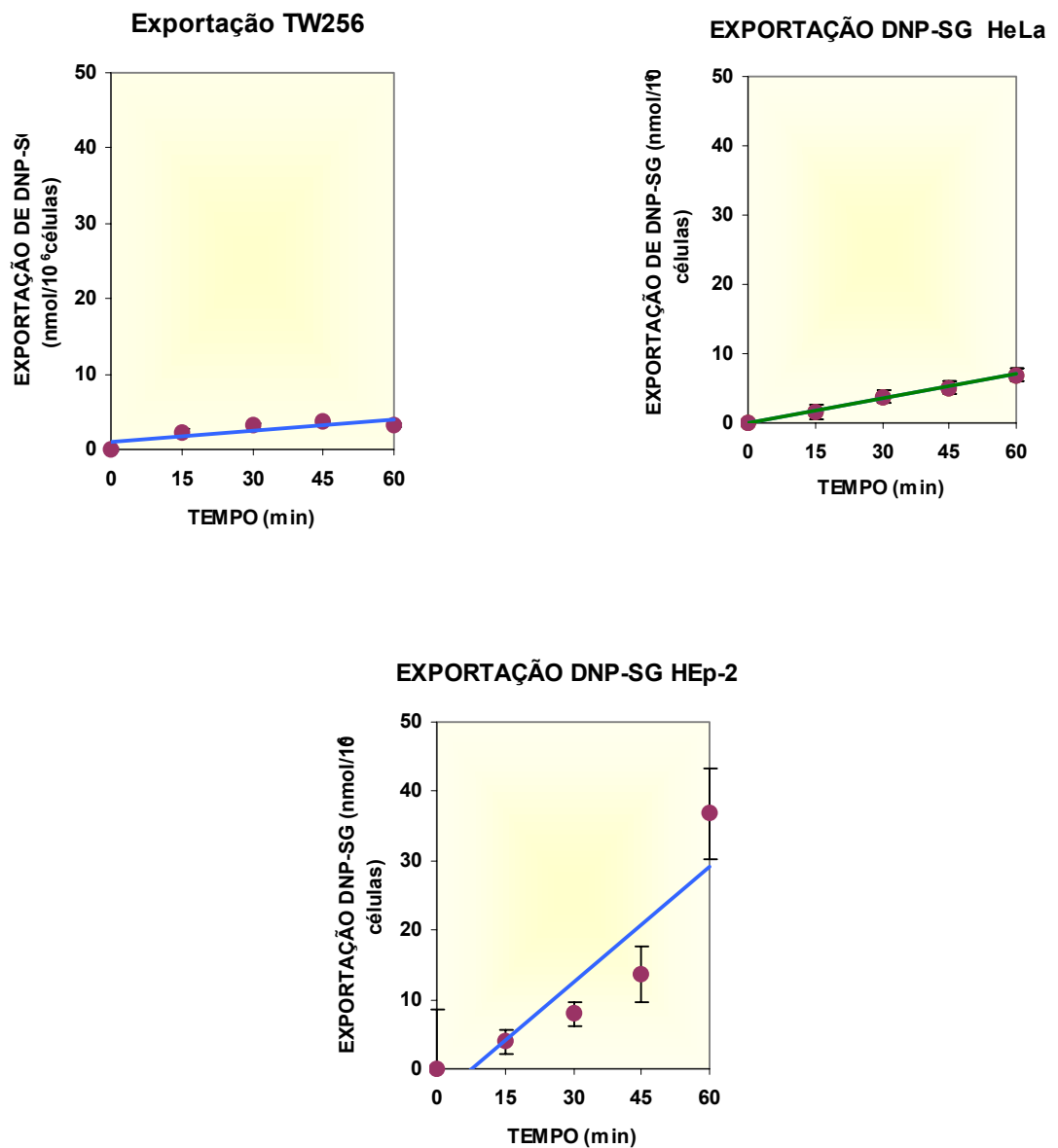


Fig.15 Análise comparativa da atividade de exportação do conjugado DNP-SG em células tumorais humanas HeLa e HEp, e TW256. Os dados foram obtidos a partir das Figuras 12-14 e estão apresentados na mesma escala para efeito de comparação.

Utilizando-se da mesma técnica, foram estudados, também, linfócitos de ratos normais e portadores do TW256. Entretanto, a capacidade de exportação de DNP-SG por linfócitos incubados na presença de CNDB foi indetectável através da metodologia utilizada.

4.3 Atividade da Bomba GS-X em membranas celulares

A técnica de incubação utilizada para a avaliação da capacidade de exportação de DNP-SG faz uso de células intactas que devem inicialmente captar o corante e conjugá-lo intracelularmente com moléculas de GSH, produzindo o GS-conjugado que pode ser exportado pela MRP/bomba GS-X. Portanto, a ausência de atividade de exportação de DNP-SG em linfócitos, segundo esta técnica, pode ter como significado tanto uma baixa concentração de GSH, uma reduzida atividade das GSH S-transferases (GST) responsáveis pela conjugação, como ainda uma baixa atividade de exportação de GS-conjugados pela ATPase MRP/bomba GS-X. Para esclarecer este ponto, foram realizados experimentos onde a atividade da MRP/bomba GS-X foi medida na membrana plasmática das mesmas células sem, portanto, a interferência de outros fatores intracelulares.

Como pode ser observado da análise da **Fig. 16**, a atividade ATPase dependente da exportação de GS-conjugados através da MRP/bomba GS-X confirma os achados anteriormente obtidos com as células íntegras (em pmol/min/mg de proteína de membrana): HEp-2, $705,2 \pm 9,3$; HeLa, $164,2 \pm 31,5$; TW256, $64,3 \pm 7,0$. Todavia, através desta técnica, foi finalmente possível detectar a atividade de exportação de GS-conjugados em linfócitos de ratos normais ($3,1 \pm 1,7$ pmol/min/mg de

proteína de membrana; **Fig. 16**). Mesmo assim, a atividade em linfócitos de animais portadores do TW256 permaneceu indetectável.

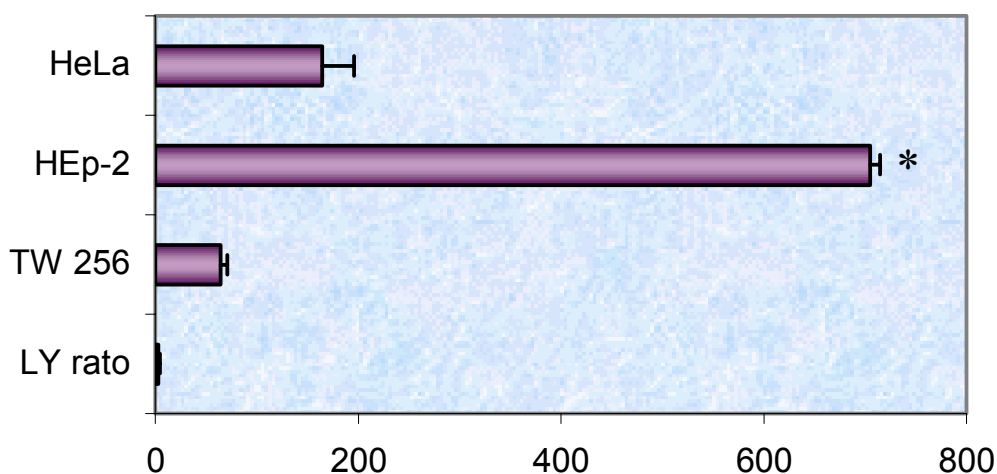


Fig.16 Atividade da bomba GS-X em membranas isoladas de linfócitos de rato, células do TW256 em rato e das linhagens humanas HEp-2 e HeLa. Membranas obtidas de linfócitos de rato, de células do TW256 (subcutâneo) em rato e das linhagens permanentes de cânceres humanos HEp-2 e HeLa foram preparadas e solubilizadas em tampão Tris-Lubrol conforme descrito na seção de métodos. Cerca de 10 μ g de membrana solubilizada em Tris-Lubrol foram ensaiadas espectrofotometricamente pelo métodos de desaparecimento de NADH acoplado à hidrólise de ATP na presença de DNP-SG, como descrito anteriormente. Os dados estão expressos em **pmol/min/mg de proteína de membrana** em termos da média \pm E.P.M. de, pelo menos, três preparações experimentais.

4.4 Metabolismo da GSH

Como anteriormente citado, os experimentos realizados para identificar a atividade da MRP/bomba GS-X, demonstraram que a mesma está presente, é detectável nos modelos estudados (HEp-2, HeLa, LyN e células do TW256), e que se apresenta consideravelmente reduzida nos referidos linfócitos ($3,1 \pm 1,7$ pmol/min/mg de proteína de membrana). A exportação dos GS-conjugados, depende de fatores interdependentes: a atividade da MRP/bomba GS-X nas membranas das células estudadas, da capacidade de formação destes conjugados dentro das células, bem como a presença da GSH. Considerou-se, assim, de fundamental importância avaliar as questões referentes ao metabolismo da glutathiona (GSH) nos mesmos modelos experimentais, de maneira a afastar a possibilidade de que alterações neste metabolismo pudessem ser a causa desta baixa atividade da MRP/bomba GS-X. Para tanto, avaliou-se o conteúdo "total" de GSH (GSH mais GSSG) medido em equivalentes de GSH (= GSH + 2 GSSG)], presente em linfonodos de animais normais (controle), linfonodos de animais portadores do TW 256, e células do próprio tumor.

Os resultados apresentados na **Fig. 17** mostram que linfócitos obtidos de linfonodos de ratos normais apresentam um conteúdo intracelular "total" de GSH de $2,338 \pm 0,024$ nmol/mg de tecido enquanto que linfócitos de animais portadores do TW256 mostram apenas $0,821 \pm 0,055$ nmol/mg de tecido. No próprio tecido tumoral, as quantidades encontradas foram de $2,181 \pm 0,027$ nmol/mg de tecido. Estes achados, baseados no conteúdo de GSH "total" encontrado nos diferentes tecidos, sugerem que a conjugação de substâncias eletrofílicas com GSH seja possível nos três tipos celulares estudados, embora, linfócitos de

linfonodos mesentéricos de animais portadores do TW256 apresentem um conteúdo de GSH total cerca de 65% ($p < 0,05$) menor que o observado nos tecidos de animais normais e aproximadamente 61% ($p < 0,05$) menor que no próprio tecido tumoral. Entretanto, apesar de ser amplamente utilizado como índice de capacidade antioxidante celular porque reflete as concentrações de GSH, a medida de GSH “total” incorpora também os conteúdos de GSSG. Por isso, foram realizados experimentos para a determinação das quantidades de GSH e GSSG em separado.

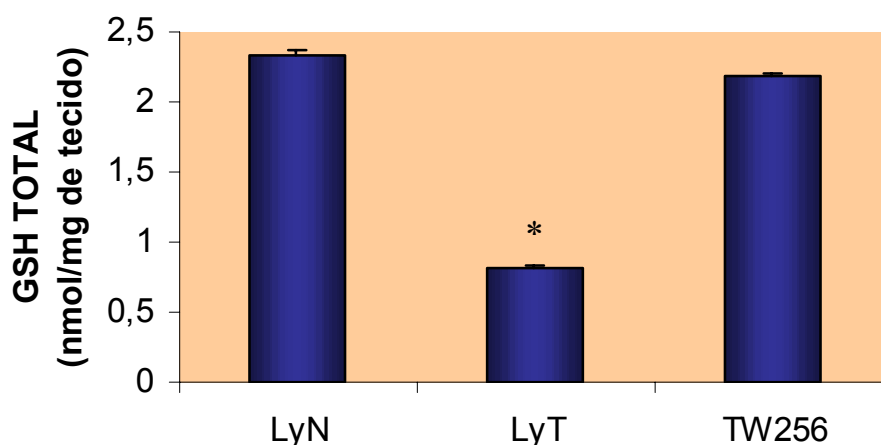


Fig. 17 Conteúdo de GSH TOTAL no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor. Os tecidos foram removidos cirurgicamente de ratos normais e portadores do TW256 21 dias após o implante de cerca de 10^6 células subcutaneamente e homogeneizados em ácido metafosfórico 5% (m/v) conforme descrito na seção de Métodos. Os dados estão apresentados em nmols de GSH por mg de linfonodos de animais normais (LyN), linfonodos de animais com o TW256 (LyT) e do próprio tumor (TW256) em termos da média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ para comparação da quantidade observada nos linfócitos em relação ao tecido tumoral pelo teste *t* de Student.

Os resultados destes experimentos estão apresentados na **Fig. 18** (GSH) e **Fig. 19** (GSSG), a seguir. Note-se que, neste caso, a quantidade de GSH medida nos linfonodos de animais normais foi de $2,050 \pm 0,038$ nmol/mg de tecido enquanto que nos linfonodos de animais portadores do TW256, o conteúdo medido foi de apenas $0,539 \pm 0,032$ nmol/mg de tecido

(uma queda de aproximadamente 74% - $p < 0,05$ - que reflete o resultado anteriormente obtido com a medida de GSH “total”). No tecido tumoral, a quantidade de GSH ($1,929 \pm 0,027$ nmol/mg de tecido) não difere muito daquela encontrada nos linfócitos de animais normais. Entretanto, um dado chama muita atenção: a quantidade de GSSG nos mesmos tecidos (**Fig. 19**). Observe-se que as quantidades de GSSG detectadas nos três tecidos estudados não variaram significativamente de um tipo tissular para o outro (em nmol/mg de tecido, linfonodos de animais normais: $0,144 \pm 0,029$; linfonodos de animais com tumor: $0,141 \pm 0,028$ e tecido tumoral do TW256: $0,126 \pm 0,005$).

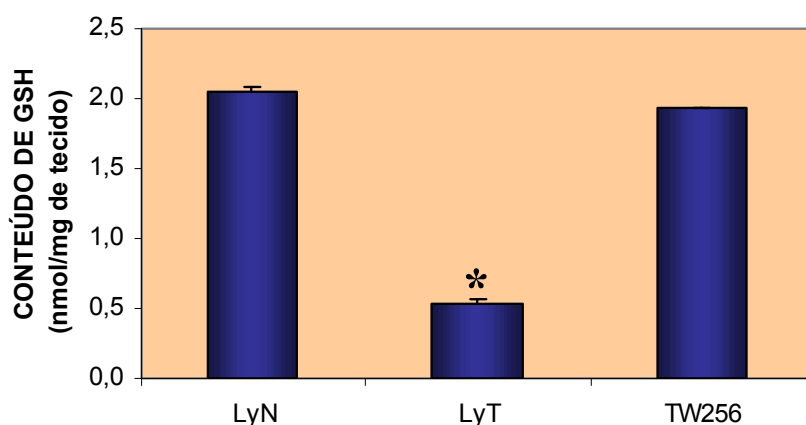


Fig. 18 Conteúdo de GSH no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor. Os tecidos foram removidos cirurgicamente de ratos normais e portadores do TW256 21 dias após o implante de cerca de 10^7 células subcutaneamente e homogeneizados em ácido metafosfórico 5% (m/v) conforme descrito na seção de Métodos. Os dados estão apresentados em nmols de GSH por mg de linfonodos de animais normais (LyN), linfonodos de animais com o TW256 (LyT) e do próprio tumor (TW256) em termos da média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ para comparação da quantidade observada nos linfócitos em relação ao tecido tumoral pelo teste *t* de Student.

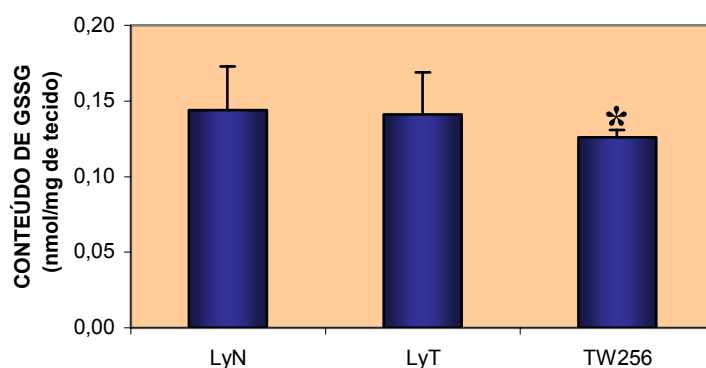


Fig. 19 Conteúdo de GSSG no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor. Os tecidos foram removidos cirurgicamente de ratos normais e portadores do TW256 21 dias após o implante de cerca de 10^7 células subcutaneamente e homogeneizados em ácido metafosfórico 5% (m/v) conforme descrito na seção de Métodos. Os dados estão apresentados em nmols de GSH por mg de linfonodos de animais normais (LyN), linfonodos de animais com o TW256 (LyT) e do próprio tumor (TW256) em termos da média \pm E.P.M.

Estes achados têm grande impacto para a explicação dos fenômenos que vimos estudando. Primeiramente, porque mostram que, apesar de apresentarem menor conteúdo intracelular de GSH, linfócitos de animais com tumor teriam quantidade suficiente de GSH para que a mesma pudesse ser conjugada com eletrófilos. Isto descarta a possibilidade de que a baixa atividade de exportação de GS-conjugados observada em linfócitos (**Fig. 16**) pudesse ser devida a uma reduzida quantidade de GSH intracelular, mesmo porque o próprio tecido tumoral apresenta menor conteúdo intracelular de GSH ($1,929 \pm 0,027$ nmol/mg de tecido, **Fig. 18**) mas é capaz de exportar grandes quantidades de GS-conjugados (**Fig. 12** e **Fig. 16**). Em segundo lugar, porque destes resultados podemos inferir que a relação $[GSSG]/[GSH]$, considerada como índice do estado redox intracelular (AKERBOOM & SIES, 1989), mostra que linfócitos de animais normais (relação $[GSSG]/[GSH] = 0,070 \pm 0,014$, veja **Fig. 20**, por favor) apresentam um estado redox muito semelhante ao observado no

próprio tecido tumoral do TW256 (relação $[GSSG]/[GSH] = 0,065 \pm 0,003$, **Fig. 20**), ao passo que nos linfócitos de animais portadores do TW256 a relação $[GSSG]/[GSH]$ observada foi de $0,262 \pm 0,054$ (**Fig. 20**). Isto sugere que linfócitos de animais portadores do TW256 estejam sob **estresse oxidativo**, já que a relação $[GSSG]/[GSH]$ calculada para este tecido foi 3,4 vezes maior que a encontrada em linfonodos normais e 4,0 vezes aquela observada no próprio tecido tumoral.

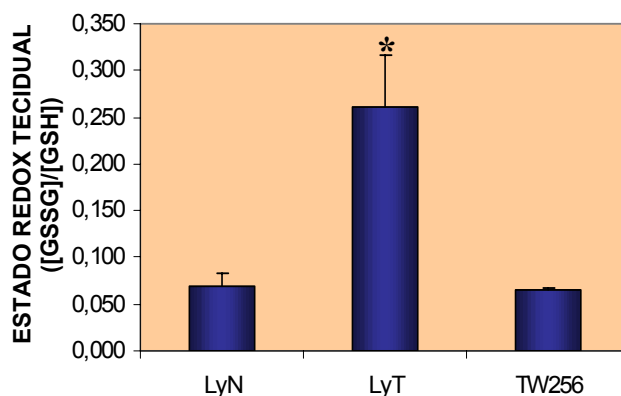


Fig. 20 Estado redox tecidual ($[GSSG]/[GSH]$) no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor. Os tecidos foram removidos cirurgicamente de ratos normais e portadores do TW256 21 dias após o implante de cerca de 10^7 células subcutaneamente e homogeneizados em ácido metafosfórico 5% (m/v) conforme descrito na seção de Métodos. Os dados estão apresentados como a relação entre o conteúdo (em nmols por mg de tecido) de GSSG e o de GSH em linfonodos de animais normais (LyN), linfonodos de animais com o TW256 (LyT) e do próprio tumor (TW256) em termos da média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ para comparação da quantidade observada nos linfócitos em relação ao tecido tumoral pelo teste *t* de Student.

A terceira conclusão importante é que este **estresse oxidativo** observado nos linfócitos de animais portadores do TW256 não deve estar ocorrendo por um processo de oxidação da GSH, uma vez que as quantidades de GSSG são praticamente iguais nos três tecidos estudados (**Fig. 20**). Contudo, como se observou uma queda de 74% na quantidade de GSH em linfócitos de animais portadores do TW256 em relação aos

linfócitos de animais normais ($p < 0,05$, Fig. 18), conclui-se que a redução nos conteúdos intracelulares de GSH de linfócitos dos animais portadores de tumor não possa ter sido devida a reações oxidativas (mediadas por radicais livres, espécies ativas do oxigênio ou por intermédio da GSH peroxidase selênio-dependente). Por outro lado, uma queda nas concentrações intracelulares de GSH, sem que se observe oxidação e transformação da mesma em GSSG, só é possível em duas situações: **1)** por uma redução na síntese de GSH ou **2)** por um processo de remoção da GSH através de conjugação com eletrófilos mediada pelas GSH *S*-transferases (GST). Para esclarecer este ponto, foram realizados experimentos onde foram avaliadas as atividades das enzimas-chave de ambos os processos, a saber, γ -glutamilcisteína sintetase (passo limitante da síntese de GSH) e GST (necessária para a conjugação de moléculas de GSH a substâncias eletrofílicas). Estes resultados estão descritos a seguir nas próximas seções.

4.5 Atividade total das glutathiona *S*-transferases (GST)

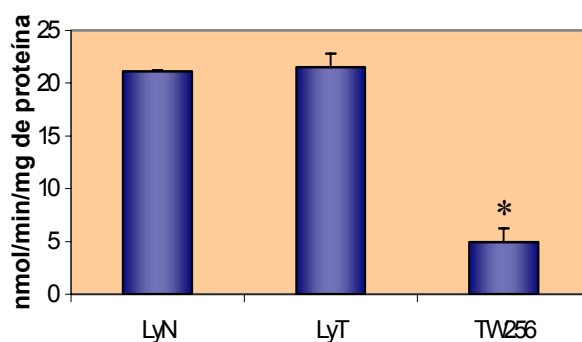


Fig. 21 Atividade total das glutathiona *S*-transferases no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor. Os tecidos foram removidos cirurgicamente de ratos normais e portadores do TW256 21 dias após o implante subcutâneo de cerca de 10^7 células e homogeneizados em tampão de extração conforme descrito na seção de Métodos. Os dados estão apresentados em nmols de DNP-SG formado por minuto por mg de proteína dos extratos de linfonodos de animais normais (LyN), linfonodos de animais com o TW256 (LyT) e do próprio tumor (TW256) em termos da média \pm E.P.M. * $p < 0,001$ para comparação da atividade observada nos linfócitos em relação ao tecido tumoral pelo teste *t* de Student.

Para avaliarmos a capacidade de conjugação de eletrófilos, como o CDNB utilizado nos ensaios ou CP-PGs, foi medida a atividade total das GSH *S*-transferases (GST), que são um passo limitante para a capacidade de conjugação celular. Da análise da **Fig. 21**, observa-se que a atividade das GST (em nmol/min/mg de proteína ensaiada), tanto nos linfócitos normais ($21,10 \pm 0,12$) quanto dos linfócitos de animais com tumor ($21,48 \pm 1,30$), é até mais alta (cerca de 4,3 vezes, $p < 0,05$) do que no próprio tumor ($4,94 \pm 1,28$). Esses achados sugerem que linfócitos de linfonodos mesentéricos de animais normais ou dos portadores do TW256 apresentam capacidade de conjugação de eletrófilos com moléculas de GSH o que descarta a possibilidade de que a baixa capacidade de exportação de DNP-SG observada anteriormente (**Fig. 16**) pudesse ser devida a uma inabilidade destas células de conjugar moléculas de GSH a substâncias eletrofílicas. Conclui-se, assim, que as baixas atividades de exportação de GS-conjugados apresentadas por linfócitos em comparação com aquelas observadas em células tumorais só possam ser realmente devidas a uma ineficiente capacidade de exportação de conjugados de GSH através de seu transportador específico MRP/bomba GS-X.

4.6 γ -glutamilcisteína sintetase

Os dados apresentados nas **Fig. 17-20**, sugeriam um estresse oxidativo (\uparrow [GSSG]/[GSH]) apresentado por linfócitos de linfonodos de animais portadores do TW256 que não poderia ser devido a um processo de oxidação de moléculas de GSH, haja vista ao fato de que as concentrações de GSSG nestas células foram idênticas às encontradas nos tecidos normais

ou mesmo no tecido do TW256. Conforme abordado anteriormente, então, restavam duas possibilidades: ou os linfócitos de animais com TW256 não conseguem produzir quantidades suficientes de GSH por alguma razão desconhecida, ou então, algum processo de conjugação com substâncias eletrofílicas pode estar ocorrendo de maneira a depletar os estoques de GSH sem, no entanto, oxidá-la. Para testarmos estas possibilidades, avaliamos a atividade da γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS), enzima-chave na regulação da produção de GSH.

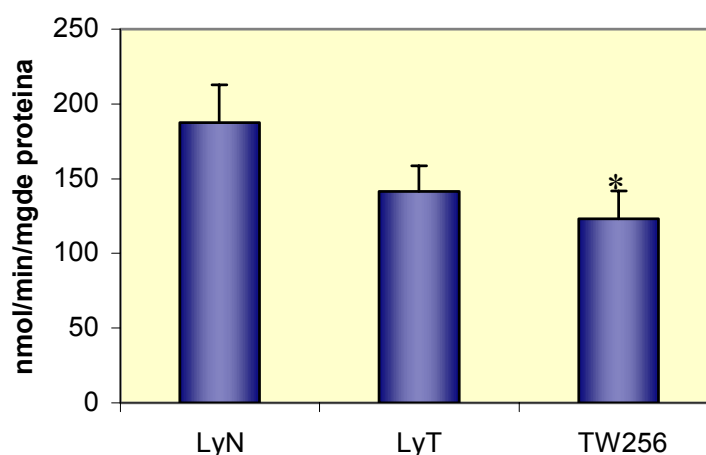


Fig. 22 Atividade da γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS) no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor. Os tecidos foram removidos cirurgicamente de ratos normais e portadores do TW256 21 dias após o implante subcutâneo de cerca de 10^7 células e homogeneizados em tampão de extração conforme descrito na seção de Métodos. Os dados estão apresentados em nmols de γ -glutamil-aminobutirato formado por minuto por mg de proteína dos extratos de linfonodos de animais normais (LyN), linfonodos de animais com o TW256 (LyT) e do próprio tumor (TW256) em termos da média \pm E.P.M.

Conforme mostrado na **Fig. 22**, a atividade da γ -GCS (em nmol/min/mg de proteína) em linfócitos de animais com tumor ($141,5 \pm 17,0$) é apenas 24,5% mais baixa que a detectada em linfócitos de animais normais ($187,5 \pm 25,3$) e, além disso, os dados não diferem

estatisticamente. Já no tecido tumoral, a atividade encontrada foi de $123,2 \pm 18,5$ nmol/min/mg de proteína. Estes resultados sugerem que a queda de 74% na quantidade de GSH livre em linfócitos de animais portadores do TW256 em relação aos animais normais (**Fig. 18**) não possa ser devida a uma deficiente capacidade de produção de GSH. Conclui-se, portanto, que a queda das concentrações intracelulares de GSH observada em linfócitos de animais portadores do TW256 só possa ser devida a algum processo de conjugação com substância eletrofílica não oxidante, já que a capacidade de conjugação (estimada pela atividade total das GST) nestes tecidos mostrou-se suficientemente alta. Portanto, não se pode descartar a possibilidade de que o acúmulo de CP-PGs (eletrofílicas e não oxidantes) possa realmente estar ocorrendo no meio intracelular de linfócitos levando à depleção dos estoques intracelulares de GSH e conseqüente estresse oxidativo.

4.7 Expressão de HSP70 e sua relação com o estresse oxidativo em linfócitos de animais portadores do TW256

Classicamente, já foi demonstrado que o acúmulo de CP-PGs é capaz de induzir a expressão de proteínas de choque térmico da família das HSP70 (SANTORO *et alii*, 1989 ETC. ; SANTORO, 2000). Assim, espera-se que em tecidos onde ocorre acúmulo de CP-PGs deva ser observada uma queda nas concentrações intracelulares de GSH (sem concomitante aumento de seu produto de oxidação, GSSG) acompanhado de aumento na expressão da HSP70. Tendo em visto que os resultados apresentados até

então sugerem que linfócitos de animais portadores do TW256 apresentem capacidade de conjugação de GSH com eletrófilos, como as CP-PGs (**Fig. 21**), mas mostram uma queda de cerca de 74% nas concentrações intracelulares de GSH, passamos a investigar a possibilidade de que pudesse estar ocorrendo aumento na expressão da HSP70 (forma induzível, 72 kDa), o que seria mais um indicativo da possibilidade de acúmulo de CP-PGs em linfócitos de animais com câncer levando-os à imunossupressão. Para tanto, linfócitos de animais normais (LN), de animais portadores do TW256 (LT), células do TW256 e duas linhagens de cânceres humanos (HEp-2 e HeLa) foram homogeneizadas em tampão contendo SDS e submetidos a eletroforese (SD-PAGE) para posterior análise por “immunoblot” conforme descrito na seção de Métodos.

Os resultados destes experimentos mostraram uma significativa expressão de HSP70 em linfócitos de animais portadores do TW256 (**Fig. 23**) que é cerca de 27% maior que a detectada em linfócitos de animais normais ou no próprio tecido tumoral. Note-se ainda que a expressão da forma induzível da HSP70 (72 kDa) é também bastante alta nas células da linhagem HeLa e HEp-2 que, sabidamente, apresentam estresse oxidativo e alta relação [GSSG]/[GSH] (HOMEM DE BITTENCOURT *et alii*, 1998a,b,c) e, além disso, a indução de HSP70 pode ser provocada por vários outros agentes causadores de estresse celular, não apenas CP-PGs. Em conjunto, estes achados, embora não demonstrem que a reduzida expressão da MRP/bomba GS-X em linfócitos de animais com tumor possa estar ocasionando acúmulo de CP-PGs e conseqüente imunossupressão, não descartam a possibilidade de que linfócitos de animais portadores do TW256 estejam acumulando CP-PGs.

Isto justificaria a queda nas concentrações intracelulares de GSH sem paralelo aumento nas concentrações de GSSG e o aumento na expressão da forma induzível da HSP70. Adicionalmente, observa-se uma correlação inversa entre a expressão da HSP70 e a atividade da MRP/bomba GS-X detectada em linfócitos (**Fig. 24**).

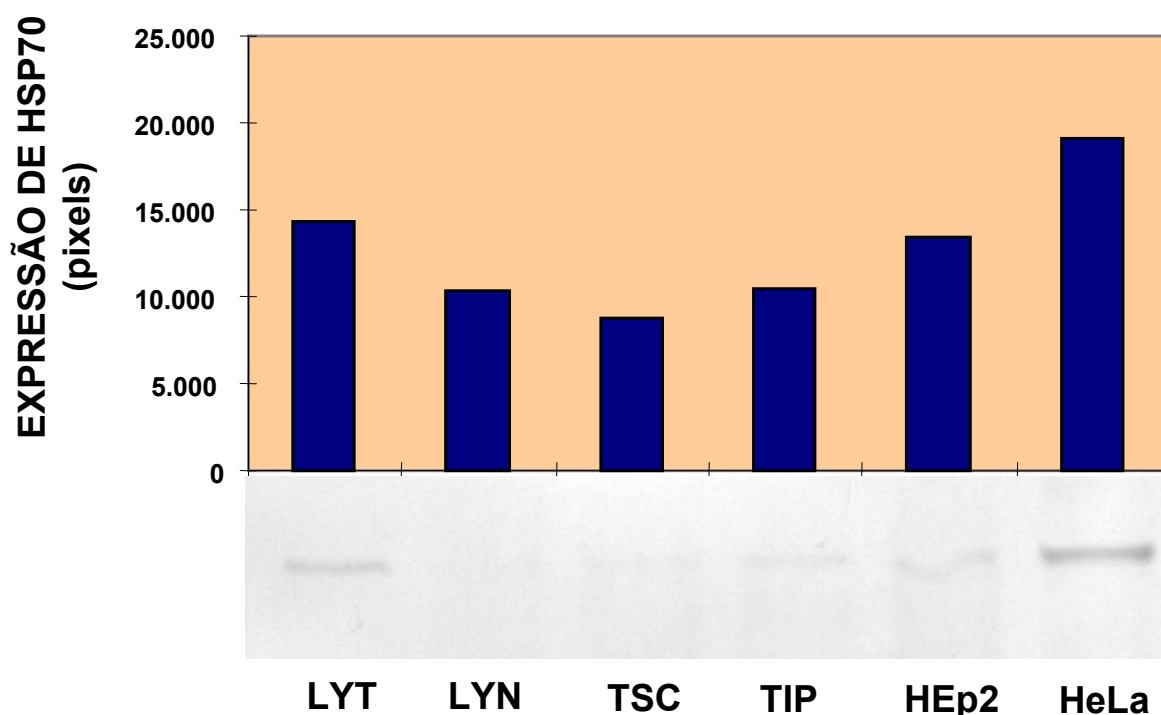


Fig. 23 Análise da expressão de HSP70 por SDS-PAGE e imunoblot em linfócitos e células tumorais. Depois de preparadas as amostras, quantidades iguais de proteína foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) e posterior transferência para membranas de nitrocelulose para tratamento com anticorpos monoclonais contra a HSP72. Os dados apresentados são de um experimento representativo. Outras preparações experimentais revelaram resultados idênticos. Para maiores detalhes, queira ver a seção de Métodos, por favor. **LyT**, linfócitos de animais portadores do TW256; **LyN**, linfócitos de animais normais; **Tsc**, células do TW256 subcutâneo; **Tip**, células do TW256 obtidas de preparações intraperitoneais; **HEp2** células do carcinoma de laringe humano da linhagem HEp-2; **HeLa**, células do carcinoma de cérvix uterino humano da linhagem HeLa.

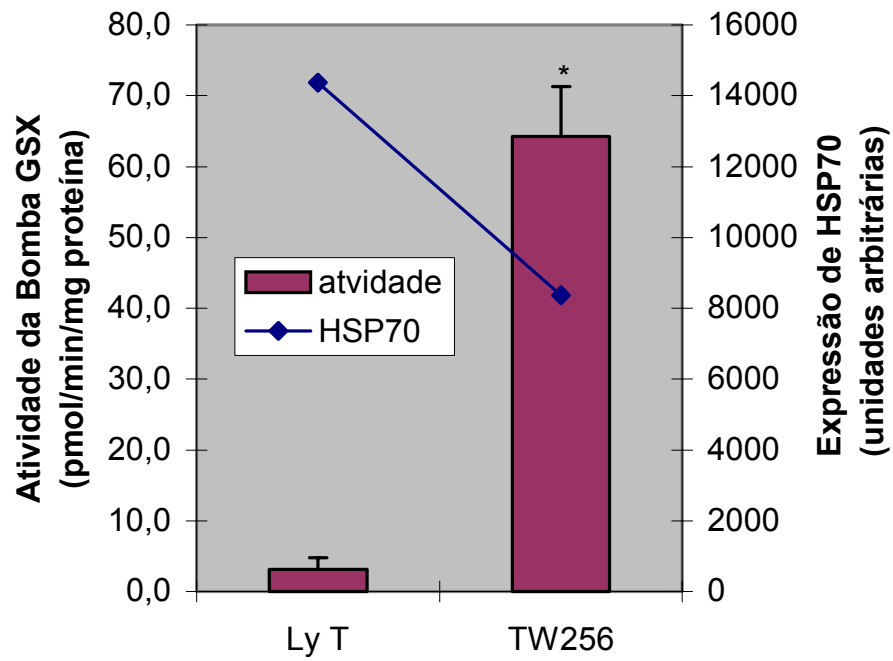


Fig. 24. Análise comparativa entre a atividade da bomba GS-X e a expressão da HSP no tecido tumoral e nos linfócitos de animais portadores do TW256. * $p < 0,01$ para comparação da atividade observada nos linfócitos em relação ao tecido tumoral pelo teste *t* de Student.

DISCUSSÃO

Como já comentado anteriormente, apesar de que, em presença de câncer, as PGE_2 e PGD_2 possam ser antiproliferativas e imunossupressoras *per se*, elas são enzimaticamente transformadas, respectivamente, em prostaglandinas das séries PGA_2 e J_2 (PGJ_2 , Δ^{12} - PGJ_2 e 15-desóxi- $\Delta^{12,14}$ - PGJ_2) pela exposição ao plasma, soro, ou soluções contendo albumina. As PGs do tipo A e J, caracterizadas pela presença de um grupo carbonila α,β -insaturado no anel ciclopentano, são coletivamente chamadas prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs), e, realmente, parecem ser as causadoras de imunossupressão no câncer mediada por PGs (veja **Fig. 1 e 4** para estrutura e interconversão das PGs). Na verdade, quase todo o efeito antiproliferativo, previamente observado para PGE_2 e PGD_2 pode ser atribuído às suas derivadas CP-PGs. As CP-PGs, que por muitos anos, pensou-se, serem artefatos de preparações de amostras teciduais, são realmente, formadas *in vivo* e podem ser detectadas nos fluidos e tecidos corpóreos, tanto de humanos (HIRATA *et alii*, 1988) quanto de animais experimentais (HOMEM de BITTENCOURT & CURI, 1992). Adicionalmente, as CP-PGs das séries J são ligantes fisiológicos para o fator de transcrição PPAR- γ (receptor ativado por proliferadores de peroxissomos do tipo γ) (FORMAN *et alii*, 1995; KLIEWER *et alii*, 1995). PPAR- γ é um fator de transcrição importante relacionado à diferenciação e proliferação celular. A descoberta de sua ativação metabólica por CP-PGs

esclareceu seu papel primordial na homeostase da glicose e de lípidos, bem como sua potencial relevância nas desordens metabólicas, tais como diabetes e obesidade. No entanto, a possibilidade de bloqueio da divisão celular, através da ativação do PPAR- γ por ligantes naturais (como as CP-PGs) ou farmacológicos, que poderiam funcionar como agentes de diferenciação celular no câncer, ainda não foi devidamente explorada.

As CP-PGs inibem a proliferação celular em uma variedade de modelos experimentais de tumor, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SANTORO & AMICI, 1989). Elas são ativamente e seletivamente transportadas para dentro das células, por um carreador de membrana (veja Fig. 5, por favor), e, então, transferidas para o núcleo, onde se ligam a proteínas nucleares e atuam especificamente na interface G₁/S do ciclo celular (OHNO *et alii*, 1988; SANTORO & AMICI, 1989). Dependendo das concentrações empregadas, as CP-PGs podem ser extremamente tóxicas por bloquear a síntese de proteínas e causar dano aos filamentos de actina do citoesqueleto (IKAI & FUKUSHIMA, 1990) e por inibirem a expressão das DNA-polimerases β e γ (ONO *et alii*, 1987). O efeito antiproliferativo das CP-PGs depende de sua captação pelas células, um fenômeno que pode ser tão efetivo que torna difícil a detecção destas substâncias, *in vivo*, poucos minutos após sua adição ao meio de cultura (NARUMIYA & FUKUSHIMA, 1986). Além disso, a inibição da proliferação celular mediada por CP-PGs é dependente da presença de, pelo menos, um grupo carbonila α,β -insaturado (podendo apresentar múltiplas insaturações conjugadas, como α,β,γ e $\alpha,\beta,\gamma,\delta$; veja **Fig. 4**, por favor) e está associada com a indução de proteínas de choque térmico de 72 kDa (HSP70), através da ativação (sensível à cicloeximida) dos fatores de transcrição de choque térmico (HSF, do Inglês, *heat shock factors*), que passam de uma forma

monomérica não-ligante de DNA, para uma forma trimérica, transcripcionalmente ativa, que se liga a seu sítio de controle no promotor dos genes para o choque térmico (*heat shock genes*) (OHNO *et alii*, 1988; SANTORO & AMICI, 1989). Além do mais, existe o fato de que as CP-PGs inibem a ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), por inibição direta das I κ B quinases, através da reação das CP-PGs com resíduos cisteína destas quinases, os quais são necessários para a ativação e atividade ligante do DNA do NF- κ B (ROSSI *et alii*, 2000); este efeito é, também, associado com a ativação dos HSF (SANTORO, 2000; ROSSI & SANTORO, 1997). Uma vez que, a ativação de NF- κ B dispara a transcrição de inúmeros genes envolvidos com a resposta imunológica, proliferação e diferenciação celular, o bloqueio da ativação do NF- κ B mediado pelas CP-PGs pode ter papel significativo na inibição do crescimento celular e na imunossupressão no câncer.

O efeito antiproliferativo das CP-PGs é tal que estas foram propostas como potenciais agentes para tratamento alternativo no câncer. A falta de especificidade e efeito inibitório sobre células imunológicas, contudo, excluíram sua utilização.

Achados experimentais sugerem a ocorrência de superprodução de PGs no plasma de indivíduos com câncer (*e.g.* WILLIAMS & SIDDIQUI, 1987) e que essas possam transformar-se em CP-PGs (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 1992). Por outro lado, linfonodos de animais portadores do TW256 acumulam grandes quantidades de CP-PGs enquanto que o próprio tecido tumoral não (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 1992). Uma possível explicação para este acúmulo de CP-PGs observado em células imunológicas seria a

baixa atividade da MRP/bomba GS-X em comparação com aquela encontrada em células tumorais. Estudos de nosso grupo de pesquisa mostraram que várias linhagens de células tumorais (humanas e de outras espécies de mamíferos) realmente apresentam altas atividades da MRP/bomba GS-X, enquanto que linfócitos de rato e outras células hematopóéticas da linhagem branca apresentam apenas uma atividade irrisória desta ATPase (HOMEM DE BITTENCOURT *et alii*, 1998a,b). Entretanto, não haviam, até o momento, estudos em modelos experimentais *in vivo* em que se pudesse investigar a capacidade de exportação de GS-conjugados simultaneamente no tumor e em linfócitos, onde sabidamente existe acúmulo de CP-PGs.

No presente trabalho, mostrou-se que ratos portadores do TW256 (após 21 dias do implante de cerca de 10^7 células subcutaneamente) apresentam significativa queda no peso de tecidos imunológicos (**Fig. 11**), compatível com a imunossupressão e estado caquético que tais animais exibem nesta fase do crescimento tumoral (FERNANDES *et alii*, 1990; WILLIAMS & SIDDIQUI, 1987). Uma possível causa para esta perda de massa imunológica seria o bloqueio da proliferação de linfócitos provocado pelo acúmulo de CP-PGs nestas células. De fato, estudos anteriores de nosso grupo mostraram que linfonodos de ratos portadores do TW256 acumulam cerca de 7 μ g de PGAs (que são CP-PGs) por mg de tecido (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 1992), o que equivale a aproximadamente 2,1 nmols de PGA por mg de proteína ou 210 pmols de PGA por 10^6 células.

Os resultados dos experimentos com células incubadas na presença do eletrófilo CDNB (**Fig. 12-15**), revelaram que células do

TW256 têm a capacidade de exportar cerca de 51,1 pmols de DNP-SG (um GS-conjugado) por min por 10^6 células, enquanto que não foi possível a detecção desta atividade em linfócitos destes animais através da mesma técnica. Considerando-se que CP-PGs sejam produzidas no plasma destes animais, estas poderiam ser captadas tanto por linfócitos quanto pelas células do próprio TW256. Levando-se em conta ainda que linfócitos acumulam cerca de 210 pmols de CP-PGs por 10^6 células, pode-se supor que as células do TW256 (que têm origem linfocitária e são aproximadamente de mesmo tamanho e volume que os linfócitos, SANTOS *et alii*, 1992), após a captação de CP-PGs do plasma, devam exibir concentrações intracelulares semelhantes. Se assim o for, não estaria incorreto afirmar-se que, em 4 min, as células do TW256 sejam capazes de exportar praticamente toda a CP-PG importada do plasma, ficando livres de seus efeitos antiproliferativos. Seguindo-se o mesmo raciocínio e considerando-se que o comportamento da MRP/bomba GS-X e a captação de CP-PGs em linfócitos humanos sejam equivalentes ao observado em linfócitos de ratos portadores do TW256, poder-se-ia especular que, em células de linhagens de cânceres humanos, a diferença entre a capacidade de exportação de CP-PGs conjugadas com GSH pelas células tumorais em relação aos linfócitos poderia ser mais contrastante ainda. Por exemplo, os dados da **Fig. 13** mostram que as células do câncer de laringe humano HEp-2 podem exportar GS-conjugados à taxa de aproximadamente 507 pmols por min por 10^6 células. Ou seja, num período de apenas 24 s, as células deste tumor seriam capazes de exportar 100% de toda a CP-PG que um linfócito seria capaz de acumular. Para as células do carcinoma de cérvix uterino humano HeLa (capacidade de exportação de cerca de 116 pmol/min/ 10^6 células, **Fig. 14**) este tempo poderia ser estimado em 2 min.

As medidas de atividade de exportação de GS-conjugados feitas com as células intactas podem estar sujeitas a fatores interferentes como a quantidade de GSH intracelular e a atividade das GSH S-transferases (GST). Por isso, não foi possível descartar, de início, o fato de que a baixa atividade de exportação de GS-conjugados por linfócitos, em relação à observada em células tumorais, pudesse ser devida a uma baixa quantidade de GSH intracelular e/ou uma deficiente capacidade de conjugação do eletrófilo CDNB com moléculas de GSH.

Os dados da **Fig. 18** mostram que há uma queda na concentração de GSH intracelular em linfonodos de animais portadores do TW256 em relação a linfonodos de animais normais (de 2050 ± 38 para 539 ± 32 pmol/mg de tecido). Mesmo assim, a quantidade de GSH livre em linfonodos dos ratos portadores do TW256 ainda seria suficiente para conjugar com os 21 pmols de CP-PGs por mg de tecido acumulados (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 1992). A atividade total das GST, responsáveis pela conjugação de CP-PGs com a GSH intracelular também não sofreu alteração em linfonodos de ratos portadores do TW256 quando comparada àquela observada em linfonodos de animais normais (**Fig. 21**). Logo, a ausência de atividade de exportação de GS-conjugados em linfócitos parece ser devida a uma deficiente atividade da MRP/bomba GS-X nas membranas destas células em relação à expressa em células tumorais. Esta foi a razão pela qual optou-se por realizar medidas da capacidade de exportação de GS-conjugados em membranas de linfócitos e células tumorais.

Conforme mostrado na **Fig. 16**, a atividade da MRP/bomba GS-X detectada em linfócitos de rato ($3,1 \pm 1,7$ pmol/min/mg de proteína

de membrana) foi desproporcionalmente mais baixa que a observada em células do TW256 ($64,3 \pm 7,0$ pmol/min/mg de proteína de membrana). Considerando-se, novamente, a quantidade de CP-PGs que se acumulam em linfonodos de ratos portadores do TW256 (cerca de 2100 pmols por mg de proteína; HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 1992), pode-se estimar que, em 32 min, as células do TW256 seriam capazes de exportar 100% das CP-PGs acumuladas contra 11 h 20 min que linfócitos levariam segundo a atividade da MRP/bomba GS-X que apresentam. Quando se examinam os resultados obtidos para as células das linhagens tumorais humanas HeLa e HEp-2 ($164,2 \pm 31,5$ e $705,2 \pm 9,3$, respectivamente) conclui-se que as mesmas dispenderiam 13 min (HeLa) e 3 min (HEp-2) para eliminarem a mesma quantidade de CP-PG acumulada.

Na seqüência dos experimentos, foi investigada a expressão da proteína MRP/bomba GS-X nos mesmos modelos experimentais. Contudo, os anticorpos monoclonais utilizados não foram capazes de detectar a referida proteína pela técnica de Western blot. Acredita-se que o insucesso possa estar relacionado a uma questão de especificidade, já que os anticorpos foram preparados contra um pequeno fragmento sintético que, talvez, possa estar sendo desnaturado durante as preparações. Corroboram com esta afirmação o fato de que, mesmo em células humanas que sabidamente expressam o gene codificando para a proteína (HeLa e HEp-2), também não foi possível a identificação da mesma. Neste momento, este laboratório está investigando a expressão do mRNA que codifica para a MRP/bomba GS-X nos mesmos modelos.

Tomados como um todo, os achados mostrados neste trabalho sugerem que a ausência de uma atividade MRP/bomba GS-X compatível

com as quantidades circulantes de CP-PG, possa levar ao acúmulo das mesmas no interior de linfócitos de ratos portadores do TW256, conforme a hipótese inicial. Outros agentes imunossupressores podem estar comprometendo a resposta imunológica de indivíduos portadores de câncer em fase final. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que uma deficiente atividade da MRP/bomba GS-X em linfócitos esteja também contribuindo para a imunossupressão e conseqüente caquexia observada em pacientes terminais.

Além destas conclusões, que vão ao encontro da hipótese inicial, chama atenção o fato de que as concentrações de GSH em linfonodos de ratos portadores do TW256 foram expressivamente inferiores às detectadas nos linfonodos de animais normais (queda de 74%, $p < 0,05$, Fig. 18). Entretanto, observando-se os conteúdos de GSSG (produto de oxidação da GSH) nas mesmas células, nota-se que não houve nenhuma alteração (**Fig. 19**). Logo, a queda nas concentrações de GSH medida nos linfonodos de ratos portadores do TW256 não pode ter ocorrido por um processo oxidativo (*e.g.* formação de radicais livres e reações com espécies ativas do oxigênio), o que leva à suspeição de que a redução da GSH deva ter ocorrido por um processo de conjugação não-oxidativo.

CP-PGs são eletrofílicas e capazes de sofrer conjugação com moléculas de GSH pela ação das GST (ISHIKAWA, 1992). Neste trabalho, foi observado que linfócitos de ratos com TW256 expressam as mesmas com alta atividade, quase 5 vezes a detectada no próprio tecido tumoral (**Fig. 21**). Isto sugere que a redução não-oxidativa do conteúdo de GSH em linfonodos de animais portadores do TW256 (conforme discutido acima)

possa realmente ser devida à conjugação com um eletrófilo não-oxidante (*e.g.*, uma CP-PG).

Como já comentado, CP-PGs são indutoras da expressão de proteínas de choque térmico (HSP; SANTORO, 2000). Assim, um eventual acúmulo de CP-PGs em linfócitos deve produzir indução da expressão da HSP de 72 kDa (forma induzível da família das HSP70) em paralelo com uma redução nas concentrações de GSH (como, de fato, observada). Por esta razão, foi estudada a expressão de HSP70 em linfócitos e em células tumorais. Os resultados da análise por SDS-PAGE e Western blot (utilizando-se anticorpos monoclonais do hibridoma BRM-22, Sigma, contra a HSP72 e HSP73) revelaram que linfócitos de animais portadores do TW256 expressam 27% mais HSP70 que linfócitos de ratos normais ou que o próprio tecido tumoral (**Fig. 23**) sendo observada uma estreita correlação inversa entre a expressão de HSP70 e a atividade da MRP/bomba GS-X que pode estar sendo causada por acúmulo de CP-PGs no linfócitos dos animais com câncer.

Os dados apresentados neste trabalho fornecem pistas que sugerem que a imunossupressão observada em portadores de câncer em fase final possa estar relacionada ao acúmulo de CP-PGs em linfócitos destes indivíduos. Os resultados obtidos com linfócitos de ratos portadores do TW256 que confirmam esta suposição compreendem a baixa atividade de exportação de GS-conjugados, estado redox alterado na ausência de processo oxidativo e aumento na expressão de HSP70 (que sempre ocorre na presença de CP-PGs).

Experimentos adicionais precisam ser realizados no sentido de se medir a expressão da proteína MRP/bomba GS-X e de seu mRNA. Outro passo adicional seria a detecção de GS-conjugados de CP-PGs no plasma de animais portadores do TW256. Isto seria outra forte evidência de que CP-PGs podem estar sendo internalizadas e conjugadas com moléculas de GSH em tecidos que não os linfóides, já que não se consegue medir as próprias CP-PGs no plasma devido a sua rápida internalização celular.

A expressão da MRP/bomba GS-X pode ser um importante agente de modulação da atividade biológica das CP-PGs, através da exportação das mesmas para o espaço extracelular. O papel fisiológico destas proteínas pode variar de uma função protetora contra a toxicidade química e estresse oxidativo (COLE & DEELEY, 1998) à regulação do estado redox e de ativação celular (HOMEM de BITTENCOURT *et alii*, 1998 a, b) bem como à supressão do crescimento celular no câncer (ISHIKAWA *et alii*, 1998). O entendimento da regulação da expressão dos genes que codificam para a MRP/bomba GS-X, será, portanto, um passo importante na elucidação de novos padrões de MDR e controle de proliferação celular já que poderá proporcionar informação significativa acerca de estratégias a serem empregadas na prática quimioterápica no câncer. Paralelamente à manipulação da MRP/bomba GS-X em células tumorais, contudo, este laboratório propõe o uso de linfócitos transfectados com a MRP/bomba GS-X do sangue de pacientes de câncer com a finalidade de transfusão autóloga [veja, por favor, Fig. 25 para proposta de terapia com linfócitos transfectados com a MRP/bomba GS-X (MTL)]. Esta possibilidade está, atualmente, sob investigação em nosso grupo de pesquisa através do uso da transfecção do gene MRP1 em linfócitos de ratos portadores do TW256. No entanto, a quantidade de linfócitos que

pode ser obtida através deste processo pode significar apenas uma pequena parcela do volume total de linfócitos existentes no organismo. Além disso, o sucesso da transfecção do gene MRP nestas células pode ocorrer somente em uma minoria dos linfócitos coletados. Então sugere-se um método alternativo de transfecção de linfócitos, o qual está baseado na abordagem de um adeno-retrovírus quimérico (para revisão veja REYNOLDS *et alii*, 1999, por favor). Esta técnica é utilizada para melhorar a incorporação de genes heterólogos em genomas hospedeiros de forma estável (integração gênica) de maneira a prolongar a expressão do gene.

Desta forma, este grupo de pesquisa está testando a preparação de quimeras adeno-retrovirais, através da incorporação de seqüências específicas de DNA da região inicial (E1) dos vetores adenovirais (Fig. 26), como já descrito por REYNOLDS (1999). DNA contendo genes codificando para funções de empacotamento retroviral (*e.g.* a protease essencial *gag*, transcriptase reversa *pol*, e proteína anfotrópica de envelope *env*) e genes codificando para proteínas direcionadoras do vírus para o marcador de linfócitos CD4 são incorporados em um vetor adenoviral sob o controle do promotor/*enhancer* do citomegalovirus (CMV). De outro lado, um vetor adenoviral carregando funções de vetor retroviral é preparado de tal forma a conter os genes para resistência à neomicina (*Neo^r*), proteína fluorescente verde (GFP - do Inglês, *green fluorescent protein*) e a MRP/bomba GS-X flanqueada pelas repetições terminais longas retrovirais (LTRs) e pelo sinal de empacotamento retroviral (Ψ). Então, partículas adeno-retrovirais podem ser produzidas em células-alvo transientes, através da infecção destas células intermediárias com uma combinação de ambos os construtos virais. A progenia quimérica produzida pelas células intermediárias pode, então, ser usada para infectar linfócitos *in vivo*, de

maneira a levar a uma integração gênica estável com possível transferência do gene da MRP/bomba GS-X para a progenia dos linfócitos quando estes se proliferarem.

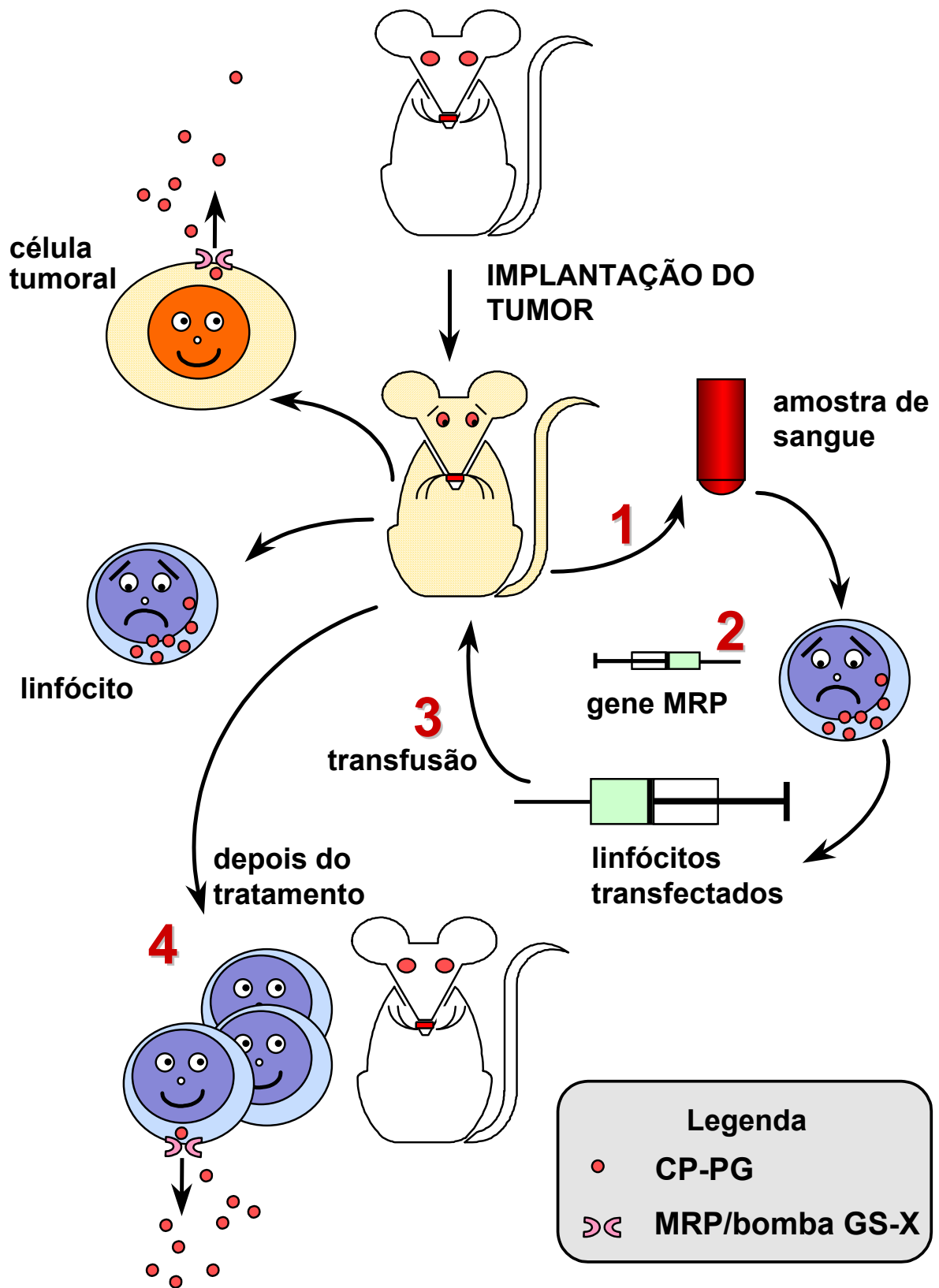


Fig. 25. Proposta para terapia gênica pela transfecção *in vitro* de linfócitos com o gene MRP/bomba GS-X. A superprodução de prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs), que são extremamente citotóxicas e citostáticas quando em altas concentrações, podem levar à imunossupressão nos estágios finais do câncer. Enquanto o tecido tumoral consegue livrar-se das CP-PGs exportando-as para o espaço extracelular na forma de GS-conjugados de glutathione através da MRP/bomba GS-X, linfócitos não exibem nenhuma atividade apreciável desta ATPase e, portanto, acumulam CP-PGs. A possibilidade de reversão do processo de imunossupressão mediado por CP-PGs está sendo investigada em nosso laboratório utilizando-se do TW256 como modelo em ratos conforme descrito a seguir. Depois de o tumor alcançar a fase de crescimento rápido, amostras de sangue são coletadas [1], linfócitos são separados, transfectados *in vitro* [2] e reinjetados nos animais [3]. Espera-se que, após o tratamento, os linfócitos possam exportar CP-PGs através da MRP/bomba GS-X. Na ausência das CP-PGs, que são imunobloqueadoras, os linfócitos poderão proliferar-se restabelecendo a função imunológica e impedindo o crescimento tumoral [4].

Adeno-retrovírus quiméricos têm a propriedade de absorver as características mais vantajosas de ambos os vírus, tais como alta infectividade *in vivo*, produção de altos títulos e capacidade de infecção de células divisíveis e não-divisíveis dos adenovírus, associadas a peculiaridades próprias de vetores retrovirais, como expressão prolongada dos genes expressos e fácil integração gênica, que permitem que os genes liberados pelos retrovírus possam ser transmitidos para as células-filhas das células infectadas por muitas gerações. Assim, se espera obter uma nova forma de tratamento para pacientes terminais de câncer, a saber, a liberação direta, *in vivo*, dos genes da MRP/bomba GS-X para os linfócitos destes indivíduos. Visto que uma das maiores ameaças ao sucesso do tratamento de pacientes com câncer em estágios avançados é a imunossupressão apresentada pelos mesmos e que pode ser, ao menos parcialmente, devida ao acúmulo de CP-PGs nos tecidos imunológicos, a estratégia proposta poderá desbloquear a resposta imunológica. Através da eliminação de CP-PGs, que são extremamente citotóxicas e citostáticas quando em altas concentrações em linfócitos, por intermédio da MRP/bomba GS-X, espera-se que uma nova abordagem clínica possa tornar-se acessível, na qual as armas biológicas contra as células cancerosas serão o retorno da própria função imunológica a sua normalidade.

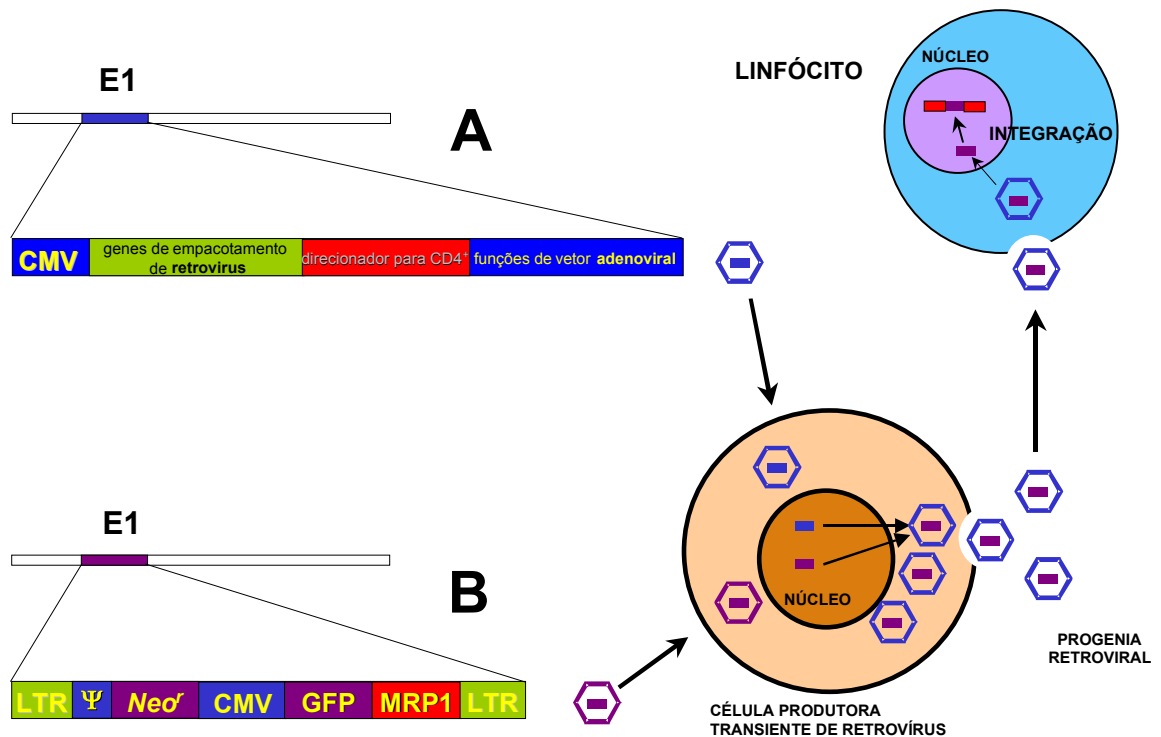


Fig. 26. Proposta para a preparação e utilização de quimeras adeno-retrovirais através da incorporação de seqüências específicas na região inicial (E1) de um vetor adenoviral *in vivo*. (A) Genes contendo funções de empacotamento de DNA retroviral (protease essencial *gag*, transcriptase reversa *pol*, e envelope amfotrópico *env*) e genes para proteínas direcionadas ao receptor CD4⁺ de linfócitos T são incorporados em um vetor adenoviral sob o controle do promotor/enhancer inicial intermediário do citomegalovírus (CMV). (B) Um vetor adenoviral compreendendo funções retrovirais como os genes para a resistência à neomicina codificadas (*Neo^r*), green fluorescent protein (GFP) e para MRP1/bomba GS-X flanqueados pelas seqüências de longas repetições terminais (LTR) retrovirais e pelo sinal de empacotamento (Ψ). Células produtoras de retrovirus transientes são convertidas pela transfecção com uma combinação de ambos os construtos virais. A progenia quimérica é então usada para infectar linfócitos *in vivo* de maneira a se estabelecer uma integração gênica estável.

CONCLUSÃO

Uma das causas freqüentes de morte em pacientes terminais de câncer é a imunossupressão apresentada nos estágios finais da doença. Muitas evidências sugerem que esta condição possa ser devida, pelo menos em parte, ao acúmulo de CP-PGs que pode observado em linfócitos destes indivíduos. Neste trabalho, foi investigada a hipótese de que o acúmulo de CP-PGs nestas células pudesse ser devido a uma baixa atividade da MRP/bomba GS-X em linfócitos.

Os resultados obtidos levaram às seguintes conclusões:

- 1) A capacidade de exportação de GS-conjugados é indetectável em linfócitos (de animais normais ou portadores do TW256), quando as células são incubadas na presença do eletrófilo CDNB, o que contrasta com a significativa atividade observada nas células obtidas do próprio tumor;
- 2) Com base nos resultados anteriormente obtidos com relação à quantidade de CP-PG que pode acumular-se em linfonodos de animais portadores do TW256 e comparando-se com os dados ora apresentados, conclui-se que as células do TW256 poderiam exportar CP-PGs na forma de GS-conjugados em direção ao espaço extracelular num

intervalo de tempo de segundos a poucos minutos, ficando isenta dos efeitos antiproliferativos destes eicosanóides;

- 3) Apesar de linfócitos de animais com TW256 apresentarem uma significativa redução nas concentrações intracelulares de GSH (imprescindível para a conjugação com moléculas de CP-PGs), a quantidade de GSH remanescente em linfonodos dos animais com câncer é mais do que suficiente para permitir a conjugação com CP-PGs nas concentrações intracelulares que provavelmente são alcançadas;
- 4) A atividade total das GSH *S*-transferases (GST), necessária para a conjugação de CP-PGs com moléculas de GSH, permanece inalterada em linfócitos de animais portadores do TW256, em comparação com a medida em linfócitos de animais normais, e é até 5 vezes maior que a observada no próprio tecido tumoral;
- 5) A atividade da MRP/bomba GS-X medida nas membranas destas mesmas células confirma estes resultados. Isto sugere que o acúmulo de CP-PGs observado nos linfócitos de animais com TW256 e a ausência de CP-PGs no tecido tumoral possam ser devidas à baixa atividade da MRP/bomba GS-X em linfócitos em contraste com a alta atividade expressa pelas células tumorais;
- 6) Outra evidência em favor da presente hipótese é o fato de que as concentrações intracelulares de GSH estão reduzidas nos linfócitos de animais com tumor sem concomitante aumento nas concentrações de GSSG. Isto sugere uma depleção de GSH por um processo não-

oxidativo, típico da conjugação com CP-PGs (que são eletrofílicas mas não oxidantes);

- 7) Corroborando com a asserção acima está o achado de que linfócitos de ratos com TW256 apresentam aumento na expressão da HSP70, uma proteína que sabidamente é induzida por CP-PGs;
- 8) Conclui-se que o acúmulo de CP-PGs em linfócitos de indivíduos com câncer possa realmente ser devido a uma baixa expressão da MRP/bomba GS-X e que tratamentos baseados na transfecção *in vitro* ou *in vivo* de linfócitos com o gene que codifica para esta proteína poderiam tornar-se alternativa eficaz à quimioterapia pesada aplicada a pacientes terminais de câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AHMED, N.; WILLIAMS, J. F.; WEIDEMANN, M. J. The human promyelocytic HL-60 cell line: a model of myeloid cell differentiation using dimethylsulphoxide, phorbol ester and butyrate. *Biochem. Int*, **23**:591-602, 1991.
- AKERBOOM, T. P. M. & SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.*, **77**:373-82, 1981.
- AKERBOOM, T. P. M. & SIES, H. Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzymol.* **173**:523-34, 1989.
- AKERBOOM, T. P.M.; NARAYANASWAMI, V.; KUNST, M.; SIES, H. ATP-dependent S-(2,4-dinitrophenyl) glutathione transport in canalicular plasma membrane vesicles from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **266**: 13147-13152, 1991.
- AKERBOOM, T. P. M. & SIES, H. Transport of glutathione disulfide and glutathione S-conjugates in hepatocyte plasma membrane vesicles. *Methods Enzymol.*, **233**:416-25, 1994.
- AMICI, C. & SANTORO, M. G. Suppression of virus replication by prostaglandin A is associated with heat shock protein synthesis. *J. Gen. Virol.*, **72**:1877-85, 1991.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências bibliográficas [NB-60].

In: *Normas ABNT sobre documentação*. Rio de Janeiro, 1978. P. 13-20

- AMICI, C.; PALAMARA, A. T.; GARACI, E.; SANTORO, M. G.
Inhibition of Sendai virus replication by Δ^{12} -prostaglandin J₂:
induction of heat shock protein synthesis and alteration of protein
glycosylation. *Antiviral Res.*, **19**:129-38, 1992a.
- AMICI, C.; SISTONEN, L.; SANTORO, M. G.; MORIMOTO, R. I.
Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription
factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**: 6227-6231, 1992b
- ANDERSON, Mary E. e MEISTER, Alton. Transport and direct
utilization of γ -glutamylcysteine for glutathione synthesis.
Biochemistry, **80**: 707-711, 1983.
- ANIYA, Y. & NAITO, A. Oxidative stress-induced activation of
microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver.
Biochem. Pharmacol., **45**:37-42, 1993.
- ARITA, H.; NAKANO, T.; OHARA, O.; TERAOKA, H. Activation
of group II phospholipase A₂ gene via two distinct mechanisms in
rat vascular smooth muscle cells. *Adv. Prostaglandin
Thromboxane Leukotriene Res.*, **21**:277-80, 1990.
- ATSMON, J.; FREEMAN, M. L.; MEREDITH, M. J.; SWEETMAN,
B. J.; JACKSON ROBERTS, L., II. Conjugation of 9-deoxy-
 $\Delta^9, \Delta^{12}(E)$ -prostaglandin D₂ with intracellular glutathione and
enhancement of its antiproliferative activity by glutathione
depletion. *Cancer Res.*, **50**:1879-85, 1990.
- AUCOIN Michelle, M et alii. Oxidative injury of coronary venular
endothelial cells depletes intracellular glutathione and induces
HSP 70. *American Physiological Society* H:1651-1658, 1995
- AWASTHI, Y. C.; GARG, H. S.; DAO, D. D.; PARTRIDGE, C. A.;
SRIVASTAVA, S. K. Enzymatic conjugation of erythrocyte
glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene: the fate of
glutathione conjugate in erythrocytes and the effect of glutathione
depletion on hemoglobin. *Blood*, **58**:733-8, 1981.

- AWASTHI, Y. C.; SINGHAL, S. S.; GUPTA, S.; AHMAD, H.; ZIMNIAK, P.; Purification and characterization of an ATPase from human liver which catalyzes ATP hydrolysis in the presence of the conjugates of bilirubin bile acids and glutathione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**:1090-6, 1991.
- AWASTHI, S.; SINGHAL, S. S.; SRIVASTAVA, S. K.; ZIMNIAK, P.; BAJPAI, K. K.; SAXENA, M.; SHARMA, R.; ZILLER, S. A.; III, FRENKEL, E. P.; SINGH, S. V.; HE, N. G.; AWASTHI, Y. C. Adenosine triphosphate-dependent transport of doxorubicin, daunomycin, an vimbastine in human tissues by a mechanism distinct from the P-glycoprotein. *J. Clin. Invest.*, **93**:958-65, 1994.
- BELINSKY, M. G.; BAIN, L. J.; BALSARA, B. B.; TESTA, J. R.; KRUIH, G.D., Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**: 1735-1741, 1998
- BERGELSON, S.; PINKUS, R.; DANIEL, V. Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res.*, **54**:36-40, 1994.1979
- BERGSTRÖM, S.; CARLSON, L. A.; WEEKS, J. R. The prostaglandins: a family of biologically active lipids. *Pharmacol. Rev.*, **20**:1-48, 1968.
- BILLAH, M. M.; ECKEL, S.; MULLMANN, T. J.; PAI, J.-K.; SIEGEL, M. I.; EGAN, R. W. The eicosanoid lipid precursors diacylglycerol and phosphatidic acid are formed by phospholipase D in neutrophils. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.*, **21**:281-5, 1990.
- BOARD, Philip G. Transport of glutathione S-conjugate from human erythrocytes. *FEBS letters*, **124**:n^o2.1981.

- BOOYENS, J.; ENGELBRECHT, P.; LE ROUX, S.; LOUWRENS, C. C.; VAN DER MERWE, C. F.; KATZEFF, I. E. Some effects of essential fatty acids linoleic acid, alpha-linolenic acid and their metabolites gamma linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and of prostaglandins A₁ and E₁ on the proliferation of human osteogenic sarcoma cells in culture. *Prostaglandins Leukotrienes. Med.*, **15**:15-33, 1984.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248-54, 1976.
- BURGOYNE, Robert D. & MORGAN, Alan. The control of AA levels. *TIBS* 15:365-366, 1990)
- BHUYAN, B. K.; ADAMS, E. G.; BADINER, G. J.; LI, L. H.; BARDEN, K. Cell cycle effects of prostaglandins A₁, A₂, and D₂ in human and murine melanoma cells in culture. *Cancer research*, 46:1688-1693, 1986.
- CHANG, J.; MUSSER, J. H.; MCGREGOR, H. Phospholipase A₂: function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.*, **36**:2429-36, 1987.
- CHUMAN, Y.; CHEN, Z. S.; SUMIZAWAS, T.; FURUKAWA, T.; HARAGUCHI, M.; TAKEBAYASHI, Y.; NIWA, K.; YAMADA, K.; AIKOU, T.; AKIYAMA, S. I. Characterization of the ATP-dependent LTC₄ transporter in cisplatin-resistant human κB cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**: 158-165, 1996
- COLE, S.P.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J. H.; MACKIE, J. E.; GRANT, C. E.; ALQMIST, K. C.; STEWART, A. J.; KURZ, E. U.; DUNCAN, A. M.; DEELEY, R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**: 1650-1654, 1992

COLE, S.P. & DEELEY, R.G. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* **20**: 931-940, 1998

CONTI C; MASTROMARINO P; TOMAO P; De MARCO A; PICA F; SANTORO M.G. Inhibition of poliovirus replication by prostaglandins A and J in human cells. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**(2):367-72, 1996

COWLEN, M. S. & ELING, T. E. Modulation of c-jun and jun-B messenger RNA and inhibition of DNA synthesis by prostaglandin E₂ in Syrian hamster embryo cells. *Cancer Res.*, **52**:6912-6, 1992.

CURI, R.; HOMEM DE BITTENCOURT Jr., P. I.; COSTA ROSA, L. F. B. P.; FERNANDES, L. C.; SANTOS, M. F.; ALMEIDA, A.; CARPINELLI, A. R. Insulin and prostaglandins: possible signals between tumor and host immune system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**: 773-779, 1995

DE BRUIJN, M. H. L. Substrate specificity and the mdr pump. *Trends Biochem. Sci.*, **15**:218-9, 1990.

D'ONOFRIO, C.; AMICI, C.; PUGLIANIELLO, A.; FARAONI, I.; LANZILLI, G.; SANTORO, M. G.; BONMASSAR, E. Comparative anti-viral and anti-proliferative activity of PGA₁ and PGJ₂ against HTLV-I-infected MT-2 cells. *Int. J. Cancer*, **51**: 481-488, 1992.

DRÖGE, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; MIHM, S.; GALTER, D.; SCHENK, H.; ECK, H.-P.; ROTH, S.; GMÜNDER, H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.*, **8**:1131-8, 1994.

DUTCZAK, William J. e BALLATORI, Nazzareno. Transport of the glutathione-methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**: 9746-9751. 1994.

- ELIA, G. & SANTORO, M. G. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *Biochem. J.*, **300**:201-9, 1994.
- FERNANDES, L.C.; MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, ^a R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. *Am. J. Physiol.* **258**: E1033-E1036, 1990
- FITZPATRICK, F. A. & WYNALDA, M. A. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D₂. *J. Biol. Chem.*, **258**:11713-8, 1983.
- FORMAN, B. M.; TONTONOV, P.; CHEN, J.; BRUN, R. P.; SPIEGELMAN, B. M.; EVANS, R. M. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* **83**, 803-812, 1995
- FUKUSHIMA, M.; KATO, I.; NARUMIYA, S.; MIZUSHIMA, Y.; SASAKI, H.; TERASHIMA, Y.; NISHIYAMA, Y.; SANTORO, M. G. Prostaglandins A and J: antitumor and antiviral prostaglandins. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.*, **19**:415-8, 1989.
- GADD, M. A. & HANSBROUGH, J. F. Postburn suppression of murine lymphocyte and neutrophil functions is not reversed by prostaglandin blockade. *J. Surgical Res.*, **48**:84-90, 1990.
- GAO, Z.; FIELDS, J. Z.; BOMAN, B. M. Co-transfection of MDR1 and MRP antisense RNAs abolishes the drug resistance in multidrug-resistant human lung cancer cells. *Anticancer Res.* **18**: 3073-3076, 1998
- HABIG, W. H. & JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.*, **77**:218-31, 1981a.
- HABIG, W. H. & JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.*, **77**:398-404, 1981b.

- HEMPEL, S.L. & WESSELS Prostaglandin E2 synthesis after oxidant stress is dependent on cell glutathione content. *APS C*:1392-1399, 1993.
- HENDERSON, G.B. HUGHES, T. R.; SAXENA, N. Functional implications from the effects of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and ethacrynic acid on efflux routes for methotrexate and cholate. *J. Biol. Chem.* **269**: 13383-13389, 1994
- HIPFNER, D. R.; GAULDIE, S. D.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Detection of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein, MRP, with monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, **54**:5788-5792, 1994.
- HIPFNER, D. R.; ALMQUIST, K. C.; STRIDE, B. D.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Location of a protease-hypersensitive region in the multidrug resistance protein (MRP) by mapping of the epitope of MRP-specific monoclonal antibody QCRL-1. *Cancer Res.*, **56**:3307-3314, 1996.
- HIRATA, Y.; HAYASHI, H.; ITO, S.; KIKAWA, Y.; ISHIBASHI, M.; SUDO, M.; MIYAZAKI, H.; FUKUSHIMA, M.; NARUMIYA, S.; HAYAISHI, O. Occurrence of 9-deoxy- Δ^9 , Δ^{12} -13,14-dihydroprostaglandin D₂ in human urine, *J. Biol. Chem.* **263**: 16619-16625, 1988
- HOMEM DE BITTENCOURT , P. I. JR.; PONTIERI, V.; CURI, R.; LOPES, O. U. Effects of aspirin-like drugs on Walker 256 tumor growth and cachexia in rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **22**: 1039-1042, 1989
- HOMEM de BITTENCOURT P.I Jr. & CURI, R. Interconversion of prostaglandins: a possible signal to control immune system function in cancer, *Cancer Ther, Control.* **2**: 217-222, 1992
- HOMEM DE BITTENCOURT, P. I., Jr.; PERES, C. M.; YANO, M. M.; HIRATA, M. H.; CURI, R. Pyruvate is a lipid precursor for rat lymphocytes in culture: evidence for a lipid exporting capacity. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **30**:631-41, 1993.

HOMEM DE BITTENCOURT, P. I., Jr.; YANO, M. M.; HIRATA, M. H.; WILLIAMS, J. F.; CURI, R. Evidence that prostaglandins modulate lipogenesis in cultured lymphocytes - a comparison with its effect on macrophages and tumour cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **33**:463-75, 1994.

HOMEM de BITTENCOURT, P. I. Jr. Glutathione metabolism and glutathione S-conjugate export ATPase (MRP/GS-X pump) activity in cancer. I. differential expression in human cancer cell lines. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**:1227-1241, 1998.

HOMEM de BITTENCOURT Jr., P. I.; SENNA, S. M.; VIDOR, A. C.; MIYASAKA, C. K.; CURI, R.; WILLIAMS, J. F. Glutathione metabolism and glutathione S-conjugate export ATPase (MRP1/GS-X pump) activity in cancer. II Cell-to-cell variability, relation with cellular activation state and functional absence of GS-X pump in lymphocytes. *Biochemistry and molecular biology*, **45**:1243-1254, 1998.

HOMEM DE BITTENCOURT, P. I., Jr.; PONTIERI, V.; CURI, R.; LOPES, O. U. Effects of the antiproliferative cyclopentenone Prostaglandin A₁ on glutathione metabolism in human cancer cells in culture. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**:1255-1263, 1998.

HONN, K.V. & MARNETT, L.J. Requirement of a reactive α,β -unsaturated carbonyl for inhibition of tumor growth and induction of differentiation by "A" series prostaglandins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**: 34-40, 1985

IKAI, K. & FUKUSHIMA, M. Effects of cytotoxic prostaglandin Δ^{12} -PGJ₂, on protein synthesis and cytoskeleton in transformed epidermal cells in culture. *Arch. Dermatol.* 1990

IRVINE, R. F. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.*, **204**:3-16, 1982.

ISHIKAWA, T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.*, **17**: 463-468, 1992

- ISHIKAWA, T.; BAO J. J.; YAMANE, Y., AKIMARU, K.; FRINDRICH, K.; WRIGHT, C. D.; KUO, M. T. Coordinated induction of MRP/GS-X pump and γ -glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**:14981-14988, 1996.
- ISHIKAWA, T.; WRIGHT, C. D.; ISHIZUKA, H The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function and gene expression. *Biosci. Reports*. **17**: 189-207, 1997
- ISHIKAWA, T.; AKIMARU, K.; NAKANISHI, M.; TOMOKIYO K.; FURUTA K.; SUZUKI, M.; NOYORI, R. Anti-cancer-prostaglandin-induced cell-cycle arrest and its modulation by na inhibitor of the ATP-dependent glutathione S-conjugated export pump (GS-X pump). *Biochem. J.* **336**: 569-576, 1998
- ITO, S.; NARUMIYA, S.; HAYAISHI, O. Prostaglandin D₂: a biochemical perspective. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids*, **37**:219-34, 1989.
- JAESCHKE, H. Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia. *Am. J. Physiol.*, **258**(4Pt1):G499-505, 1990.
- JAKOB, T.; HUSPITH, B. N.; LATCHMAN, Y. E.; RYCRIFT, R.; BROSTOFF, J. Depressed lymphocyte transformation and the role of prostaglandin in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.*, **79**:380-4, 1990.
- JEDLITSCHKY, G.; LEIER, I.; BUCHHOLZ, U.; CENTER, M.; KEPPLER, D. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res.*, **54**:4833-6, 1994.
- KALEY, Gabor e KOLLER, Akos. Prostaglandin-Nitric oxide interactions in the microcirculation. *Advances in prostaglandin, tromboxanes and leukotriene Research*, Vol. **2**. Raven Press, NY, 1995.

- KITAMURA, T.; JANSEN, P.; HARDENBROOK, C.; KAMIMOTO, Y.; GATMAITAN, Z.; ARIAS, I. M. Defective ATP-dependent bile canalicular transport of organic anions in mutant (TR⁻) rats with conjugated hyperbilirubinemia. *Procl. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 3557-3561, 1990
- KIKAWA, Y.; NARUMIYA, S.; FUKUSHIMA, M.; WAKATSUKA, H. 9-deoxy- Δ^9, Δ^{12} -13,14-dihydroprostaglandin D₂, a metabolite of prostaglandin D₂ formed in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:1317-21, 1984.
- KLIEWER, S. A.; LENHARD, J. M.; WILSON, T. M.; PATEL, I.; MORRIS, D. C.; LEHMANN, J. M. A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**: 813-819, 1995
- KOOL, M.; van der LINDEN, M.; de HAAS, M.; BAAS, F.; BORST, P. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* **59**: 175-182, 1999
- KONDO, T.; YOSHIDA, K.; URATA, Y.; GOTO, S.; GASA, S.; TANIGUCHI, N. γ -glutamylcysteine synthetase and active transport of glutathione S-conjugate are responsive to heat shock in K562 erythroid cells. *J. Biol. Chem.*, **268**:20366-72, 1993.
- KUROKAWA, Hirokazu, et alii. γ -glutamylcysteine synthetase gene overexpression results in increased activity of the ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump and cisplatin resistance. *Biochemical and biophysical research communications*, **216**: 258-264, 1995.
- LaBELLE, E. F.; SINGH, S. V.; SRIVASTAVA, S. K.; AWASTHI, Y. C. Dinitrophenyl glutathione efflux from human erythrocytes is primary active ATP-dependent transport. *Biochem. J.*, **238**:443-9, 1986.

- LAM, B. K.; XU, K.; ATKINS, M. B.; AUSTEN, K. F. Leukotriene C₄ uses probenecid-sensitive export carrier that does not recognize leukotriene B₄. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**:11598-602, 1992.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685, 1970.
- LEUNG, K. H. & MIHICH, E. Prostaglandin modulation of development of cell-mediated immunity in culture. *Nature*, **288**:597-600, 1980.
- LOE, D.W.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C₄ and chemotherapeutic agents in membrane vesicles: Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J. Biol. Chem.* **271**: 9675-9682, 1996
- LOE, D.W., DEELEY, R.G. & COLE, S.P. Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for co-transport with reduced glutathione. *Cancer Res.* **58**: 5130-5136, 1998
- LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-75, 1951.
- LUNN, G.; DALE, G. L.; BEUTLER, E.. Transport accounts for glutathione turnover in human erythrocytes. *Blood*, **54**:238-4, 1979.
- MANNERVIK, B. & GLUTHENBERG, C. Glutathione transferase. *Methods Enzymol.*, **77**:231-5, 1981.
- MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, **220**:472-7, 1983.

- MONKS, T. J.; ANDERS, M. W.; DEKANT, W.; STEVENS, J. L.; LAU, S. S.; van BLADEREN, P. J. Glutathione conjugate mediated toxicities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**:1-19, 1990.
- MOORE, W. R.; ANDERSON, M. E.; MEISTER, A.; MURATA, K.; KIMURA, A. Increased capacity for glutathione synthesis enhances resistance to radiation in E. coli: a possible model for mammalian cell protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:1461-4, 1989.
- MULLER, M.; MEIJER, C.; ZAMAN, G. J.; BORST, P.; SCHEPER, R. J.; MULDER, N. H.; De VRIES, E. G.; JANSEN, P. L. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**: 13033-7, 1994.
- NARUMYA, S & FUKUSHIMA, M. Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. I. Active transport and intracellular accumulation of cyclopentenone prostaglandins, a reaction leading to growth inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **239**: 500-505, 1986
- NEWSHOLME, E. A. e LEECH, A.R. *Biochemistry for the Medical Science*. John Wiley & Sons. Toronto, 1995.
- OHNO, K.; FUJIWARA, M.; FUKUSHIMA, M.; NARUMIYA, S. Metabolic dehydration of prostaglandin E₂ and cellular uptake of the dehydration product: correlation with prostaglandin E₂-induced growth inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**:808-15, 1986.
- OHNO, K.; SAKAI, T.; FUKUSHIMA, M.; NARUMIYA, S.; FUJIWARA, M. Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. IV. Effect of cyclopentenone prostaglandins on cell cycle progression of G₁-enriched HeLa S3 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**:294-8, 1988a.

- ONO, K.; NAKANE, H.; KATO, T.; FUKUSHIMA, M. Suppressive effects of various antitumor prostaglandin derivatives on the activity levels of DNA polymerases in human cultured tumor cells. *ADV. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* **17**: 976-98, 1987
- PARKER, C. W. Leukotrienes and prostaglandins in the immune system. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.*, **16**:113-33, 1986.
- PAULUSMA, C.C.; BOSMA, P. J.; ZAMAN G. J. R.; BAKKER, C. T. M.; OTTER, M. SCHEFFER, G. L.; SCHEPPER, R. J.; BORST, P.; OUDE-ELFERINK, R. P. J. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science*, **271**: 1126-1128, 1996
- PELUS, L. M.; LEVI, E.; WELTE, K. The response of human marrow colony-forming units-granulocyte and macrophage to inhibition by prostaglandin E and acid isoferritins is associated with expression of HMC class II antigens and requires the participation of a CD8⁺ T lymphokine. *J. Immunol.*, **141**:1658-64, 1988.
- PETRINI, B.; WASSERMAN, J.; HAMMARSTRÖM, S.; BLOMGREN, H.; VEDIN, I. Modulation of lymphocyte and monocyte responses in vitro by 9-deoxy- Δ^9 -prostaglandin D₂ and 9-deoxy- Δ^9, Δ^{12} -prostaglandin D₂. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **87**:388-91, 1988.
- PHIPPS, R. P.; LEE, D.; SCHAD, V.; WARNER, G. L. E-series prostaglandins are potent growth inhibitors for some B lymphomas. *Eur. J. Immunol.*, **19**:995-1001, 1989.
- REYNOLDS, PN, FENG, M and CURIEL DT, Chimeric viral vectors – the best of both worlds? *Mol. Med. Today* **5**: 25-31, 1999.
- ROSSI, A ELIA, G. & SANTORO, M.G. Inhibition of nuclear factor κ B by prostaglandin A₁ : na effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 746-750, 1997

- ROSSI, A.; KAPAHI, P.; NATOLI, G.; TAKAHASHI, T.; CHEN, Y.; KARIM, M.; SANTORO, M. G. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* **403**: 103-108, 2000
- RUETZ, S. & GROS, P. A mechanism for P-glycoprotein action in multidrug resistance: are we yet there? *Trends Pharmacol. Sci.* **15**:260-263, 1984
- SANTORO, M.G., GARACI, E. & AMICI, C. Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 8407-8411, 1989
- SANTORO, M.G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.* **59**: 55-63, 2000
- SEELIG, J. F. & MEISTER, A. Glutathione biosynthesis; gamma-glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Methods Enzymol.* **113**:379-90. 1985;
- SANTOS, M.F.; HOMEM de BITTENCOURT Jr., P.I.; NUNES, F.D.; CURI, R.; FAVA-De-MORAES, F. Effect of aging on the glutaminase activity of neoplastic and immune tissues. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25:1197-1207, 1992.
- SCOTT, W. A.; PAWLOWSKI, N. A.; MURRAY, H. W.; ANDREACH, M.; ZRIKE, J.; COHN, Z. A. Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation. *J. Exp. Med.*, **155**:1148-60, 1982.
- SEGER, Rony and KREBS, Edwin G. The MAPK signaling cascade. *Serial Review, FASEB Journal* **9**:726-734, 1995.
- SHARMA, R.; GUPTA, S.; AHMAD, H.; ANSARI, G. A.; AWASTHI, Y. C. Stimulation of a human erythrocyte membrane ATPase by glutathione conjugates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104**:421-8, 1990.

- SHEN, Hongxie, et alii. Cellular and in vitro transport of glutathione conjugates by MRP. *Biochemistry*, **35**: 5719-5725, 1996.
- SINGHAL, S. S.; SHARMA, R; GUPTA, S.; AHMAD, H.; ZIMNIAK, P.; RADOMINSKA, A.; LESTER, R.; AWASTHI, Y. C. The anionic conjugates of bilirubin and bile acids stimulate ATP hydrolysis by S-(dinitrophenyl)glutathione ATPase of human erythrocyte. *FEBS Lett.*, **281**: 255-7, 1991.
- SIDDIQUI, R.A. & WILLIAMS, J.F. Interactions of vasopresin and prostaglandin E₂ in the development of cancer cachexia, *Med. Sci. Res.* **15**: 45-46, 1987
- THUN, M. J.; NAMBOODIRI, M. M.; HEATH, C. W. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N. Engl. J. Med.*, **325**:1593-6, 1991.
- URADE, Y.; UJIHARA, M.; HORIGUCHI, Y.; IKAI, K.; HAYAISHI, O. The major source of endogenous prostaglandin D₂ production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues. *J. Immunol.*, **143**:2982-9, 1989.
- VIEIRA, R.; VECCHIA, M. G.; HOMEM de BITTENCOURT Jr., P. I.; ALMEIDA, A. F.; FERNANDES, L. C.; CURI, R. Desenvolvimento de homogeneizador de alta velocidade para tecidos. *Arq. Biol. Tecnol.*, **32**:495-505, 1989.
- VINCENZINI, M. T.; FAVILLI, F.; STIO, M.; IANTOMASI, T. Intestinal glutathione transport system: a possible detoxification role. *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**:571-9, 1991.
- WILLIAMS, E. D.; KARIM, S. M. M.; SANDLER, M. Prostaglandin secretion by medullary carcinoma of the thyroid – A possible cause of the associated diarrhoea. *Lancet*, **1**:22-3, 1968.

YUROCHKO, A. D.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. Tumor modulation of autoreactivity: decreased macrophage and autoreactive T cell interactions. *Cell Immunol.*, **127**:105-19, 1990.

RELAÇÃO DAS FIGURAS

Fig.1: Fórmulas estruturais do ácido prostanóico (composto parental hipotético dos prostanóides) e de algumas prostaglandinas e compostos relacionados. pag. 14;

Fig.2: Impacto da produção de prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) sobre o sistema imunológico de indivíduos com câncer, pag.16;

Fig.3: Vias de liberação e metabolização de ácido araquidônico, pag. 18;

Fig.4: Vias de geração de prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) e suas estruturas químicas, 21;

Fig.5: Esquema da captação de prostaglandinas ciclopentenônicas por transporte ativo primário, pag. 22;

Fig.6: Representação esquemática da interconversão de prostaglandinas no plasma de animais com câncer, pag. 28;

Fig.7: Esquema do efeito imunossupressor de prostaglandinas ciclopentenônicas no câncer, pag. 29;

Fig.8: Localização e funcionamento da bomba GS-X, pag. 30;

Fig.9: Determinação espectrofotométrica da exportação de S-conjugados de glutatona, pag. 44;

Fig.10: Esquema da reação de conjugação intracelular do CDNB com GSH pela ação das glutatona S-transferases, pag. 45;

Fig.11: Pesos frescos de tecidos imunológicos de animais controle e portadores do tumor de Walker 256 14 dias após o implante, pag. 67;

Fig.12: Atividade de exportação do conjugado DNP-SG em células do T*W256 em suspensão, pag. 70;

Fig.13: Atividade de exportação do conjugado DNP-SG em células tumorais humanas da linhagem HEp-2, pag. 71;

Fig.14: Atividade de exportação do conjugado DNP-SG em células tumorais humanas da linhagem HeLa, pag. 72;

Fig.15: Análise comparativa da atividade de exportação do conjugado DNP-SG em células tumorais humanas e TW256

Fig.16: Atividade da bomba GS-X em membranas isoladas de linfócitos de rato, células do TW256 em rato e das linhagens humanas HEp-2 e HeLa, pag. 73;

Fig.17: Conteúdo de GSH TOTAL no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor, pag. 75;

Fig. 18: Conteúdo de GSH no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor, pag. 77;

Fig.19: Conteúdo de GSSG no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor, pag. 78;

Fig.20: Estado redox tecidual ($[GSSG]/[GSH]$) no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor, pag. 79;

Fig.21: Atividade total das glutatona *S*-transferases no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor, pag. 80;

Fig.22: Atividade da γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS) no tecido tumoral do TW256 e em linfonodos de ratos normais e portadores do tumor, pag. 81;

Fig.23. Análise da expressão de HSP70 por Western blot em linfócitos e em células tumorais, pag.83;

Fig.24. Análise comparativa entre a atividade da bomba GS-X e a expressão da HSP no tecido tumoral e nos linfócitos de animais portadores do TW256, pag. 86;

Fig.25:Proposta para terapia gênica pela transfecção *in vitro* de linfócitos com o gene MRP/bomba GS-X, pag.100;

Fig.26: Proposta para a preparação e utilização de quimeras adeno-retrovirais através da incorporação de seqüências específicas na região inicial (E1) de um vetor **adenoviral** *in vivo*, pag. 102.

ABSTRACT

End-stage cancer patients usually show an immunosuppression-associated cachexia. It is possible to detect in these subjects increasing levels of plasma cyclopentenone prostaglandins (CP-PGs), which are recognized as antiproliferative agents. In this situation, an overproduction of CP-PGs leads to a quick uptake of them by both immune and cancer cells. Nevertheless, only immune cell proliferation is affected by this antiproliferative activity, whereas cancer cells seem not to be affected. CP-PGs are electrophilic and possess an α,β -unsaturated cyclopentane ring which provides potential for conjugation with nucleophilic substances as glutathione. The presence of the ATPase MRP/GS-X pump, responsible for the export of GSH-conjugates towards the extracellular space, could be a reasonable explanation for the ability of cancer cells to avoid CP-PGs antiproliferative effects. These findings were previously confirmed *in vitro* but remained without validation *in vivo*. In this study, the role of MRP/GS-X pump was investigated in both normal and Walker 256 tumor-bearing rats. These animals presented a body weight loss associated with cancer cachexia by 21 days after tumor inoculation. It was observed that the capacity of GSH S-conjugate export through MRP/GS-X pump was significantly reduced (21-fold) in lymphocytes as compared to Walker 256 tumor cells. Lymphocyte GSH levels were found to be reduced without oxidation, once the GSSG (glutathione disulfide) levels were not depleted, which suggests a non-oxidative conjugation, probably due to CP-PGs. There was also no difference found in glutathione S-transferase and in γ -glutamylcysteine synthetase (the enzymes responsible, respectively, for conjugation and synthesis of GSH) activities between lymphocytes obtained from normal and Walker 256 tumor-bearing rats. Moreover, it was observed in the lymphocytes of tumor-bearing animals expression of heat shock protein (HSP70), which is induced by CP-PGs among other agents. The results suggest that MRP/GS-X pump, responsible for the export of GSH/CP-PG conjugates, has low activity in lymphocytes leading to the cancer-associated immunosuppression.