

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS *mdr* MURINAS
DURANTE O CICLO ESTRAL
E SOB ESTÍMULO HORMONAL

por Lavinia Schwantes

Orientação: Marion Schiengold

UFRRS
Instituto de Biociências
Biblioteca Setorial

N.º Sist. _____
Registro _____
N.º Opac. _____

Dissertação para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas-
ênfase em Genética

BIO
BIO
119

INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, os seres vivos têm contado com a eficiência de vários mecanismos de defesa em nível celular. Estes mecanismos atuam se contrapondo principalmente a toxinas de baixo peso molecular encontradas no ambiente. Neste nível, podem ser destacados alterações na membrana celular que reduzem a concentração intracelular das toxinas, alterações no seu metabolismo, alterações no alvo das toxinas ou aumento dos níveis de reparo do dano induzido pelas toxinas.

Paradoxalmente, estas mesmas toxinas, contra as quais existem na natureza eficientes mecanismos de defesa, vêm sendo utilizadas, há mais de vinte anos, como base para tratamentos quimioterápicos. Destacam-se aqui principalmente as antraciclínas, os alcalóides de vinca, as epipodofilotoxinas e os antibióticos antitumorais.

A redução do acúmulo de drogas citotóxicas com conseqüente resistência celular começou a ser estudado na década de 60, quando Kessel e colaboradores constataram que células leucêmicas murinas selecionadas para resistência à vimblastina apresentavam resistência cruzada à actinomicina D, alcalóides de vinca e daunorrubicina (Kessel e cols., 1965 e 1968). Nestas células, o decréscimo no acúmulo de drogas era paralelo a sua resistência. Deste modo, o termo resistência a múltiplas drogas (*multidrug resistance*, MDR) começou a ser empregado para descrever o fenômeno pelo qual uma célula, depois de submetida a um tratamento com uma droga, adquire resistência cruzada a uma variedade de agentes não relacionados em sua estrutura ou mecanismo de ação (Pastan & Gottesman, 1987; Bradley e cols., 1988). Drogas atualmente envolvidas no fenótipo MDR incluem além das já citadas os taxanos e agentes sintéticos como mitoxantrone e trimetrexate. O desenvolvimento da resistência a múltiplas drogas tem, portanto, sérias implicações no sucesso de um tratamento quimioterápico.

Células resistentes a múltiplas drogas são caracterizadas por um decréscimo na acumulação intracelular de drogas que é principalmente causada por um aumento na expressão de uma bomba de efluxo de drogas dependente de ATP: a glicoproteína P. A glicoproteína P pertence a uma família de proteínas que são capazes de transportar substratos naturais que incluem peptídeos, íons inorgânicos, esteróides, lipídios e drogas citotóxicas. O mecanismo de expulsão mais aceito é o do "aspirador hidrofóbico" de Gottesman & Pastan (1993), onde a Pgp interage diretamente com o substrato na membrana plasmática bombeando-o para fora da célula. Este modelo explica o efluxo aumentado, o influxo diminuído e a natureza hidrofóbica dos substratos envolvidos.

No camundongo, esta proteína é composta de 1276 aminoácidos, tem uma massa molecular de 141 kDa na ausência de glicosilação e é constituída por duas metades homólogas. Estas duas metades provavelmente evoluíram como resultado de duplicação gênica (Gros e cols., 1986). Cada metade contém um domínio hidrofóbico com seis α -hélices transmembrana e um domínio citoplasmático contendo um sítio de ligação com ATP. Uma seqüência central que conecta as duas metades homólogas da proteína, ou *linker region*, mostra em análises *in vitro* a presença de resíduos de serina, sendo a primeira alça extracelular fortemente N-glicosilada (ver revisão de Di Pietro e cols., 1999). Em relação à glicosilação, sabe-se que este processo é responsável por grande parte das variações encontradas no total da massa molecular da Pgp.

Estas proteínas de membrana são codificadas por uma pequena e estruturalmente conservada família de genes *mdr* (Chen e cols., 1986; Gros e cols., 1986; Van der Blik e cols., 1987; Croop e cols., 1989; Ng e cols., 1989), e pertencem a superfamília ABC (ATP- binding

cassete) que contém proteínas de transporte, de acordo com Higgins, 1992. A família de genes *mdr* é caracterizada por conter dois membros (*MDR1* e *MDR2*) em humanos e três em roedores: *mdr1*, *mdr2* e *mdr3* em camundongos e *pgp1*, *pgp2* e *pgp3* em hamster chinês.

Os genes da Pgp estão localizados no cromossomo 1 do hamster (Teeter e cols., 1986; Jongmsa e cols., 1987), no cromossomo 5 do camundongo (Martinson & Levan, 1987) e no cromossomo 7 em humanos (Trent & Witkowsky, 1987; Fojo e cols., 1987).

Comparando-se os genes humanos e murinos observa-se que o *mdr3* de camundongo e o *MDR1* humano são 88% idênticos. As regiões evolutivamente mais conservadas são aquelas de ligação com o ATP (Gottesman & Pastan, 1993). A despeito do alto grau de similaridade estrutural as diferentes isoformas da glicoproteína P são funcionalmente diferentes e têm padrões de expressão distintos. A Pgp humana *MDR1* e as murinas *mdr1* e *mdr3* podem expulsar uma ampla variedade de drogas hidrofóbicas, embora de acordo com Yang e cols., 1989, *mdr3* seja uma bomba mais eficiente do que *mdr1*. Ao passo que *mdr1* está também envolvida na secreção de hormônios esteróides (Gottesman & Pastan, 1993). Já a isoforma *MDR3* e seu correspondente murino *mdr2*, que não conferem resistência a múltiplas drogas devido a uma habilidade reduzida da proteína em se ligar as mesmas (Buchman & Gros, 1994), estão relacionadas com o transporte de colesterol e fosfolípidios para a bile (Smit e cols., 1994; Oude-Elferinke e cols., 1996).

Tabela1: Comparação da homologia dos genes *mdr* de humanos, de roedores e entre eles.

Classe	Humanos	Homologia entre genes humanos e murinos	Camundongos	Fenótipo MDR
I	<i>MDR1</i>	88%	<i>mdr3</i>	sim
II	-	-	<i>mdr1</i>	sim
III	<i>MDR3</i>	90%	<i>mdr2</i>	não
	76%		85%	

Lewis, em 1994 expôs a idéia de que os genes da família MDR violam a regra geral dos transportadores por serem amplamente inespecíficos. Sugeriu que um gene *mdr* é uma variação de um transportador regular, que simplesmente ampliou seu espectro de substratos, provendo a célula de um sistema simples de defesa contra toxinas sempre presentes nos organismos.

Os genes *Pgp-like* estão associados com resistência a drogas semelhante a MDR em aparentemente todo tipo de organismo onde é pesquisado: bactérias, leveduras, parasitas como *Plasmodium* e *Leishmania*, insetos (gênero *Drosophila*) e plantas como *Arabidopsis thaliana* (Lewis, 1994; Balzi & Goffeau, 1994; Ouellette e cols., 1994; Basco e cols., 1996; Dudler & Hertig, 1992). Em mamíferos, a Pgp tem sido caracterizada principalmente em humanos, macacos, porcos e roedores (hamster chinês, camundongo e rato). O estudo do padrão de expressão da glicoproteína P nos diferentes tecidos destes animais tem auxiliado na compreensão dos papéis fisiológicos por ela desempenhados.

Vários estudos sobre a distribuição tissular da Pgp e da expressão dos genes *mdr* envolvendo humanos e roedores tem sido realizados utilizando os mais variados métodos.

Borst e colaboradores, em 1993 apresentaram uma revisão relacionando as possíveis funções da Pgp com sua distribuição tissular. Esta revisão está baseada principalmente nos dados de Croop e colaboradores de 1989, que é um trabalho clássico em murinos onde os autores

analisaram a expressão de *RNAm* de *mdr*. Concluíram que *mdr1* é observado no útero, na glândula adrenal, rins, fígado, baço, coração, músculo, cérebro, pulmão e placenta. *Mdr2* é expresso na glândula adrenal, fígado, músculo, baço, coração. *Mdr3*, por sua vez é observado nos rins, fígado, músculo, baço, coração, cérebro, pulmão, intestino, testículo e estômago. Estes autores afirmaram que ocorrem poucas variações individuais e entre linhagens e não observaram a expressão em murinos de *mdr3* na glândula adrenal, ovários e útero e de *mdr1* nos ovários.

Segundo revisão de Di Pietro e colaboradores, em 1999, altos níveis de expressão gênica e proteica de *MDR1* humano foram detectados na medula, glândula adrenal, rim, jejuno, cólon, endotélio capilar dos testículos e barreira hematocefálica. Em contraste, a isoforma *MDR3* foi quase exclusivamente localizada no fígado. Em camundongos, *mdr1* foi principalmente expressa na glândula adrenal, placenta e útero de fêmeas grávidas enquanto *mdr3* foi encontrada no pulmão, tubo digestivo e barreira hematocefálica e *mdr2* foi restrito ao fígado e aos músculos. A *Pgp* foi predominantemente localizada nas membranas apicais do epitélio, na superfície luminal do jejuno e cólon, nos túbulos proximais do rim, indicando uma expressão polarizada consistente com um papel na detoxificação celular natural.

Nosso grupo desenvolveu um trabalho de caracterização da expressão dos genes *mdr* murinos durante a ontogenia (submetido a publicação), onde foram analisados cinco indivíduos de sete estágios de desenvolvimento (dois fetais e cinco pós-natais) em sete diferentes órgãos (baço, cérebro, fígado, glândula adrenal, intestino, rim, ovários/testículos) em duas linhagens (BALB/c e C57BL/6). Neste trabalho, observamos a ocorrência de *mdr3* na glândula adrenal e de *mdr3* e *mdr1* nos ovários. No entanto, verificamos que na grande maioria dos indivíduos analisados independentemente do órgão, a expressão de *mdr1* ocorreu concomitante a expressão de *mdr3*. A única exceção observada foi verificada na glândula adrenal de uma fêmea de 45 dias.

Vários autores têm se preocupado com o papel dos hormônios esteróides na expressão da glicoproteína P em murinos. Arceci e colaboradores, em 1988 demonstraram que nestes animais a glicoproteína P está predominantemente localizada na superfície luminal das células epiteliais secretoras do endométrio. Yang e colaboradores, em 1989, verificaram que no endométrio do útero grávido, a progesterona interage com a *Pgp* e que o efeito dos esteróides sobre o acúmulo de outras drogas estava relacionado a sua hidrofobicidade. Arceci e colaboradores, em 1990, demonstraram que a expressão de genes de resistência a múltiplas drogas no epitélio secretor do endométrio era aumentada pela combinação de estrogênio e progesterona e que no entanto, os níveis de expressão de *RNAm mdr* não parecem aumentar durante o ciclo estral normal. Pierkarz e colaboradores, em 1993, observaram que a progesterona, cujo nível é aumentado durante a gravidez, regula a atividade do promotor de *mdr1* já que este gene tem um elemento responsivo a progesterona no seu primeiro éxon não traduzido. Altuvia e colaboradores, também em 1990, verificaram a importância de *mdr1* na secreção de hormônios esteróides na glândula adrenal. Kuo e colaboradores, em 1995, observaram que camundongos ovarioectemizados tratados com estradiol mais progesterona apresentavam uma taxa de transcrição de *mdr1* quase 3 vezes maior que os não tratados mas salientaram que as condições experimentais não foram suficientemente estridentes para distinguir entre as seqüências altamente similares de *mdr1* e *mdr3*.

Assim, neste trabalho temos como objetivo verificar a ocorrência de padrões diferenciais de expressão das isoformas *mdr* nas diferentes fases do ciclo estral e sob estímulo hormonal.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Análise da expressão dos genes *mdr* nas diferentes fases do ciclo estral (proestro, estro e diestro):

Foram utilizados sete órgãos (baço, cérebro, fígado, glândula adrenal, intestino, rim, ovários) de cinco camundongos BALB/c fêmeas adultas (3 a 6 meses) identificadas com cada uma das fases. Estas fêmeas foram mantidas no Biotério Central do Instituto de Ciências Básicas de Saúde da UFRGS em condições adequadas de temperatura e fotoperíodo onde receberam ração e água.

Análise do efeito dos hormônios esteróides na expressão dos genes *mdr* :

Foram utilizadas 21 fêmeas adultas também da linhagem BALB/c provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

Métodos

Para identificação da fase do ciclo estral:

Cada fêmea teve, durante o período de uma semana, as fases do seu ciclo estral (proestro, estro, diestro) acompanhadas duas vezes ao dia. A secreção vaginal foi obtida em cada caso através de dois métodos: a) raspagem junto a abertura vaginal e b) sucção com aspiração do fluido em suspensão. As amostras obtidas através dos dois métodos foram distendidas em lâmina histológica e preparadas e coradas com Hematoxilina de Harris (Knobil & Neil, 1994).

Consideramos uma amostra identificada em relação a fase do ciclo conforme os tipos de células presentes e quando os resultados obtidos através das duas formas de coleta foram coincidentes. Utilizamos cinco fêmeas para cada fase do ciclo e imediatamente após a identificação, os animais foram sacrificados e os sete órgãos foram removidos sob condições estéreis para posterior extração de RNA e análise da expressão de *mdr*.

Tratamento hormonal:

Os animais foram ovariectemizados bilateralmente sobre anestesia de éter e foram deixados em recuperação por doze dias antes do começo dos tratamentos. Os hormônios foram comprados da *Sigma Chemical Company (St Louis, MO)*, preparados com etanol e salina (soro fisiológico) e injetados intraperitonealmente. Uma dose *priming* de 100ng/100µl de 17β estradiol foi dada por dois dias consecutivos. As injeções subsequentes de hormônios foram iniciadas após três dias da última aplicação da dose *priming*. Os animais foram separados em três grupos com 5 indivíduos cada e tratados, diariamente, durante cinco dias com 20ng/100µl de 17β estradiol, 20ng/100µl de 17β estradiol com 500µg/100µl de progesterona e com 500µg/100µl de progesterona sozinha. O grupo controle (6 indivíduos) recebeu injeções de salina.

Os 21 camundongos utilizados foram sacrificados oito horas após a última injeção e seu RNA total foi, então, extraído para a análise dos úteros quanto a detecção ou não das isoformas *mdr*.

Extração de RNA:

O RNA total foi extraído de cada órgão com *TRIZol* (*Life Technologies, Gaithersburg, MD*), de acordo com instruções do fabricante. Os órgãos foram homogeneizados e *TRIZol* foi adicionado; a suspensão foi homogeneizada e clorofórmio foi adicionado. A mistura foi centrifugada e à fase aquosa foi adicionado isopropanol para a precipitação do RNA. O RNA foi lavado com etanol 75% e suspenso em água tratada com dietilpirocarbonato (*DEPC, Sigma, St Louis, MO*) e estocado à 20°C até ser usado.

A integridade do RNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio.

Síntese de cDNA:

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total com *Bulk First Strand cDNA Reaction Mix kit* (*Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK*). A reação continha 5µl da mistura *Bulk First Strand cDNA Reaction Mix*, 1µl da mistura de DTT, 1µl do *primer* pd(N)6 de 0.2 mg/ml, 6µl de água tratada com DEPC e 2µl do RNA total, adicionada em um tubo de microcentrífuga. Depois de incubar por 90 minutos a 37°C, a reação foi incubada a 90°C por cinco minutos e estocado à 20°C até o uso.

Amplificação via PCR :

Primers específicos para as três isoformas do gene *mdr* murino (*mdr1*, *mdr2* e *mdr3*) foram desenhados de acordo com Vollrath e colaboradores, (1994). As seqüências dos diferentes *primers* estão apresentadas a seguir:

mdr1 - 5' TGCTTATGGATCCCAGAGTGAC 3' e 5' TTGGTGAGGATCTCTCCGGCT 3';

mdr2 - 5' CTCGTTAACATGCAGACAGCAG 3' e 5' GACCAGGGAGAACATGTTACAC 3';

mdr3 - 5' AGCTATCACGGACAACATCTCC 3' e 5' TGTCCGCTCTTCACCTTCAGAT 3'.

Como controle para o cDNA foram utilizados *primers* específicos para RNA ribossômico com a seguinte seqüência: 28S 5' GAAAGATGGTGAACATATGCC 3' e 5' TTACCAAAAGTGGCCCACTA 3' conforme descrito em Muller e colaboradores, (1995).

A reação de PCR continha 0,5µl de dNTP 10mM; 1 unidade de Taq polimerase (CENBIOT, Porto Alegre, Brasil); 125 ng de cada *primer* específico, totalizando um volume de 25µl. As reações de PCR seguiram o seguinte protocolo: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por dois minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 61°C por 45 segundos e 72°C por um minuto, finalizando com um ciclo de 72°C por 7 minutos.

A verificação da expressão foi feita em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

Análise de dados referentes ao ciclo estral:

Os dados foram agrupados de acordo com a amplificação negativa ou positiva (ausência ou presença de expressão no gel de uma banda específica entre 300 e 400 pb) em cada órgão de cada indivíduo analisado. Os resultados para as fases do ciclo estral foram analisados de acordo com dois coeficientes de similaridade (Sneath & Sokal, 1973), os quais podem ser expressos em porcentagem.

O coeficiente de Combinação Simples (S_{SM}) é baseado tanto em concordâncias positivas quanto negativas.

O coeficiente de Similaridade de Jaccard (S_J), entretanto, não considera concordâncias negativas, menciona similaridade somente quanto à expressão do gene.

O resultado (expressão ou não expressão) obtido para cada órgão de cada indivíduo foi comparado com aquele obtido para o mesmo órgão de cada um dos quatro outros indivíduos do mesmo estágio do ciclo estral. Assim, para cada órgão individual, um índice médio de associação com o mesmo órgão de outro indivíduo de mesma fase foi calculado.

Esses índices foram, então, usados para calcular o valor médio de S_{SM} e de S_J para cada órgão em cada fase do ciclo.

RESULTADOS

Análise da expressão das isoformas *mdr* durante o ciclo estral:

Para as três fases do ciclo (proestro, estro e diestro) foram analisados os seguintes órgãos: baço, cérebro, fígado, glândula adrenal, intestino, rim e ovário. Com exceção da glândula adrenal e do ovário, para os demais órgãos, a fase do ciclo estral pareceu não interferir na expressão dos genes *mdr*. A expressão nestes órgãos foi um tanto aleatória.

A tabela 2 mostra os resultados obtidos quanto a presença ou ausência das diferentes isoformas em cada uma das cinco fêmeas analisadas em cada estágio para glândula adrenal e ovário e a tabela 3, os coeficientes de similaridade médios (S_{SM} e S_J) obtidos entre as fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral.

Tabela 2: Presença (sinal +) ou ausência (sinal -) de expressão das isoformas *mdr* (*mdr1*, *mdr2* e *mdr3*) nos órgãos glândula adrenal e ovários em 5 indivíduos fêmeas nas diferentes fases (proestro, estro e diestro) do ciclo estral.

		Proestro		Estro		Diestro	
		Adrenal	Ovários	Adrenal	Ovários	Adrenal	Ovários
1	<i>mdr1</i>	+	+	-	-	+	-
	<i>mdr2</i>	-	-	-	+	-	-
	<i>mdr3</i>	-	+	-	+	+	+
2	<i>mdr1</i>	+	+	+	-	-	+
	<i>mdr2</i>	-	-	+	-	-	+
	<i>mdr3</i>	-	+	+	+	-	+
3	<i>mdr1</i>	+	+	-	-	+	-
	<i>mdr2</i>	-	+	-	-	+	-
	<i>mdr3</i>	-	-	-	-	+	+
4	<i>mdr1</i>	+	+	-	-	+	-
	<i>mdr2</i>	+	+	-	-	-	+
	<i>mdr3</i>	+	+	+	+	+	+
5	<i>mdr1</i>	+	+	+	+	-	-
	<i>mdr2</i>	-	+	-	+	-	-
	<i>mdr3</i>	+	+	+	+	-	+

Tabela 3: Coeficientes de similaridade médios das isoformas *mdr* na glândula adrenal e nos ovários em proestro, estro e diestro.

		Proestro		Estro		Diestro	
		Adrenal	Ovários	Adrenal	Ovários	Adrenal	Ovários
<i>mdr1</i>	S _{SM}	1	1	0,4	0,6	0,4	0,6
	S _J	1	1	0,2	0	0,3	0
<i>mdr2</i>	S _{SM}	0,6	0,4	0,6	0,4	0,6	0,4
	S _J	0	0,3	0	0,1	0	0,1
<i>mdr3</i>	S _{SM}	0,4	0,6	0,4	0,6	0,4	1
	S _J	0,2	0,6	0,3	0,6	0,3	1
Σ	S _{SM}	0,67	0,67	0,47	0,53	0,47	0,67
	S _J	0,4	0,63	0,17	0,23	0,2	0,37

Observamos que na glândula adrenal independentemente da fase do ciclo estral *mdr2* foi uma isoforma de rara ocorrência, expressando-se em uma fêmea de cada fase. Todas as fêmeas analisadas durante o proestro expressaram *mdr1* (S_{SM} = S_J = 1), e nesta fase fêmeas puderam expressar *mdr1* sem a expressão concomitante de *mdr3*.

Com relação aos ovários, observamos que independentemente da fase do ciclo estral, *mdr3* foi a isoforma mais frequentemente observada. No entanto, quando analisamos as diferentes fases, observamos para *mdr1* uma similaridade devida a expressão gênica entre as fêmeas analisadas de 100% no proestro e 0% em estro e diestro. A isoforma *mdr2* foi a de mais rara ocorrência neste órgão em todas as fases analisadas. Foi possível observar a expressão de *mdr1* sem a expressão concomitante de *mdr3*.

Análise da expressão das isoformas *mdr* no útero de camundongos tratados com hormônios esteróides:

Seis animais tiveram a expressão das isoformas *mdr* avaliadas no útero sem adição de estímulo hormonal. Três deles eram ovarioctemizados e três não (tabela 4). Pudemos detectar a expressão de *mdr3* em duas das fêmeas ovarioctemizadas. Para as demais fêmeas analisadas não detectamos qualquer isoforma ativa.

Tabela 4: Expressão das isoformas *mdr* em três úteros de camundongos ovarioctemizados e três úteros de camundongos não ovarioctemizados tratados com salina (grupo controle).

	Úteros ovarioctemizados			Úteros não ovarioctemizados		
	1	2	3	4	5	6
<i>mdr1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>mdr2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>mdr3</i>	+	+	-	-	-	-

Animais tratados com estradiol (tabela 5) não expressaram qualquer isoforma ativa.

Tabela 5: Expressão das isoformas *mdr* em cinco úteros de camundongos fêmeas ovariectomizados tratados com estradiol.

	Úteros ovariectomizados com estradiol				
	1	2	3	4	5
<i>mdr1</i>	-	-	-	-	-
<i>mdr2</i>	-	-	-	-	-
<i>mdr3</i>	-	-	-	-	-

Em relação aos animais tratados com progesterona (tabela 6) verificamos para o útero que todas as fêmeas expressaram *mdr3*, quatro de cinco, *mdr2* e duas de cinco *mdr1*; nestes casos com expressão concomitante de *mdr3*.

Tabela 6: Expressão das isoformas *mdr* em cinco úteros de camundongos fêmeas ovariectomizados tratados com progesterona.

	Úteros ovariectomizados com progesterona				
	1	2	3	4	5
<i>mdr1</i>	-	+	-	+	-
<i>mdr2</i>	+	+	+	+	-
<i>mdr3</i>	+	+	+	+	+

As fêmeas tratadas com estrogênio mais progesterona (tabela 7) apresentaram ampla expressão das três isoformas (quatro em cinco *mdr3* e três em cinco *mdr1* e *mdr2*), sendo que em uma delas observamos a expressão de *mdr1* sem a expressão das outras isoformas.

Tabela 7: Expressão das isoformas *mdr* em cinco úteros de camundongos fêmeas ovariectomizados tratados com estradiol e progesterona.

	Úteros ovariectomizados com estradiol e progesterona				
	1	2	3	4	5
<i>mdr1</i>	+	-	-	+	+
<i>mdr2</i>	-	+	+	+	-
<i>mdr3</i>	+	+	+	+	-

DISCUSSÃO

A secreção de hormônios esteróides vem sendo associada nos últimos dez anos a expressão da glicoproteína P, com ênfase especial a expressão de *mdr1*.

Em roedores, o ciclo estral dura em média de 4 a 5 dias. A primeira etapa do ciclo é conhecida como proestro (proliferação). Esta fase é caracterizada citologicamente pela predominância de células epiteliais nucleadas, as quais apresentam núcleos facilmente visíveis. Estas aparecem em conjuntos (*clusters*) ou individualmente. Tanto o estradiol como a progesterona apresentam picos de secreção durante esta fase. Este período dura em média 12 horas. A fase seguinte é denominada estro (receptividade sexual) e tem uma duração média de 26 horas. Citologicamente, o estro se caracteriza por um grande número de células epiteliais escamadas, que ocorrem em *clusters* e têm formas irregulares. O período seguinte, diestro (às vezes dividido em diestro I e diestro II) corresponde a fase de repouso sexual relativo, onde as secreções ovarianas preparam o trato reprodutivo para receber o óvulo recém fertilizado e se a fertilização não ocorre, o animal retorna para o proestro. O diestro dura de dois dias e meio a três dias e citologicamente é caracterizado pela predominância de pequenos leucócitos intercalados por algumas células epiteliais nucleadas ou células epiteliais escamadas (Knobil & Neil, 1994).

Em trabalho anterior enviado para publicação (*Mdr gene expression during the murine ontogeny*) a isoforma *mdr1* apresentou uma particularidade. Considerando-se todos os órgãos analisados em todos estágios, a detecção de *mdr1* sem a expressão simultânea de *mdr3* foi verificada em apenas uma fêmea de 45 dias na glândula adrenal. Neste mesmo trabalho, observamos que 75% da similaridade verificada para fêmeas adultas na glândula adrenal era devida a ausência de expressão de *mdr1*. No entanto, quando as fêmeas foram analisadas de acordo com as diferentes fases do ciclo estral observamos que todas as fêmeas analisadas expressaram *mdr1* na fase de proestro tanto na glândula adrenal quanto nos ovários e que a expressão de *mdr1* independente de *mdr3* passou a ser um evento comum.

De acordo com Croop e colaboradores, 1989, a glândula adrenal apresenta altas concentrações de *mdr1*. Os resultados obtidos neste trabalho, embora não sejam quantitativos, sugerem que na maior parte do tempo do ciclo (estro e diestro), a glândula adrenal seja pobre na expressão de qualquer isoforma *mdr* em fêmeas e que na fase de proestro, devido a síntese de esteróides, a transcrição de RNAm *mdr1* seria aumentada. Isto explicaria também o fato de Bradley e colaboradores, em 1988, não terem detectado *mdr1* na glândula adrenal de fêmeas de hamster chinês. A rara ocorrência de *mdr1* em estro e diestro estaria mais provavelmente relacionada a uma função de detoxificação auxiliar a isoforma *mdr3* e não relacionada à secreção de hormônios esteróides.

A expressão de *mdr1* em proestro possivelmente está relacionada a síntese de hormônios esteróides que ocorre neste dois órgãos (adrenal e ovários). Corroborando nossos dados, Altuvia e colaboradores em 1990, trabalhando com uma linhagem de células de glândula adrenal murina, verificaram que um aumento na biossíntese de esteróides, estimulada por ACTH resultava em um aumento no nível de expressão de RNAm *mdr1*.

Em relação aos ovários, embora *mdr3* foi a isoforma mais freqüentemente observada, independentemente da fase do ciclo estral, este órgão apresentou para *mdr1* em proestro S_j de 100% e nas demais fases, S_j de 0% , evidenciando expressão diferencial desta isoforma. Além disto foi possível observar também para o ovário em proestro a ocorrência da expressão de *mdr1* sem expressão concomitante de *mdr3*.

A associação entre a presença da glicoproteína P e a secreção de hormônios esteróides foi primeiramente registrada por Arceci e colaboradores, em 1988, os quais registraram que esta proteína era localizada predominantemente na superfície luminal das células epiteliais do endométrio. No ano seguinte, foi constatado que a progesterona interage com a glicoproteína P no endométrio de fêmeas grávidas (Yang e colaboradores, 1989). Em nossa metodologia, repetimos as condições experimentais utilizadas por Arceci e colaboradores (1990) em relação aos estímulos hormonais. Porém a análise de *RNA* de *mdr* no útero foi determinada através de hibridização *in situ* por aqueles autores. Em nosso trabalho verificamos que o útero tendeu a não expressar genes *mdr* e quando o fez expressou preferencialmente *mdr3*. Fêmeas tratadas com estrogênio sozinho não expressaram *RNA* de *mdr*, resultado idêntico ao observado por Arceci e colaboradores no trabalho já referido.

Em relação ao estímulo produzido pela progesterona, ao contrário daqueles autores, verificamos que todas as fêmeas passaram a expressar isoformas *mdr*. Curiosamente neste caso, a isoforma *mdr3* foi detectada em todas as fêmeas. Pierkarz e colaboradores, em 1993, demonstraram que a progesterona, cujo nível é aumentado durante a gravidez, regula a atividade da isoforma *mdr1*, porque esta isoforma apresenta em sua região promotora, um elemento responsivo a este hormônio. A atuação de *mdr1* na secreção de hormônios esteróides pela glândula adrenal também foi demonstrada por Altuvia e colaboradores em 1990. De acordo com Mallick & Horwitz, (1997), o aumento da expressão de *mdr1* depende em grande parte da ação da progesterona.

Nas fêmeas estimuladas com progesterona e estradiol, simulando uma situação semelhante a encontrada durante a gravidez, detectamos em um dos úteros analisados a expressão de *mdr1* sem a expressão concomitante de *mdr3*. Isso concorda com Croop e colaboradores que haviam, em 1989, verificado através de *Northern Blot* que somente *mdr1* era encontrado no útero gestacional e embora Arceci e colaboradores (1990) acreditassem que *mdr1* deveria ser a isoforma detectada em seu experimento, afirmaram que as sondas por eles utilizadas não discriminavam entre os diferentes genes *mdr*. De acordo com Rao e colaboradores, em 1994, o produto do gene *MDR1* humano foi observado em altos níveis em tecidos que sintetizam hormônios esteróides. Estes autores verificaram atividade ATPásica da Pgp com diferentes esteróides. Concluíram que a progesterona era o mais efetivo indutor desta atividade e que embora β -estradiol também tivesse este efeito, era requerido em concentrações maiores. É interessante observar que, enquanto humanos apresentam a isoforma *MDR1* executando as funções de detoxificação e de transporte de esteróides, os camundongos apresentam duas isoformas as quais são atribuídas funções diferentes. *Mdr3* é referido na literatura (Yang e cols., 1989 e Gottesman & Pastan, 1993) como mais efetiva na detoxificação e *mdr1* como isoforma associada ao transporte de hormônios esteróides.

Pierkarz e colaboradores, em 1993, discutiram que hormônios esteróides que participam de regimes quimioterápicos podem afetar a expressão da Pgp especialmente em tumores que expressam receptores para hormônios esteróides. Tumores de endométrio não respondem bem a agentes antitumorais e são geralmente inerentemente resistentes a drogas. Pacientes cujos tumores apresentam baixa concentração de receptores de progesterona demonstram melhor resposta a agentes quimioterápicos do que os pacientes com concentrações mais altas de receptores. Novamente, cabe lembrar que pacientes não expressam *mdr1* murino e sim o *MDR1* humano, equivalente ao *mdr3* murino. Nossos dados levam a pensar que a progesterona estaria relacionada a indução de *mdr*, embora de alguma forma *mdr1* pudesse se expressar independentemente de *mdr3* somente sob ação hormonal.

Lee e colaboradores, em 1998, verificaram que além de induzir a expressão de Pgp, a progesterona pode se ligar a esta proteína, antagonizando o transporte de outros substratos por competição, e ser transportada pela mesma, embora este transporte seja dificultado pela alta afinidade deste hormônio pela Pgp.

Os hormônios esteróides, principalmente a progesterona atuam na indução de expressão de Pgp e teriam importância mais acentuada em órgãos produtores de esteróides, porque nestes a glicoproteína P participaria da secreção destes hormônios. Durante a gravidez, a alta expressão de Pgp no útero poderia ser explicada pela importância do transporte de diferentes substratos durante a gestação, importantes para o desenvolvimento da placenta e do embrião. Interessantemente, Spatz e colaboradores, em 1986, verificaram que verapamil, assim como a progesterona, um inibidor da função transporte do produto do gene *mdr*, tem como efeito retardo de crescimento e morte embrionária no início da gestação. Segundo estes autores, este efeito poderia ser resultado da inibição da função de transporte da glicoproteína P. Outra possibilidade, seria que no endométrio, a glicoproteína P teria um papel na manutenção de altos níveis locais de progesterona, que poderiam ser necessários para a continuidade da gravidez.

Nossos resultados sugerem que as isoformas *mdr1* e *mdr3* em murinos não têm funções restritivas. Da mesma forma que *mdr3* é uma isoforma mais eficiente na detoxificação de xenobióticos, *mdr1* talvez seja simplesmente mais eficiente que *mdr3* na secreção de hormônios esteróides. Alternativamente, esta isoforma pode ser preferencialmente transcrita sob estímulo hormonal. É interessante notar também que os três genes *mdr* em murinos estão localizados *in tandem* no cromossomo 5 (*mdr3*, *mdr1*, *mdr2*) e que a transcrição de mais de uma isoforma a partir de *mdr3* talvez pudesse ser um evento comum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTUVIA, S.; STEIN, W. D.; GOLDENBERG, S.; KANE, S. E.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M. Targeted of mouse *mdr1b* gene reveals that steroid hormones enhance *mdr* gene expression. **The journal of biological chemistry** **268** (36): 27127-27132. 1990.
- ARCECI, R. J.; BAAS, F.; RAPONI, R.; HORWITZ, S. B.; HOUSMAN, D.; CROOP, J. M. Multidrug Resistance Genes expression is controlled by steroid hormones in the secretory epithelium of the uterus. **Molecular Reproduction and Development** **25**: 101-109. 1990.
- ARCECI, R. J.; CROOP, J. M., HORWITZ, S. B.; HOUSMAN, D. The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium. **Proceedings of National Academics of Sciences United States of America** **85**: 4350-4354. 1988.
- BALZI, E. & GOFFEAU, A. Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta** **1187**: 152-162. 1994.
- BASCO, L. K.; DE PECOULAS, P. E.; LE BRAS, J.; WILSON, C.M. *Plasmodium falciparum*: Molecular characterization of multidrug-resistant cambodian isolates. **Experimental Parasitology** **82**: 97-103. 1996.
- BORST, P.; SCHINKEL, A. H.; SMIT, J. J. M.; WAGENAAR, E.; VAN DEEMTER, L.; SMITH, A. J.; EIJDENS, E. W. H. M.; BAAS, F.; ZAMAN, G. J. R. Classical and novel forms of Multidrug Resistance and the physiological functions of P-glycoproteins in mammals. **Pharmacology & Therapeutics** **60**: 289-299. 1993.
- BRADLEY, G.; GURANKA, P.F.; LING, V. Mechanisms of Multidrug Resistance. **Biochimica et Biophysica Acta** **948**: 87-128. 1988.
- BUSCHMAN, E. & GROS, P. The inability of the mouse *mdr2* gene to confer Multidrug Resistance is linked to reduced drug binding to the protein. **Cancer Research** **54**: 4892-4898. 1994.
- CHEN C. J.; CHIN J. E.; UEDA K.; CLARK D. P.; PASTAN I.; GOTTESMAN M. M.; RONINSON I. B. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. **Cell** **47**(3):381-389. 1986.
- CROOP, J. M.; RAYMOND, M.; HABER, D.; DEVAULT, A.; ARCECI, R. T.; GROS, P.; HOUSMAN, D. E. The three mouse Multidrug Resistance (*mdr*) Genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. **Molecular and Cellular Biology**: 1346-1350. 1989.

- DI PIETRO, A.; DAYAN, G.; CONSEIL, G.; STEINFELS, E.; KRELL, T.; TROMPIER, D.; BAUBICHON-CORTAY, H.; JAULT, J.-M. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 32: 925-939. 1999.
- DUDLER, R. & HERTIG, C. Structure of a mdr-like gene from *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry** 267(9): 5882-5888. 1992.
- FOJO, A. T.; UEDA, K.; SLAMON, D. J. Expression of a Multidrug resistance gene in human tumors and tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 84: 265-269. 1987.
- GOTTESMAN, M. M. & PASTAN, I. Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by Multidrug Transporter. **Annual Review of Biochemistry** 62: 385-427. 1993.
- GROS, P.; CROOP, J.; HOUSMAN, D. Mammalian Multidrug Resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. **Cell** 47: 371-380. 1986.
- HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual Review Cell Biol** 8:67-113. 1992.
- JONGSMA, A. P. M.; SPENGLER, B. A.; VAN DER BLIEK, A. M. Chromosomal localization of three genes coamplified in the Multidrug Resistance CHr C5 Chinese hamster ovary cell line. **Cancer Research** 47(26): 2875-2878. 1987.
- KESSEL, D.; BOTTERILL, V.; WODINSKY, I. Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. **Cancer Research** 28: 938-941. 1968.
- KESSEL, D.; HALL, T. C.; ROBERTS, D. Uptake as a determinant of the methotrexate response in mouse leukemia. **Science** 150: 752-754. 1965.
- KNOBIL, E. & NEIL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. Raven Press Ltd. New York. 1994.
- KUO, M. T.; JULIAN, J.; HUSAIN, F.; SONG, R.; CARSON, D.D. Regulation of Multidrug resistance gene mdr1b/mdr1 expression in isolated mouse uterine epithelial cells. **Journal of Cellular Physiology** 164: 132-141. 1995.
- LEE, G. Y.; CROOP, J. M.; ANDERSON, E. Multidrug resistance gene expression correlates with progesterone production in dehydroepiandrosterone-induced polycystic and equine chorionic gonadotropin-stimulated ovaries of prepubertal rats. **Biology of Reproduction** 58: 330-337. 1998.

- LEWIS, K. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. **Trends in Biochemical Science** **19**:119-123. 1994.
- MALLICK, S. & HORWITZ, S. B. Transcriptional regulation of the murine multidrug resistance gene *mdr1b* by progesterone occurs via an indirect mechanism. **DNA and Cell Biology** **16** (7): 807-818. 1997.
- MARTINSSON, T. & LEVAN, G. Localization of the Multidrug resistance associated 170 kDa P-glycoprotein gene to mouse chromosome 5 and to homogeneously staining regions in Multidrug resistance mouse cells by in situ hybridization. **Cytogenetics and Cell Genetics** **45**(2): 99-101. 1987.
- MULLER, C.; GOUBIN, F.; FERRANDIS, E.; CORNIL-SCHARWITZ, I.; BAILLY, J. D.; BORDIER, C.; BENARD, J.; SIKIC, B. I.; LAURENT, G. Evidence for transcriptional control of human MDR1 gene expression by verapamil in Multidrug resistance leukemic cells. **Molecular Pharmacology** **47**: 51-56. 1995.
- NG W. F.; ZASTAWNY, R. L.; VEINOT-DREBOT, L.; LING, V. Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. **Molecular and cellular biology** **9**: 1224-1232. 1989.
- OUDE ELFERINKE, R. P.; OTTENHOFF, R.; VAN WIJALAND, M. Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol in mice with reduced expression of *mdr2* P-glycoprotein. **Journal of Lipids Research** **37**: 1067-1075. 1996.
- OUELLETE, M.; LÉGARÉ, D.; PAPADOPOULOU, B. Microbial multidrug-resistance ABC transporters. **Molecular Mechanisms** **2**(10): 407-411. 1994.
- PASTAN, I. & GOTTESMAN, M. Multiple- drug resistance in human cancer. **New England Journal of Medicine** **316**: 1388- 1393. 1987.
- PIERKARZ, R. L.; COHEN, D.; HORWITZ, S. B. Progesterone Regulates the Murine Multidrug Resistance *mdr1b* Gene. **The Journal of Biological Chemistry** **268** (11): 7613-7616. 1993.
- RAO, U. S.; FINE, R. L.; SCARBOROUGH, G. A. Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human P-glycoprotein. **Biochemical Pharmacology** **48**(2): 287-292. 1994.
- SMIT, J. J. M.; SCHINKEL, A. H.; MOL, C. A. A. M.; MAJOOR, D.; MOOI, W. J.; JONGSMA, A. P. M.; LINCKE, C. R.; BORST, P. Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. **Laboratory Investigation** **71**(5): 638-649. 1994.
- SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification**.. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 1973.

- SPATZ, R. J.; PILLALAMARI, E. D.; DIAB, G. M.; ABADIR, A. R.; GINTAUTAS, J. Verapamil effect on fetus in rat. **Proceedings of the West Pharmacology Society** 29: 319-320. 1986.
- TEETER, L. D.; ATSUMI, S.; SEM, S. DNA amplification in Multidrug cross-resistant Chinese hamster ovary cells : molecular characterization and cytogenetic localization of the amplified DNA. **Journal of Cell Biology** 103: 1159-1166. 1986.
- TRENT, J. M. & WITKOWSKI, C. M. Classification of the chromosomal assignment of the human P-glycoprotein MDR gene: possible coincidence with the cystic fibrosis and C-met oncogene. **Cancer Genetics and Cytogenetics** 26(1): 187-190. 1987.
- VAN DER BLIEK A. M.; BAAS F.; TEN HOUTE DE LANGE T.; KOOIMAN P. M.; VAN DER VELDE-KOERTS T.; BORST P. The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. **EMBO Journal** 6(11):3325-31. 1987.
- VOLRATH, V.; WIELANDT, A. M.; ACUNA, C.; DUARTE, I.; ANDRADE, L.; CHIANALE, J. Effect of Colchicine and heat shock on Multidrug resistance gene and P-glycoprotein expression in rat liver. **Journal of Hepatology** 21: 754-763. 1994.
- YANG, C-P. H.; COHEN, D.; GREENBERGUER, L. M.; HSU, S. I-H.; HORWITZ, S. B. Differential transport properties of two *mdr* gene products are distinguished by progesterone. **Journal of Biological Chemistry** 265(18): 10282-10288. 1989.