

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

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Papel da MRP1/Bomba GS-X na regulação do
potencial redox celular, e a influência do
estado redox celular na expressão e atividade
da MRP1/bomba GS-X**

Angela Kolberg

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Fisiologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor.**

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

**Porto Alegre
2005**

**Obrigado meu Deus, que na
sua infinita bondade me
impede de esmorecer**

AGRADECIMENTOS

Não existem palavras que expressem suficiente agradecimento à minha família... meu marido Carlos, e meus filhos Carolina e Wagner, que estiveram sempre ao meu lado, compartilhando vitórias e derrotas, rindo com minhas alegrias, amparando-me nas dificuldades, e, acima de tudo demonstrando paciência inesgotável, ao longo destes tantos anos.

Um agradecimento especial ao Professor Doutor Paulo Ivo Homem de Bittencourt Junior, meu orientador.

Gostaria de agradecer ainda as Professoras Roselis Silveira Martins da Silva, Maria Flávia Marques Ribeiro e Ilma Simoni Brum da Silva, pelo apoio e orientação, bem como pelo empréstimo de material.

Em particular meus agradecimentos a duas pessoas especiais, minhas alunas de iniciação científica Juliane Rossato e Bibiana Sgorla de Almeida, que dividiram angústias e multiplicaram alegrias, além das noites em claro.

Obrigada, também, Thiago Gomes Heck, pela ajuda na manutenção de várias linhagens celulares que mantivemos em cultura

Em especial, também, agradecer a Daiane da Rocha Janner, pelas eletroforeses, protocolo de incorporação de Timidina e sua infundável disponibilidade de ajudar a todos e a qualquer hora, mesmo, muitas vezes, em detrimento de seu próprio trabalho.

E vale citar todo o grupo atuante no nosso laboratório, que, de uma forma ou outra, trabalha em conjunto, oferecendo, aqui e ali, sua colaboração: Maurício da Silva Krause, Elza Maria Santos da Silveira, Mariana Ferraz Rodrigues, Daniela Mariano da Rocha Bandeira de Mello, Damiana da Rocha Vianna, Lino Pinto de Oliveira Junior, João Antônio Bonatto Costa, Alexandre Ramos Lazzarotto, Alexandre Maslinkiewicz, Denise Jacques Lagranha.

Meus agradecimentos se estendem também à Dona Ritinha, nossa incansável colaboradora.

Nossos agradecimentos à Coordenação da Pós-Graduação e, em particular à Secretaria da mesma.

Este trabalho foi financiado pela 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 Editais emergenciais) e Ministério de Ciência e Tecnologia/Ministério de Educação PRONEX (168/97) porquanto gostaria também de prestar meus agradecimentos pelo apoio.

“Somente em Deus, ó minha alma, espera silenciosa: dele vem minha salvação. Só ele é minha rocha... o meu alto refúgio...” (Salmo 62:1) **Obrigada Mãe.**

SUMÁRIO

<i>AGRADECIMENTOS</i>	<i>iii</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	<i>vi</i>
<i>RESUMO</i>	<i>ix</i>
<i>INTRODUÇÃO</i>	<i>01</i>
<i>OBJETIVOS</i>	<i>28</i>
<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i>	<i>30</i>
<i>RESULTADOS</i>	<i>60</i>
<i>DISCUSSÃO</i>	<i>92</i>
<i>CONCLUSÃO</i>	<i>107</i>
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>111</i>
<i>APÊNDICE FINAL</i>	<i>x</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xxxvii</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AINES	Antiinflamatórios não-esteróides
ATPase	adenosina trifosfatase
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
β ME	Beta-mercaptoetanol
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.....	ditiotreitól
EET	ácido epoxieicosatrienóico
EGF	fator de crescimento epidérmico
EPA	ácido eicosapentenóico
EPOX	epoxigenase
ETYA	ácido eicosatetraenóico
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.....	γ -glutamilcisteína sintetase
Hep-2.....	carcinoma de laringe humano

HETE.....	ácido hidróxi-eicosatetraenóico
HPETE.....	ácido hidroperóxi-eicosatetraenóico
HPLC.....	High Performance Liquid Chromatography
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
LOX.....	lipoxigenase
LPS.....	lipolissacarídeo
LT.....	leucotrieno
LX.....	lipoxina
MAPK quinase.....	quinase ativada por mitógenos
MAPKK.....	MAP quinase quinase
MDR.....	resistência múltipla a drogas
MRP.....	proteína de multiresistência 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
PGD.....	prostaglandina D
PGE.....	prostaglandina E
PGH.....	prostaglandina H
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
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SFB.....	soro fetal bovino
TAG.....	triacilgliceróis
TBA.....	ácido 2-tiobarbitúrico
TBHP.....	hidroperóxido de <i>t</i> -butila
TCA.....	ácido tricloroacético
TE	tampão de ensaio
TEM.....	tampão tris-EDTA-NaCl
TGF.....	fator de crescimento transformante
TNF.....	fator de necrose tumoral
TXA	tromboxana A
U.....	unidades de atividade enzimática
UI.....	unidades internacionais

RESUMO

Uma das complicações que levam o paciente terminal de câncer à morte é a imunossupressão. Por sua vez, a superprodução de prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) no plasma desses indivíduos é um fator de risco para depressão imunológica já que as CP-PGs bloqueiam inúmeras interações entre células imunológicas. Estudos de nosso grupo revelaram que células tumorais apresentam alta atividade da ATPase bomba GS-X/MRP que exporta conjugados sulfidríla, inclusive CP-PG na forma de S-conjugados de glutathiona. A glutathiona é uma das, ou a mais importante substância para manutenção do estado redox celular. Como o acúmulo de proteínas de choque térmico (HSP) induzidas pelas CP-PGs em células imunológicas é indicativo do grau de estresse ao qual cada célula está sendo submetida, neste trabalho, buscamos determinar qual a influência da MRP1/bomba GS-X na presença de estresse celular causado por desbalanço redox e os parâmetros de estresse celular necessários para influenciar a expressão e/ou a atividade da MRP1/bomba GS-X. Nossos resultados sugerem que linfócitos respondem bem a transfecção por eletroporação com o gene da MRP1/bomba GS-X e que a presença desta proteína possa conferir resistência ao tratamento com substâncias eletrofílicas de maneira a ajustar o estado redox celular mais rapidamente, o que impede o efeito citotóxico destas substâncias.

APÊNDICE FINAL

Reagentes e Soluções

PBS - Phosphate-buffered saline, NaCl 136,8 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 0,9 mM e Na₂HPO₄ 6,4 mM em água milliQ, pH 7,4.

Solução Hanks I - NaCl 136,8 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, NaHCO₃ 12 mM, HEPES 1 mM, EGTA 1 mM e albumina bovina (BSA, fração V, Sigma) 2 g/l em água destilada. Antes da adição do BSA, a solução foi gaseificada por 10 min em corrente de carbogênio (5% CO₂/95%O₂) tendo tido o pH ajustado para 7,4 com NaOH 10 M.

Solução Hanks II - NaCl 136,8 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, NaHCO₃ 12 mM, HEPES 1 mM, CaCl₂ 1 mM, BSA 2 g/l e colagenase (de *Clostridium histolyticum*, tipo V, Sigma) 1 g/l em água destilada. Antes da adição do BSA e da colagenase, a solução foi gaseificada por 10 min em corrente de carbogênio tendo tido o pH ajustado para 7,4 com NaOH 10 M.

Solução Krebs-Henseleit - NaCl 115,0 mM, KCl 5,0 mM, NaHCO₃ 24 mM, HEPES 1 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, glicose 5,6 mM e BSA 4 g/l. Antes da adição do BSA, a solução foi gaseificada por 10 min em

corrente de carbogênio tendo tido o pH ajustado para 7,4 com NaOH 10 M.

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. Solventes grau cromatográfico para HPLC e TLC foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, DR).

Materiais para transfecção e crescimento de bactérias

Tampão Tris – Lubrol :

Tris.....	10,0mM
EDTA.....	2,0mM
βME.....	1,4mM
Lubrol.....	0,5 %
Água Milli- Q(q.s.p).....	q.s.p.

Tampão Tris –EDTA(TE):

Tris.....	10,0mM
EDTA.....	1,0mM
Água Milli-Q(q.s.p).....	100ml

Tampão ácido acético/acetato (Tampão de lise):

Ácido acético glacial.....	0,89ml
Acetato de sódio.....	2,89g
Água Milli-Q(q.s.p).....	1000ml

Tampão TBE (pH 8,3 a 8,6):

Ácido bórico.....	5,3g
Tris.....	10,8g
EDTA (5M pH8,0).....	4,0ml

Gel de Agarose (0,8%):

Agar.....	0.8g
TBE (q.s.p).....	100ml
Brometo de etídio.....	2µl de solução 10 mg/ml

Tampão de amostra para DNA:

Glicerol	50%
EDTA (pH8,0).....	1mM
Azul de bromofenol.....	0,25%
Xilenocianol FF.....	25%

Meio líquido LB, pH 7,4:

Triptona.....	10,0g
Extrato de levedura.....	5,0g
NaCl.....	5,0g

NaOH 1N.....1,0ml
Água Milli-Q(q.s.p).....1000ml

Meio Sólido LB pH 7,4:

Triptona.....10,0g
Extrato de levedura.....5,0g
NaCl.....5,0g
NaOH 1N.....1,0ml
Ágar.....15,0g

Solução de ampicilina 4mg/ml:

Ampicilina.....0,2g
PBS (q.s.p).....50,0ml

Substrato para peroxidase (para revelação de segundos-anticorpos):

DAB (diaminobenzidina).....6mg
TRIS (50mM, pH 7,6).....10ml
H₂O₂ 30%.....10µl

CDNB (1-Cl-2,4-dinitrobenzeno) 100mM:

CDNB.....202,6mg
Etanol.....10ml

Meio SOC:

Extrato de levedura.....	5g/100ml
Triptona.....	2g/100ml
NaCl.....	10mM
KCl.....	2,5mM
MgCl ₂ . 6 H ₂ O.....	10mM
MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	10mM
C ₆ H ₁₂ O ₆	20mM

OUTROS REAGENTES ESPECÍFICOS UTILIZADOS

TEN 10x (1 litro)

- TRIS 0,5 M 60,55 g acertado o pH para 7,4 com HCl conc.
- EDTA 50 mM 18,61 g
- NaCl 1,5 M 87,66 g
- Água MilliQ q.s.p 1 litro

TEN-Tween 1x (1 litro)

- Foi diluído o TEN 10x com água MilliQ a 1:10 (100 ml de TEN + 900 ml de água)
- Foi adicionado 450 µl de Tween 20 ($\rho_{\text{Tween}20}=1,1 \text{ g/ml}$) por litro de TEN diluído

- As concentrações finais foram:

Tris	50 mM
EDTA	5 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05% (w/v)

Transfer Buffer (1 litro)

- Glicina (grau eletroforese) 39 mM 2,9 g
- Tris (grau eletroforese) 48 mM 5,8 g
- SDS (grau eletroforese) 0,037% (w/v) 370 mg
- Metanol 20% (v/v) 200 ml
- Os reagentes sólidos foram dissolvidos em cerca de 700 ml de água MilliQ sob agitação e acertado o pH para 8,3 com HCl concentrado
- O metanol foi adicionado e o volume completado para 1 litro.

"Sample Buffer"

- Água MilliQ 19,0 ml
- Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 5,0 ml final 62,5 mM
- Glicerol (grau Biol. Mol.) 4,0 ml final 10% (v/v)
- SDS 10% (w/v) 8,0 ml final 2% (w/v)
- β -Mercaptoetanol 2,0 ml final 5% (v/v)
- Azul de Bromofenol 1% (w/v) 2,0 ml final 0,05% (w/v)

Commassie Blue (1 litro)

- Água MilliQ 500 ml
- Ácido acético glacial 100 ml (final 10% v/v)
- Metanol 400 ml (final 40% v/v)
- Commassie R250 1 g (0,1% w/v)

Solução de Lise para Eletroforese (10 ml)

- SDS 100 μ l da solução a 10% (final 0,1% w/v)
- Leupeptina 4 μ l da solução 5 mg/ml em água (final 2 μ g/ml)

- Água MilliQ ...9 ml
- Agitado e conservado no freezer (-20°C)
- Foi adicionado 1 µl de solução de isopropanólica de PMSF 100 mM (concentração final 100 µM) por **ml** de solução de lise apenas no momento da homogeneização porque o PMSF é muito instável em meio aquoso.
- Foi quantificado o número de células e estimada a quantidade de proteínas (10⁷ células ~1 mg de proteína) de forma a ser obtido um homogenato a cerca de 2 mg de proteína por ml, que, quando diluído com Sample Buffer a 1:1 forneceu solução a 1 mg/ml (50 µg/50 µl nos wells).
- **Células:** foi homogeneizado o *pellet* celular e adicionada a quantidade adequada de Solução de Lise. As células foram homogeneizadas com seringa de insulina (cerca de 10x) e sonicadas. Foram, então, centrifugadas por 2 min a 15.000 x *g* e a proteína, no sobrenadante, dosada em triplicata na leitora de ELISA. Foi transferida quantidade conhecida de sobrenadante para um outro tubo (*Eppendorf*) e adicionada a mesma quantidade de Sample Buffer. Fervidas as amostras por 5 min.

Tampão de Eletrodo para Eletroforese

(Running Buffer 5x – suficiente para 12 corridas)

- Tris (grau eletroforese) 15 g
- Glicina (grau eletroforese) 72 g
- SDS (grau eletroforese) 5 g
- Os reagentes foram dissolvidos sob agitação em 1 litro de água MilliQ (o pH final deve ser 8,3). Conservado na geladeira. No momento da corrida aguardou-se que a temperatura ambiente fosse atingida antes de diluir 1:5 (80 ml + 320 de água).

Procedimentos

- 1) As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose;
- 2) As bandas foram visualizada com vermelho Ponceau e posteriormente fotografadas e digitalizadas para registro);
- 3) A membrana foi lavada com TEN-Tween até o desaparecimento das bandas;
- 4) AS membranas foram então incubadas com solução de bloqueio (Leite Molico desnatado a 5% ou BSA a 1% em TEN-Tween) 2 horas à temperatura ambiente com agitação vigorosa;
- 5) A solução de bloqueio foi removida e o primeiro anticorpo foi adicionado em solução de bloqueio (0,1 ml por cm² de membrana =

- aprox. 5 ml para minigéis em placas de petri, potes de plástico ou sacos plástico selados);
- 6) Os anticorpos para HSP70 foram incubados por 2 horas e para MRP1 foram incubados *overnight*, à temperatura ambiente sob agitação vigorosa;
 - 7) Após o devido tempo a membrana foi lavada 3 vezes com solução de bloqueio (5 ml), 10 minutos cada;
 - 8) Foi adicionado o segundo anticorpo em solução de bloqueio e incubado por 2 horas sob agitação;
 - 9) As membranas foram lavadas 3 vezes com 10 ml de TEN-Tween por 10 minutos cada;
 - 10) Foi preparada a revelação por ECL;
 - 11) Após a revelação as membranas foram digitalizadas para registro permanente
 - 12) A aquisição de dados foi feita no sistema VDS-Image Master

Preparação dos Anticorpos Utilizados

Veículo:

Incubações de 2 h: apenas tampão de bloqueio

Overnights: tampão de bloqueio com azida sódica (APENAS P/ O PRIMÁRIO)

Anticorpos secundários foram ser incubados em **NaN₃-free sols**.

Policlonais: 1:100 a 1:5000

Monoclonais SOBRENADANTES DE HIBRIDOMAS: sem diluir até 1:100

Monoclonais ASCITE DE CAMUNDONGOS: 1:1000 a 1:10.000

- mouse anti-human HSP70 (Sigma H5147; ascite) 1:1000 (5 µl em 5 ml solução de bloqueio)
- mouse anti-human MDR (Sigma P7965; ascite) 1:1000 (5 µl em 5 ml solução de bloqueio)
- mouse anti-human MRP (QCRL-1, sobrenadante de hibridoma) recomendado: 1:1000
- anticorpo secundário rabbit anti-mouse Ig (Sigma A9044) 1:100 a 1:1000

SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

Para cada amostra preparada, quantidades iguais de proteína (cerca de 30 µg, determinada pelo método Bradford, (a seguir) 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 KOLBERG e cols. (2005) adaptado de SANTORO e cols. (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 lisozima (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 película de PVC (Whatman 3MM) 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 KOLBERG e cols. (2005), adaptado de 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, foram então lavadas três vezes com água destilada até a visualização das bandas. A membrana foi então fotografada e submetidas a densitometria no equipamento (Amersham

Pharmacia Biotech) Video Documentation System de aquisição digital e processamento de imagens.

Após a aquisição da imagem, a membrana foi cuidadosamente lavada, para eliminar qualquer resíduo do Vermelho Ponceau, e mantida em 10 ml de tampão de bloqueio (blotto), sob agitação durante 2 horas.

IMMUNOBLOTTING COM SEGUNDO-ANTICORPO CONJUGADO A PEROXIDASE

TAMPÃO DE BLOQUEIO (*BLOTTO*)

- Leite Molico Desnatado a 5% (w/v): 500 mg de Leite Molico desnatado em 10 ml de TEN-Tween 20 ou BSA a 1% em TEN-Tween 20 (100 mg de BSA/10 ml de TEN-Tween)
- NaN₃-free/Phosphate-free

TAMPÃO DE BLOQUEIO para OVERNIGHTS à temperatura ambiente

- Leite Molico desnatado a 5% ou BSA 1%
- NaN₃ 0,02% (20 mg/100 mL)
- Veículo: TEN-Tween 20

SUBSTRATO PARA REVELAÇÃO DA PEROXIDASE (DAB 1,67 mM)

- 3,3',4,4'-tetraaminobifenila (= 3,3'-diaminobenzidina, DAB)
- Sigma D8001 (free base, MW 214,3) ou Sigma D5637 (tetra-HCl, FW 360,1)
- PREPARADO A FRESCO no momento da revelação!

- Dissolvido 6,01 mg de DAB-4HCl em 10 ml de Tris pH 7,6.

WESTERN BLOT PARA HSP70 E MRP COM REVELAÇÃO POR ECL

Reagentes

Foram os mesmos utilizados para Western blot para HSP70 ou MRP1 e outras proteínas de alta expressão: blotto com leite desnatado, TEN-Tween 20 e anticorpos secundários marcados com HRP (peroxidase)

Princípio

A proteína foi separada por SDS-PAGE (10% funciona muito bem) e transferida para membrana de nitrocelulose. Depois, a membrana foi incubada com o primeiro anticorpo e em seguida com o segundo anticorpo marcado com peroxidase. Adicionou-se Lumigen PS-3 (Acridan, Amersham) e peróxido de hidrogênio que desenvolve quimiluminescência é quantificada por exposição da membrana tratada a um filme de raios X ou outro específico para quimiluminescência.

Procedimento

- Células (linfócitos) foram obtidas e purificadas conforme as técnicas indicadas.
- As células (cerca de 0,5-1,0 mg de proteína) foram, então, lisadas em 100-200 μ l de SDS 0,1% contendo PMSF 100 μ M (1 μ l da solução

100 mM/ml de SDS) e leupeptina 2,0 µg/ml final (4 µl da solução 5 mg/ml em água).

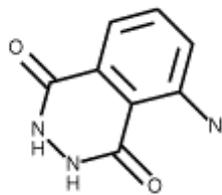
- O homogenato foi misturado à razão de 1:1 com Tampão de Amostra para SDS-PAGE e as amostras fervidas por 5 min a 100°C.
- Para SDS-PAGE, cerca de 20 µg de proteínas foram separadas em gel de 8,5% e transferidas para membranas de nitrocelulose para *blotting* durante 4 h a 150 mA ou a voltagem constante.
- As membranas foram incubadas por 2 h em BLOTTO (TEN-Tween 20 contendo leite desnatado a 5%, m/v) e, depois, incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário anti-MRP1 (clone QCRL-4 – SIGMA M9192) (1:1000) em BLOTTO.
- Depois das lavagens convencionais em TEN-Tween, as membranas foram incubadas com o segundo anticorpo (SIGMA A9044) (1:1000) por 2 h à temperatura ambiente.
- Utilizando o kit ECL Plus (Amersham Biosciences, RPN2132), retirados da geladeira os frascos dos reagentes A (ECL Plus substrate em Tris) e B (Solução estoque de Acridan em dioxano e etanol) e esperou-se que a temperatura dos frascos equilibre-se com a temperatura ambiente. Obs.: Os procedimentos seguintes foram realizados na câmara escura com um mínimo de iluminação através de filtro Kodak vermelho.
- Na câmara escura, com a luz apagada, sob a lanterna vermelha conservando uma certa distância da bancada de trabalho foi cortado um pedaço de filme de raios X (Hyperfilm, Amersham ou equivalente sensível a quimiluminescência) e colocado sobre um cassete de exposição aberto (sobre a superfície branca do Enhancing Screen).

Marcado um dos lados do filme para ser ajustado à marca ou corte feito na membrana.

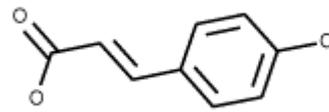
- Foi aberto um pedaço de filme de PVC (Magipac ou semelhante) esticado sobre o filme de raios X contra a superfície lisa do cassete de exposição de maneira a que não se formassem bolhas de ar e que não existissem imperfeições entre o filme de raios X e o filme de PVC onde a membrana foi depositada para exposição.
- Foram misturados os reagentes A e B num pequeno béquer à razão de 40:1 de forma que o volume final de mistura de detecção foi de 0,1 ml/cm² (100 µl do reagente B em 4 ml do tampão A, são o suficiente para membranas de 40 cm² como as utilizadas em nossos experimentos com cubas Mini Protean II da BioRad).
- Foi removido o excesso de TEN-Tween utilizado nas lavagens finais após o segundo anticorpo com o auxílio de um papel filtro encostando-o nas bordas da membrana.
- Foi cortado outro pedaço de filme de PVC grande o suficiente para servir como recipiente de ensaio contendo a membrana e colocada a membrana sobre este filme de PVC com a face contendo as proteínas voltada para cima.
- Foi adicionada a mistura de detecção (A+B) sobre a membrana agitando levemente na palma da mão, por cerca de 5 min, de maneira que o reagente de ECL espalhou-se homoganeamente sobre a mesma. Neste ponto, a visualização das bandas foi feita apagando-se a lanterna de segurança e observando-se a produção de intensa luminosidade verde brilhante (tipo fluoresceína).

- Quando a quantidade de luz emitida pelas bandas foi considerada suficiente (3-5 min), retornou-se o reagente para o béquer de origem e foi drenado o excesso com o auxílio de um papel filtro aplicado às bordas da membrana.
- Deitou-se a membrana contra o filme de PVC que recobre o filme de raios X de maneira a fazer coincidir as marcações da membrana e do filme fotográfico e com a face contendo as proteínas a serem detectadas voltada para o filme.
- O cassete foi fechado e aguardou-se cerca de 20 segundos.
- Revelação e fixação: o filme foi passado, inicialmente, pelo revelador (2 a 3 min, cessando-se o banho quando foi observada a formação das manchas correspondentes às bandas de interesse de maneira a não ter-se grandes backgrounds), lavado em água corrente, passado em banho de ácido acético a 10%, lavado em água corrente e colocado no banho com o fixador (3-5 min). Após 1-2 min no fixador, quando a luz da câmara foi acesa novamente.
- Após a revelação do filme, foi feita uma estimativa do tempo de exposição, o mesmo foi suficiente para obtenção de boas manchas.
- As bandas detectadas registradas em VDS.
- Revelação por ECL – Luminol e ácido *p*-coumárico. Ácido *p*-coumárico, *p*-Iodofenol, fenol e anilina são *enhancers* do sistema de quimiluminescência (QL) luminol-H₂O₂-*horseradish peroxidase* (HRP). Enquanto esses *enhancers* podem ser utilizados para a dosagem peróxido de hidrogênio em minutas quantidades, os sistemas completos (com H₂O₂) promovem *enhanced chemiluminescence*

(ECL) podendo ser utilizados na detecção de anticorpos marcados com peroxidase (HRP), tanto em ELISA quanto em Western blots.



Luminol



Ácido *p*-coumárico

REAGENTES:

Tris 1,5 M pH 8,8

DMSO em quantidade suficiente para preparar estoques de luminol e p-coumárico

Ácido *p*-coumárico (Fluka, cód. 28200)

Luminol (3-aminophthalhydrazide = 3-aminofthalidrazida) grau QL (Fluka, cód. 09253)

Peróxido de hidrogênio 30% (Merck ou Sigma); tem que ser um grau analítico bom porque metais interferem na reação de QL

PREPARAÇÃO:

Soluções-Estoque:

Ácido *p*-coumárico (MW 164,16): 150 mg em 10 mL de DMSO = 91,4 mM = congelado em pequenas alíquotas (250 ou 440 μ L); durante os experimentos, usado e recongelado (-20°C)

Luminol (MW177,16): 440 mg em 10 mL de DMSO = 248,4 mM = congelado em pequenas alíquotas (250 ou 440 μ L); durante os experimentos, usado e recongelado (-20°C)

Reação (preparada apenas no momento das REVELAÇÕES:

Solução 1: 5 mL de Tris 1,5 M pH 8,8

50 μ L de luminol (2,484 mM nesta solução; final 1,242 mM)

22 μ L de ac. *p*-coumárico (402,2 μ M nesta solução; final 201,1 μ M)

Solução 2: 5 mL de Tris 1,5 M pH 8,8

6 μ L de H₂O₂ 30% (0,036% nesta solução; final 0,018%)

Reagente de Trabalho: 5 mL da **Sol. 1** + 5 mL da **Sol. 2**; revelado imediatamente.

Biology, Section III DETECTION OF PROTEINS, Chapters 10.7 (Detection of Proteins on Blot Transfer Membranes) and 10.8 (Immunoblotting and Immunodetection), John Wiley & Sons, Inc., 2003.

“STRIPPING” E RESSONDAGEM DE MEMBRANAS

Em muitos experimentos, a reutilização das membranas de nitrocelulose para ressondagem com outro anticorpo é importante para efeito de controle. A completa remoção do primeiro e do segundo anticorpos após a detecção pode ser realizada pela técnica a seguir. As membranas, quando necessário, foram ressondadas, sempre mantidas em refrigerador e úmidas (TEN-Tween) entre as sondagens.

Solução de *strip*:

β -mercaptoetanol 100 mM (puro = 14,3 M, d=1,11 g/ml)

SDS 2%

Em Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7

Foi dissolvido 1,082 g de Tris em 130 ml de água MilliQ e acertado o pH para 6,7 com HCl. Dissolver 2,86 g de SDS (grau Eletroforese) na solução de Tris e adicionado 1 ml de β -ME sob agitação. Completado o volume para 143 ml com água.

Procedimento

- A membrana foi submersa na solução de *strip* e incubada por 30 min a 50° C.
- Lavada a membrana 2x com TEN-Tween, por 10 min cada, à temperatura ambiente, utilizando-se de grandes volumes da solução de lavagem (exemplo: 10-20 ml para membranas de 40 cm²).
- Incubada em BLOTTO e procedido como de costume para o restante das operações de Western blot.

Purificação de DNA plasmideal a partir de 50ml cultura de *Escherichia coli* ("midiprep")

1. Foram transferidos 50ml da cultura "overnight" de *E.Coli* para um falcon de 50ml, e centrifugado a 7700 g, por 10 minutos para peletar as células.
2. O SN foi aspirado sem perturbar o *pellet* celular, ficando o mais seco possível.
3. O pellet foi ressuspensão em 5ml da **Solução I**, sob agitação vigorosa.
4. Foram adicionados 5ml da **Solução II** e misturado por inversão repetida do tubo. Incubado a temperatura ambiente por 5 minutos.

Nota: A suspensão bacteriana deve estar clara por ação da lise celular.

5. Foram adicionada 5ml da **Solução III** e misturado por inversão repetida do tubo. Incubado em gelo por 10min.
6. Foi centrifugado a 12000 G por 15min a temperatura ambiente.
7. O SN foi transferido para um tubo de centrífuga limpo. (O DNA cromossomal desnaturado fixou-se ao tubo durante a remoção do SN).
8. Foram adicionados 10,5ml (0,7 volume) de isopropanol, à temperatura ambiente, ao SN e agitado para misturar. Foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Seguiu-se nova centrifugação a 12000 g por 20minutos para peletar o DNA plasmideal. O SN descartado e o tubo invertido para secar.

PURIFICAÇÃO DO DNA

1. O **Sephaglass FP** foi suspenso agitando a garrafa. Foram adicionados 5ml da suspensão ao *pellet* de DNA, e agitado gentilmente por 1 minuto para dissolver o *pellet*.
2. Seguiu-se incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Agitando gentilmente a amostra, à cada 2 minutos, para manter o *sephaglass* em suspensão.
3. Centrifugado a 1000 x g por 2 minutos, em uma centrifuga de bancada. Cuidadosamente removido o SN sem perturbar o pellet de *sephaglass*.
4. O *pellet* de *sephaglass* foi lavado adicionando 5ml de Tampão de Lavagem ("Wash Buffer"), e agitando gentilmente para ressuspendê-lo. Foi centrifugado a 1000 x g por 2 minutos em uma centrifuga de bancada. O SN removido sem perturbar o pellet.
5. Foram adicionados 5ml de etanol 70% ao *pellet* de *sephaglass*, e agitado gentilmente para ressuspendê-lo. Seguiu-se nova centrifugação a 1000 x g por 2 minutos em uma centrifuga de bancada. Foi removido o sobrenadante sem perturbar o pellet.
6. Seguindo-se ao enxágüe com etanol, foi centrifugado a 1000 x g por um minuto, sem a tampa. E, cuidadosamente, coletado com uma pipeta todo resíduo de etanol.

7. Fechado o tubo e dispersado parcialmente o *pellet* de *sephaglass*. Deixado ao ar para secagem por 20-30 minutos a temperatura ambiente.

Nota: Não foi seco com vácuo. Secagem extensa iria dificultar a eluição do DNA do *sephaglass*.

8. Para eluir o DNA ligado do *sephaglass*, foram adicionados 500µl de TE e agitou-se para ressuspender o pellet. Foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Agitando ocasionalmente para manter o *sephaglass* em suspensão.

9. Foi centrifugado a 1000 x g por 5 minutos em uma centrífuga de bancada. Transferido o SN para um tubo de microcentrífuga limpo, evitando o *pellet* de *sephaglass* no fundo do tubo.

Protocolo para extração de DNA plasmideal por Isopropanol-Fenol-Clorofórmio

REAGENTES

Tampão GTE pH 8,0 (para 10 ml)

50 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

50 mM glicose

Dissolvido 60,55 mg de Tris em cerca de 9 ml água MilliQ e adicionado 3,722 mg de EDTA (sal dissódico). Acertado o pH para 8,0

com HCl concentrado e adicionado 9,010 mg de glicose. Completado o volume para 10 ml com água MilliQ.

Solução de Lise (NaOH 0,2 M e SDS 1%)

Preparada solução-estoque de NaOH 5M (2 g/10 ml de água MilliQ) e SDS 5% (w/w) (pode ser preparada diluindo-se das soluções concentradas de SDS a 10 ou 20% ou pesando-se SDS Grau Biologia Molecular, 500 mg/10 ml de água MilliQ).

Num tubo de ensaio, pipetada 1,9 ml de água destilada.

Adicionados 100 µl de NaOH 5M.

Adicionados 500 µl de SDS 5%.

Agitado.

Solução de Acetato de Potássio 5 M

Dissolvidos 28,06 g de hidróxido de potássio (KOH, FW 56,11) em 60 ml de água MilliQ.

Adicionado 11,5 ml (0,2011 mol) de ácido acético glacial (MW 60,05; d = 1,05 g/ml) e acertar o pH entre 4,8 – 5,0. Completado com água destilada para 100 ml.

PROCEDIMENTO

1. A cultura de bactérias competentes foi colocada para crescer (5 ml de meio LB, 50 µl de bactérias). Foram adicionados 62,5 µl de ampicilina à cultura = CULTURA OVERNIGHT (9-16 h crescido em

placa de Petri com antibiótico para selecionar as colônias; selecionada uma colônia única e preparados os *OVERNIGHT* por 9-16 h).

2. 1 ml da cultura *overnight* foi transferido para um balão de 250 ml, contendo 50 ml de meio LB e 625 µl de ampicilina e foi, novamente, crescido *overnight* com agitação vigorosa a 37°C.

3. Foi lida a absorbância a 600 nm, em torno de 4/ml para a amostra concentrada (para ler no espectrofotômetro, a amostra foi diluída a 1:10 com água tomando 100 µl de suspensão e dispersando em 900 µl de água; a absorbância da amostra diluída girou em torno de 0,4 nm).

4. As bactérias foram precipitadas em tubos de centrifuga estéreis tipo Falcon (50 ml) a 6.000 x g por 10 min, a 4°C. Desprezado o sobrenadante.

5. O *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de solução salina (ou PBS) e transferido para um tubo de microcentrífuga de 2 ml (Eppendorf).

6. Foi lavado o tubo onde estavam as bactérias centrifugadas (Falcon) com mais 1 ml de salina (ou PBS) e adicionado ao tubo Eppendorf.

7. Foi centrifugado rapidamente (cerca de 2 min) em microcentrífuga para precipitar as bactérias.

8. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente,

9. O *pellet* foi ressuspenso em 400 µl de Tampão GTE, contendo 2 µl de RNase (EC 3.1.27.5; de pâncreas bovino – US Biological R2011 ou

de E. coli Y01220 Invitrogen) a 10 mg/ml para uma concentração final de 50 µg/ml. Agitado vigorosamente no vórtex por 30 s e deixado o tubo por 2 min à temperatura ambiente para permitir a ação da RNase sobre os fragmentos de RNA evitando que os mesmos co-purifiquem com o DNA plasmideal.

10. Foi adicionado 1 ml de Solução de Lise (NaOH 0,2M e SDS 1%) preparada a fresco.

11. Foi agitado gentilmente pelo método de inversão (10 a 20 vezes) e incubado por 5 min em gelo.

***Obs.:** A suspensão não permaneceu nesta solução por mais que 5 min porque poderia haver rompimento do DNA genômico que iria co-purificar com o plasmídeo.*

12. As amostras foram neutralizadas com 600 µl de Acetato de Potássio 5 M pH 4,8 gelado e agitado gentilmente pelo método de inversão (10 – 15 vezes) até diminuir a viscosidade.

***Obs.:** O precipitado celular neutralizado precisa ser quebrado efetivamente para garantir uma eficiente recuperação do DNA plasmideal. No entanto, não se pode agitar (em vórtex ou com a pipeta) vigorosamente já que isso ocasionaria a co-purificação do DNA genômico ao plasmideal.*

13. Foi incubado por 5 minutos em gelo.

14. Seguiu-se centrifugação a 12.000 x g por 5 min a 4°C em microcentrifuga refrigerada com adaptador para tubos Eppendorf (rotor SS-34).

15. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga. **Cuidou-se para não aspirar o precipitado que contém o DNA cromossomal que é indesejado.**

16. Para determinação da concentração de DNA final foram utilizadas cubetas de quartzo, em espectrofotômetro da seguinte maneira: aliquotados 2 µl da solução de plasmídeo preparada e dissolvida em 498 µl de TE. Determinada a absorbância nos seguintes comprimentos de onda utilizando o espectrofotômetro Amersham Biosciences Ultraspec 2000, e o seguinte protocolo:

MODE → ABSORBANCE →
CONCENTRATION → NUCLEIC ACIDS

↓

DNA (ENTER)

BACKGROUND = YES (ENTER)

na posição 1) foi colocada a cubeta com TE (blank) SET REFERENCE

(na posição 2) foi colocada a cubeta com 2 µl da solução de plasmídeo preparada e dissolvida em 498 µl de TE → RUN

O RESULTADO É DADO EM µg de DNA /ml
A RAZÃO 260/280 (PUREZA ≈ 2.0)

Para os cálculos:

1 UAbs_{260 nm} = 50 µg/ml de DNA ou 40 µg/ml de RNA ou 33 µg/ml de oligonucleotídeos

Referências Bibliográficas:

- Protocolo Unit. 1.7.1 Current Protocols in Molecular Biology
- Kit GFX™ Microplasmid prep kit (Amersham Biosciences)

ABSTRACT

A very common complication among late-stage cancer patients is immunosuppression and/or cachexia. Overproduction of cyclopentenone prostaglandins (CP-PGs) in the blood is an important risk factor for the development of immune system blocking. Results from this group have revealed that tumor cells present a high expression of an ATPase, the GS-X pump, coded by MRP genes, which is responsible for exportation of S-conjugates, including CP-PGs conjugated with glutathione (GSH). Glutathione is one of the most important substances involved in redox balance maintenance. Since the accumulation of heat shock proteins (HSP) induced by CP-PGs in immune cells is indicative of the degree of cellular stress to which a cell may be submitted, in this work we searched for the influences of MRP1/GS-X pump in presence of cellular stress caused by unbalanced redox state and cellular stress parameters needed to enhance the expression or activity of MRP1/GS-X pump. Our results showed that lymphocytes have a good response to transfection with the MRP1/GS-X gene, by electroporation, and a suggested correlation between presence of GS-X pump (MRP-1 expression) and also could play a role on regulate intracellular redox status and that lymphocytes transfected with human MRP1 gene presented a higher resistance to redox changes.

INTRODUÇÃO

1 Considerações Gerais

A relação oxidação-redução, ou estado "redox" celular é fator significativo para a manutenção e defesa das células. SINDHU *et al.* (2005) demonstraram que o sistema de defesa antioxidante debilitado tem papel significativo na patogênese do estresse oxidativo verificado na insuficiência renal crônica. Evidências implicam o estresse oxidativo na doença de Alzheimer, como a presença do aldeído 4-hidróxi-2-trans-nonenal (HNE), produto da peroxidação lipídica da membrana. A classe alfa das glutathione-S-transferases (GST) podem destoxificar o HNE e têm importante papel na proteção celular contra o estresse oxidativo (SULTANA e BUTTERFIELD, 2004). A manutenção do estado redox intracelular é uma estratégia precisa que permite às células uma eficiente habilidade de contra-atacar o meio extracelular altamente oxidante.

Moléculas contendo grupos tiol, como a glutathione e tiorredoxina contribuem para a homeostase do estado redox intracelular. Funções celulares essenciais, como a expressão de genes, são influenciadas pelo equilíbrio entre condições pró e anti-oxidantes. O mecanismo pelo qual a transcrição de genes específicos é regulada pelo estado redox em células eucarióticas é bastante complexo, porém, pesquisas da última década sugerem que fatores de transcrição

sensíveis ao estado redox têm papel importante neste processo (ARRIGO, 1999).

LE BRAS e cols. (2005) descreve o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (ERO), nas diferentes fases da via apoptótica, tal como a indução de permeabilidade mitocondrial, liberação de fatores de amplificação da morte mitocondrial, ativação das caspases intracelulares e injúria ao DNA. Por exemplo, a alteração das proteínas constitutivas mitocondriais induzidas pelas ERO, tais como canal aniônico dependente de voltagem (VDAC – do inglês *voltage-dependent anion channel*) e/ou o nucleotídeo adenina translocase (ANT – do inglês *adenine nucleotide translocase*) pode induzir a pró-apoptótica permeabilização da membrana mitocondrial.

Cascatas de sinalização ativadas por estresse oxidativo são afetadas por alterações no potencial redox intracelular. As espécies reativas de oxigênio, formadas, na maioria dos casos, por agentes genotóxicos exógenos (irradiação, citocinas inflamatórias e carcinógenos), são elementos desencadeadores das alterações do potencial redox. As ERO e o potencial *redox* alterado podem ser considerados como as mudanças intracelulares primárias que regulam proteínas quinase, servindo, deste modo, como importantes componentes celulares de ligação entre o estímulo externo e o sinal de transdução na resposta ao estresse (ADLER e cols., 1999). Em contraste à noção convencional de que as ERO sejam primordialmente um gatilho para o dano oxidativo das estruturas biológicas, está o fato de que, em baixas concentrações (fisiológicas), estas possam regular uma série de mecanismos moleculares que podem estar ligados a importantes funções celulares (SEN, 2000).

O potencial redox, sustentado pela relação entre a glutathiona (GSH) e o dissulfeto de glutathiona (GSSG), tem a função de regular a expressão de genes detoxificantes, sendo finamente regulado nas

células sob condições normais. Nestas condições, a extrusão de GSH e conjugados de GSH (GS-conjugados), para fora das células é parte do sistema GSH de defesa celular contra ERO. A redução de hidroperóxidos pela enzima GSH peroxidase (GSPx) produz GSSG, o qual é transportado através da membrana celular por intermédio de uma ATPase específica para GS-conjugados (AKERBOOM & SIES, 1994, ANYA & NAITO, 1993, BOARD, 1981, GODWIN *e cols.*, 1992). A magnitude da resposta a estímulos fisiológicos, suficientemente intensos para disparar a sinalização redox sob condições não tóxicas, no entanto, ainda não é conhecida.

TOYOKUNI *e cols.* (1995) sugeriram que diversas linhagens tumorais parecem apresentar um persistente estado de estresse oxidativo, o qual poderia ocasionar, entre outros eventos, a ativação intermitente de fatores de transcrição, tais como NF- κ B (do Inglês, *nuclear factor-kappaB*), através de sistema intracelular para transdução de sinal, e induzir a expressão de proto-oncogenes, tais como *c-fos*, *c-jun* e *c-myc*. O estresse oxidativo, também induz a danos ao DNA, tais como produtos modificados das bases e quebra da fita que podem levar à mutação e aberração mutacional (instabilidade genômica). Apesar de estar sob constante microambiente oxidativo, aparentemente as células tumorais são resistentes à citólise oxidante, e adenocarcinomas, em geral, são altamente resistentes à quimioterapia, particularmente, ao tratamento com agentes eletrofílicos. Portanto, estes resultados sugerem que células tumorais devem apresentar um mecanismo para resistir ao estresse oxidativo gerado por ERO e agentes eletrofílicos, como a produção aumentada de fatores derivados da células T da leucemia adulta (ADF, do Inglês *adult T-cell-leukemia-derived factor*), GSH e da enzima glutationa S-transferase (GST) (TOYOKUNI *e cols.*, 1995).

Estudos recentes de nosso grupo (KOLBERG *e cols.*, 2005) demonstraram que, em associação às condições referidas por estes autores (TOYOKUNI *e cols.*, 1995), a presença da ATPase de membrana MRP1/bomba GS-X, que exporta GS-conjugados para o espaço extracelular, possa estar envolvida na resistência de células tumorais à atividade antiproliferativa ocasionada pela presença de prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs). As CP-PGs (eletrofílicas) conjugam-se com GSH através das GST, produzindo um GS-conjugado. Tendo em vista que a reação da GST encontra-se próxima do equilíbrio químico sob as condições fisiológicas do meio intracelular, a MRP1/bomba GS-X desloca o equilíbrio para a direita, no sentido da formação de mais GS-conjugados, o que impede o acúmulo de eletrófilos, como as CP-PGs. Logo, a ausência, ou baixa atividade da MRP1/bomba GSX favorece o acúmulo destas CP-PGs as quais têm reconhecida atividade antiproliferativa, situação que se observa nos linfócitos em presença de câncer (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 2001). No entanto, em células tumorais, com a alta atividade da MRP1/bomba GS-X, estes conjugados são exportados para o meio extracelular, permitindo nova conjugação, o que impede o acúmulo das CP-PGs. A expressão da GST (que é induzida pela ativação do fator de transcrição AP-1, dependente do NF- κ B, e, portanto, de um certo nível de estresse oxidativo) também se apresenta aumentada no câncer e no soro de pacientes com câncer, é induzida por estresse oxidativo e está associada com a resistência das células tumorais a agentes quimioterápicos (TOYOKUNI *e cols.* 1995).

A presença do câncer é uma situação de estresse que leva a um desbalanço redox intracelular. Este desequilíbrio dá-se tanto pelo aumento de espécies oxidantes, com conseqüente aumento das concentrações intracelulares de GSSG, quanto pela depleção não-oxidativa da GSH, através da formação de GS-conjugados. Nestas situações verifica-se a expressão de proteínas de choque térmico (HSP, do Inglês, *Heat Shock Proteins*), associadas ao estado redox alterado

(HOMEM de BITTENCOURT *e cols.*, 1998a,b,c). Proteínas de choque térmico (HSP) são um grupo de proteínas cuja expressão é aumentada quando as células são expostas a temperaturas elevadas. Este aumento na expressão é regulado transcricionalmente, e é uma parte importante da resposta ao choque térmico. A produção de altos níveis de proteínas de choque térmico pode também ser disparada por diferentes tipos de condições ambientais de estresse, tais como infecção, inflamação, exposição celular a toxinas (etanol, arsenico, metais e luz ultravioleta, entre outras), desnutrição e/ou hipóxia. Consequentemente, as proteínas de choque térmico são também conhecidas como proteínas de estresse, e sua regulação à maior é, algumas vezes, descrita como parte da resposta ao estresse.

A homeostase do redox intracelular de GSH é finamente regulada para comandar o metabolismo celular e proteger as células contra o estresse oxidativo. As HSPs são fundamentais para a proteção das células contra estresse e na recuperação das mesmas do efeito deletério do calor e outros estresses (RIABOWOL *e cols.* 1988). KONDO *e cols.* (1993) sugeriram que a síntese de GSH, através da γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS, enzima-chave de regulação da síntese GSH) e o transporte de metabólitos de GSH são responsáveis ao choque térmico, verificando aumento da expressão de ambos os mRNAs, da γ -GCS e de proteínas de uma classe especial de proteínas de resposta ao estresse, as proteínas de choque térmico (HSPs). Outras evidências mostraram existir uma íntima relação entre a resposta celular ao estresse oxidativo e a atividade das HSPs. Por exemplo, o efeito citotóxico da ativação do NF- κ B (fator de transcrição nuclear κ B) pelo TNF α (fator de necrose tumoral alfa) em hepatócitos pode ser completamente revertido pela ativação da via das HSPs, enquanto que o bloqueio da expressão das mesmas pela utilização de mRNA anti-sense para a HSP reverte completamente o efeito citoprotetor do choque térmico. (KIM *e cols.*, 1997). O tratamento de células com

doadores de óxido nítrico (NO) leva à formação de GS-conjugados e conseqüente depleção dos conteúdos de GSH intracelular. Isto por sua vez, induz a ativação da via das HSPs (FEINSTEIN e cols., 1996; HUANG e cols., 1994) o que leva à citoproteção.

Resultados recentes sugerem que os processos oxidativos celulares têm papel fundamental na resposta inflamatória, através da ativação de quinases de estresse (JNK, MAPK, p38) e fatores de transcrição sensíveis ao estado redox, como NF- κ B e AP-1, os quais diferencialmente regulam os genes mediadores pró-inflamatórios e genes protetores antioxidantes tais como a γ -GCS, enzima-chave de regulação da síntese de GSH (RAHMAN, 2000). O fator de transcrição nuclear NF- κ B tem papel proeminente na regulação gênica das respostas imunológica e inflamatória, apoptose e proliferação celular (GALTER e cols., 1994). Já é sabido, há quase uma década, que o NF- κ B é um fator de transcrição sensível ao estado redox. Estudos identificaram que uma certa quantidade de GSSG é necessária para a indução da ativação do NF- κ B e da translocação nuclear, enquanto o excesso de GSSG inibe a função do NF- κ B em nível da ligação ao DNA (GALTER e cols. 1994). As etapas sensíveis ao estado redox são comumente dependentes da natureza do ativador do NF- κ B (JANSSEN-HEININGER e cols., 2000). Hiperóxia ou elevações das ERO causam a ubiquitinação e destruição das proteínas inibitórias (I- κ B), liberando o NF- κ B e permitindo que se ligue aos promotores dos genes-alvo. Em células, modelos animais e injúria aguda em pulmões de humanos, também a hiperóxia induz a expressão de múltiplas citocinas pró-inflamatórias através de mecanismos dependentes de NF- κ B (D'ANGIO & FINKELSTEIN, 2000). Por outro lado, a atividade do NF- κ B como ligante do DNA e fator de transcrição, é inibida por agentes oxidantes e potenciada por tióis (MIHM e cols. 1995). Assim, percebe-se nitidamente que existe um "ótimo" de estado redox abaixo do qual, a

ativação do NF- κ B diminui e acima do mesmo, a ativação aumenta mas sua capacidade de ligação ao DNA diminui (GALTER, *e cols.* 1994).

Verifica-se que em células que apresentam resistência múltipla a drogas, a baixa expressão de MRP está associada à baixa expressão da γ -GCS, o que poderia sugerir participação da MRP na regulação da GSH. Porém apesar de o mRNA da γ -GCS apresentar co-expressão com as MRP-1 e MRP-2, a expressão dos dois genes parece ser controlada independentemente (KUO *e cols.* 1998). Estudos de vários grupos de pesquisa (JEDLITSHKI *e cols.*, 1994; HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 2001), sugerem que a MRP1, mais do que qualquer outra proteína, é mediadora do transporte ATP-dependente de S-conjugados de GSH. Uma oxidação aumentada de GSH, catalisada pela GSPx leva à formação aumentada de GSSG, que é um GS-conjugado e, portanto, substrato para a ATP-dependente MRP/bomba GS-X, podendo ser exportado pela mesma.. Estes resultados sugerem que a MRP/bomba GS-X possa atuar como moduladora do potencial redox celular ao exportar os GS-conjugados e regular o balanço entre GSSG e GSH.

2 Proteínas de múltipla resistência a drogas

No corpo humano, os transportadores desempenham papel importante na distribuição e eliminação de muitos agentes terapêuticos, clinicamente importantes. É sabido, por exemplo, que a glicoproteína P, um transportador de membrana ATP-dependente de 170 kDa, oferece resistência a uma variedade de agentes antineoplásicos clinicamente importantes, fenômeno conhecido como multirresistência a drogas (CHING *e cols.* 1994; FARDEL *e cols.* 1996; SHAROM *e cols.* 1997, DE BRUIJN, 1990). A superexpressão de produtos do gene *mdr1* pode estar implicada como mecanismo primário na resistência tumoral a drogas (SUKHAI & MILLER, 2000, GAO *e cols.*, 1998).

As glicoproteínas P (PGP, do inglês *P-glycoprotein*) também desempenham papel na proteção celular contra metabólitos e substâncias químicas, é possível que sejam importantes na resposta celular ao estresse. Além disso, é sabido que muitos estímulos estressantes podem alterar a expressão do gene *mdr-1*. Vários fatores de transcrição por estresse, tais como AP-1, Sp-1, AP-2, NF-Y e C/EBP β (também conhecido como NF-IL6), podem ligar-se em diferentes sítios de ligação na seqüência dos genes *mdr1* já identificadas **Fig. 1** (COHEN e cols., 1994; COMBATES e cols., 1994; RAYMOND e cols. 1990; SUNDSETH e cols.; 1997, HIPFNER, e cols. 1994 e 1996).

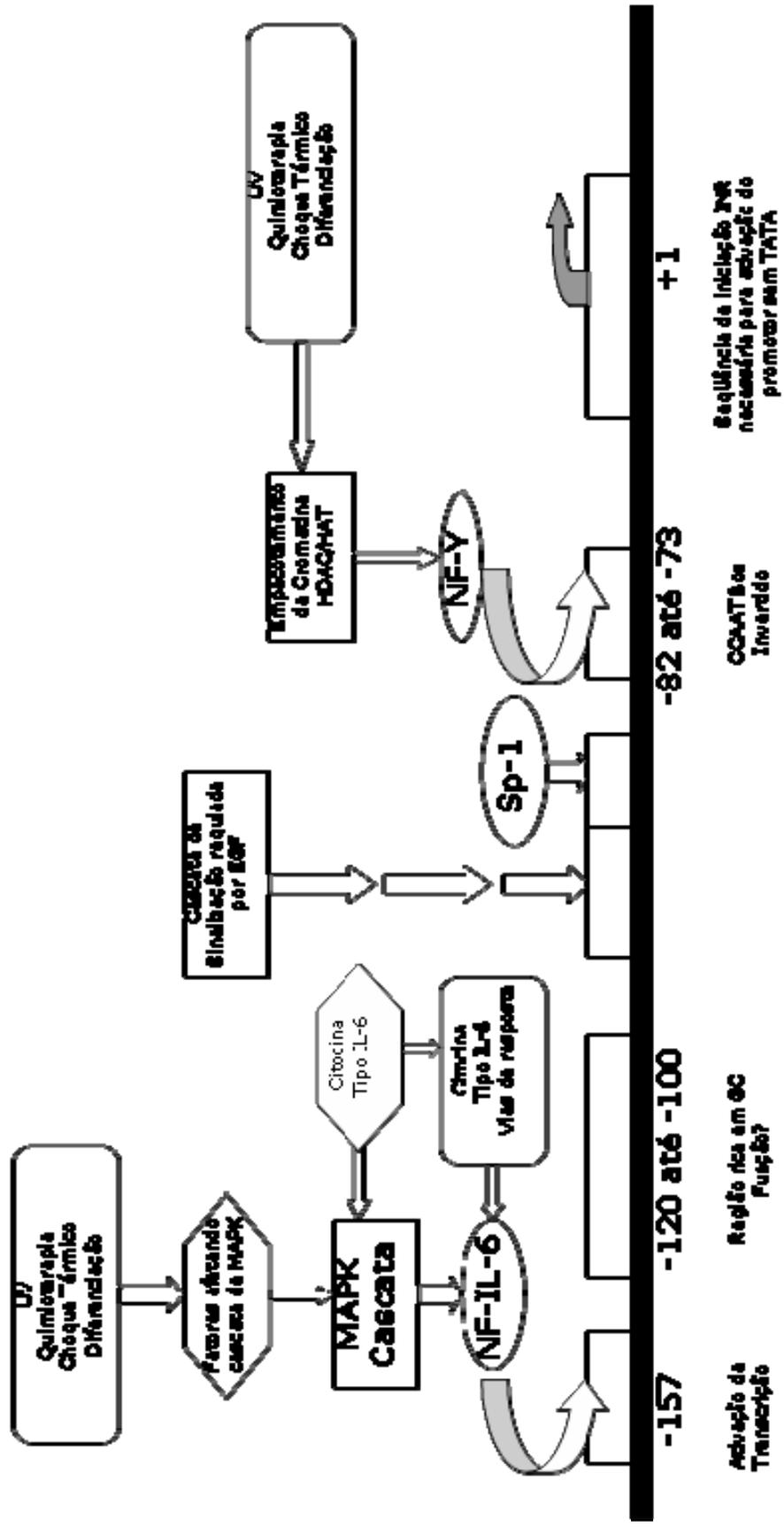


Figura 1 - Desenho esquemático da região promotora humana de MDR1, mostrando a localização relativa dos sítios de ligação de fatores de transcrição, bem como a interação entre os fatores de transcrição e as vias sinalização.

A expressão e atividade da PGP pode ser controlada pré ou pós transcricionalmente por uma grande variedade de influências ambientais, tais como ativadores da proteína quinase C (PKC) que aumentam a atividade da PGP e resistência a drogas e podem aumentar a expressão do gene *mdr1* via transcrição ou tradução (CHAUDHARY & ROBINSON, 1992) **Fig. 2.**

Alterações na expressão de PGP que ocorrem em nível dos RNA mensageiros (mRNA) são as mais freqüentemente observadas, e ocorrem como resultado de aumento das taxas de gene de transcrição (GERMANN, 1996). Exposição celular prolongada a drogas citotóxicas também podem induzir superexpressão do gene *mdr1* por amplificação genética aumento da estabilidade do mRNA (LEE e cols. 1998). É possível que a estabilidade do mRNA possa estar amarrada à integridade celular (LEE e cols., 1995).

É possível que o efluxo de PGP, proteína responsável pela remoção de metabólitos, possa estar ativamente envolvida no mecanismo de proteção estabilização e reparo do dano celular, assim como as proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock protein*). A presença de dois elementos de consenso para HSP, dentro do promotor do gene, bem como aumento do mRNA da *MDR1*, que se segue á exposição a alta temperatura sugerem que a *MDR1* possa funcionar como um gene de choque térmico.

A atividade basal do promotor de *MDR1* requer transativação mediada por fator de choque térmico (HSF, do Inglês, *heat shock factor*)(KIM, e cols., 1997). A inibição da formação do complexo de proteína de DNA, entre o HSF e seu elemento de resposta bloqueia a transcrição basal de *MDR1*, sensibilizando células resistentes a drogas anti-câncer (KIM, e cols. 1998).

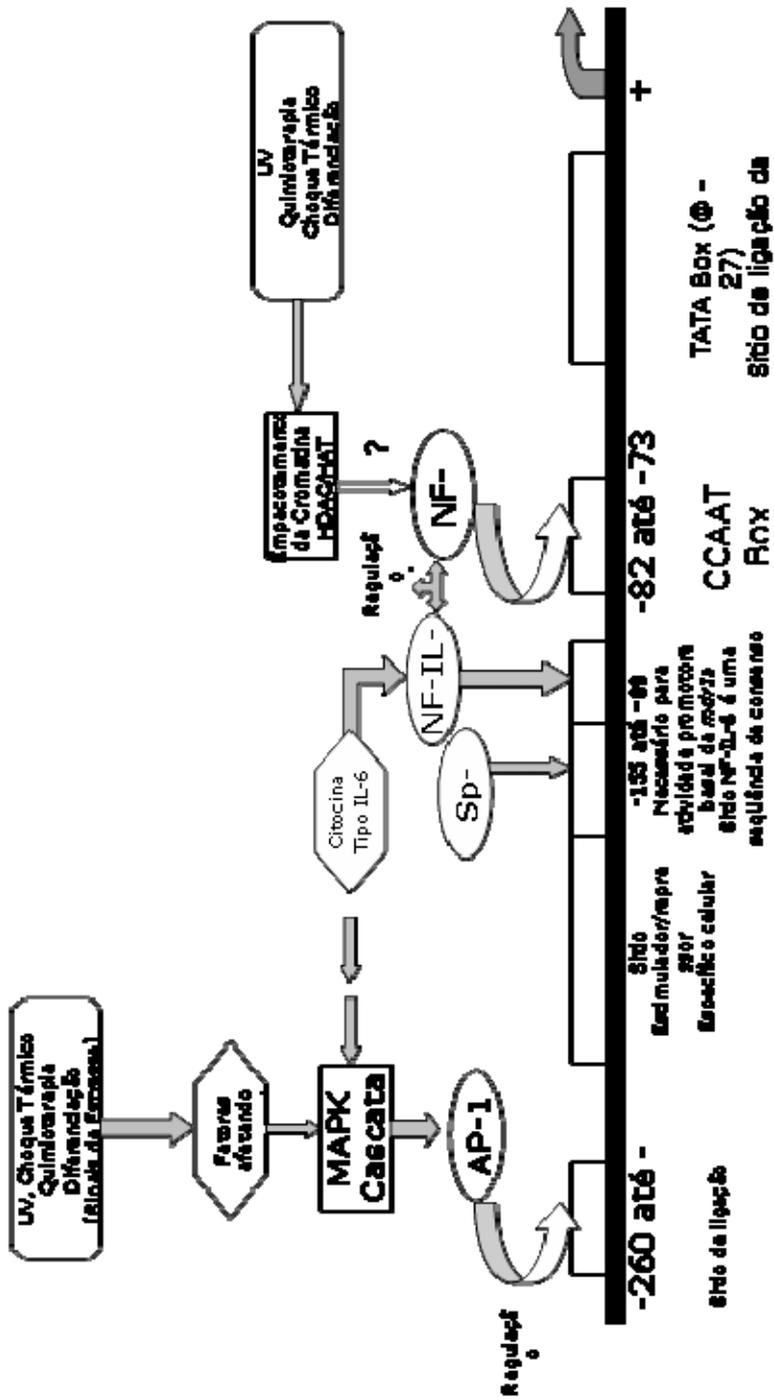


Figura 2 - Desenho esquemático das regiões promotoras murinas de *mdr1a* e *mdr1b*, mostrando as localizações relativas dos sítios de ligação dos fatores de transcrição, bem como a interação entre os fatores de transcrição e as vias de sinalização.

Uma proteína quinase A (PKA, do Inglês, *protein kinase A*) suprime a atividade de ligação do DNA do HSF, bem como reduz a expressão de proteínas de choque térmico hsp90 e hsp70 (KIM, e cols. 1997). Acredita-se que a hsp90, que pode ser co-precipitada ou co-induzida com a PGP, possa, de alguma forma, estar envolvida na manutenção da atividade funcional e meia-vida da proteína PGP. Assim sendo, a supressão da hsp90 iria possivelmente resultar na diminuição da meia-vida e atividade da PGP (BERTRAM, e cols. 1996). Foi demonstrado, também, que elementos de choque térmico podem estar envolvidos nas alterações da taxa de transcrição da *MDR* através de padrões que dependem da PKA e dos oncogenes *raf*. (KIM e cols. 1996).

As células podem ser resistentes ao choque térmico (um fenômeno conhecido como termo tolerância) da mesma maneira que podem ser resistentes às drogas (SUKHAI & PIQUETE-MILLER, 2000). Várias evidências existem detalhando a modulação da expressão de *mdr1* por choque térmico.

As proteínas de multirresistência à drogas MRP compreendem uma família. Pouco se sabe sobre os padrões de sinalização celular que regulam a MRP, contudo, vários padrões de regulação do gene MRP parecem ocorrer através de fatores ambientais (SUKHAI, 2000, KOOL e cols. 1999). A expressão do gene da *MDR1* pode, por exemplo, ser afetada por resposta celular à irradiação ionizante, geralmente apresentando aumento de expressão do gene, tal como observado na irradiação por ultra violeta, onde ocorre aumento das taxas de transcrição do gene *MDR1* (OHGA, e cols. 1996). É possível que a sinalização destes eventos ocorra através do sítio de ligação CCAATbox/NF-Y. Na presença de irradiação, a transcrição aumentada,

que requer seqüências de -82 até -73, a qual contém um elemento invertido CCAAT box, podendo abolir a resposta do promotor ao inibidor de desacetilação das histonas, que modulam o empacotamento do DNA (JIN & SCOTTO, 1998). Estes autores postulam, também, que as taxas de acetiltransferase para atividade deacetilase poderiam ser importantes na regulação da *MDR1*, com a hiperacetilação levando à ativação do gene. A seqüência CCAATbox está, também, implicada na indução imposta por vários outros estímulos (MORROW *e cols.* 1994), que incluem diferenciação (MICKLEY *e cols.* 1989), choque térmico (MYAZAKI *e cols.* 1992) e drogas citotóxicas (OHGA *e cols.*, 1996). Considera-se que esta seqüência participe da manutenção da atividade do promotor *MDR1*, isto implica na possibilidade de que a *MDR1* seja induzida pela radiação através de uma resposta geral e inespecífica ao estresse.

Outras evidências demonstraram que existe uma correlação entre a atividade da proteína quinase e expressão de *mdr1*, sugerindo que a ativação de proteínas quinases dependentes de AMP cíclico pode estar envolvida na indução do fenótipo multirresistência a drogas, em células tumorais. A proteína quinase c-Jun NH₂-terminal (JNK), é ativada em resposta a muitos estímulos de estresse, incluindo fator de crescimento (GF, do inglês *growth factor*), choque térmico, irradiação UV, inibidores de síntese protéica, e citocinas inflamatórias (YAN *e cols.* 1994; DAVIS, 1993; COBB & Goldsmith, 1995; KYRIAKIS *e cols.* 1994; RAIGEAUD *e cols.* 1995; HIBI *e cols.* 1993).

É sabido que a maioria dos efeitos encontrados durante uma resposta inflamatória aguda estão associados com a liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias, em particular IL-1 β e IL-6, e, posteriormente, fator de necrose tumoral TNF- α (TNF, do Inglês, *tumor necrosis factor*). Estas citocinas são os mediadores principais envolvidos na expressão hepática de várias glicoproteínas, bem como, citocromo

P450, enzima envolvida no metabolismo de drogas durante inflamação. É possível que estes mediadores estejam, também, envolvidos com a regulação da PGP e o controle da expressão do gene *mdr* durante a inflamação, e que, particularmente a IL-6, possa ser a responsável primária pela “*down-regulation*” (regulação a menor ou regulação para baixo) da expressão e atividade da PGP, durante resposta inflamatória aguda. (SUKHAI e cols., 1999; SUKHAI, e cols., 2000).

A superexpressão de outros transportadores de membrana, tais como as proteínas de multi-resistência a drogas (MRP, do inglês *multidrug resistance-associated protein*) tem papel importante no desenvolvimento de resistência à drogas em tumores (HOMEM DE BITTENCOURT, e cols. 1998a,b,c; 2001; KOLBERG e cols., 2005). Pouco se sabe sobre a sinalização envolvida na regulação da MRP, no entanto, alguns fatores ambientais já foram identificados como reguladores do gene de MRP, e.g. irradiação (OOSTHUIZEN e cols., 2000; HARVIE e cols., 1997. A proteína p53 (identificada por sua massa molecular = 53 kDa) e reconhecida como supressora tumoral, por ligar-se ao DNA celular tumoral e impedir que a divisão celular siga para a fase “S” ocorrendo a replicação, era sabida como supressora da transcrição de *mrp1* (WANG & BECK, 1998), e que na sua ausência ou inativação seria possível observar aumento no RNA mensageiro da *mrp* (SULIVAN e cols., 2000). No entanto, em estudos recentes desenvolvidos por ODA e cols. (2005), em sarcomas de tecido mole, revelaram estreita relação entre a expressão nuclear de p53 e altos níveis de MDR1/mRNA, sugerindo a p53 possa ser um dos reguladores ativos da transcrição de MDR1.

3 Proteínas de choque térmico (HSP)

Para uma molécula funcional ativa, durante o processo de replicação, a cadeia polipeptídica adquire sua conformação

tridimensional típica. Replicação do material genômico é um processo que requer não somente alta fidelidade na duplicação das seqüências do DNA, mas, também, a herança do estado da cromatina. Nos últimos anos, enormes esforços têm sido feitos no sentido de elucidar os mecanismos envolvidos na correta propagação do estado da cromatina. Destes estudos emerge uma rede epigenética que é a base deste processo. Um jogo coordenado entre as modificações e das variantes das histonas, metilação do DNA, componentes do RNA, remodelação da cromatina ATP-dependente, e fatores de montagem específicos das histonas, regulam o estabelecimento da programação temporal da replicação, início da replicação e propagação dos domínios da cromatina (SANTORO e LUCIA, 2005). Nas células, porém, onde há presença de alta concentração de moléculas diversas, as cadeias de aminoácidos com regiões hidrofóbicas livres tendem a formar aglomerados caóticos e disfuncionais, porque a cadeia polipeptídica é gradualmente sintetizada nos ribossomas em pequenos fragmentos. Na ausência de determinados co-fatores as emergentes cadeias replicam co-transacionalmente, perdendo a informação do domínio completo da estrutura.

Os co-fatores celulares envolvidos na replicação da cadeia polipeptídica estabelecem, também, o mecanismo de reparo de moléculas protéicas deficientes que ocorrem sob condições de estresse. As chaperonas, proteínas que têm sua expressão aumentada durante situações de estresse, não podem ser consideradas como catalisadoras da replicação protéica, pois não são capazes de acelerar o processo, bem como, não têm a informação necessária para a aquisição da conformação apropriada. Contudo, as chaperonas são um grupo de proteínas mediadoras da correta replicação, montagem, reparo, translocação através das membranas, e degradação de outras proteínas (HARTL, 1996, BENJAMIN *e cols.*, 1992, HUNT & MORIMOTO, 1995). Estas chaperonas são chamadas de proteínas de choque térmico, HSP (do Inglês, *heat shock proteins*) por serem sintetizadas em grandes

quantidades quando as células são expostas a temperaturas elevadas (42°C). Células eucarióticas apresentam várias famílias de proteínas de choque térmico que são classificadas conforme a região de massa molecular. É o caso das famílias de 60 e 70 kDa, hsp60 e hsp70, que apresentam diferentes membros e funções nas organelas. As mitocôndrias, por exemplo, têm suas próprias moléculas de hsp60 e hsp70, distintas daquelas que funcionam no citossol, e ainda uma hsp70 especial, chamada *BIP*, que auxilia a replicação das proteínas no retículo endoplasmático (BUKAU & HORWICH, 1998). As HSP têm uma importância tão capital para a sobrevivência das células que foi uma das primeiras proteínas produzidas pela natureza durante a evolução das espécies, a ponto de que a homologia entre certas HSP humanas e de bactérias pode chegar a 50%.

Várias proteínas de choque térmico funcionam como chaperonas moleculares, isto é, proteínas que “acompanham” outras proteínas de um compartimento celular a outro ou até que cheguem a seus destinos fisiológicos (núcleo, membranas, mitocôndrias etc.). A função chaperona das HSP está relacionada a sua propriedade de impedir dobramentos indesejáveis e a desnaturação das proteínas celulares, motivo pelo qual, estas HSP apresentam efeito citoprotetor (FEHRENBACH, 1999 e 2000) .

Tabela 1. Classificação das chaperonas

HSP70 ATPases	Proteínas com domínio J	Fator de permutação de Nucleotídeos
Eucarióticas: HSP72, HSC70, mHsp70, BiP	Eucarióticas: HSP40, HDJ1, YDJ1p, MDJ1p	Eucarióticas: HIP, SSC1
Procarióticas: DnaK	Procarióticas: DnaJ, CBPA	Procarióticas: GrpE=Hsp24

O nome HSP70 descreve, de fato, uma família de chaperonas de multi-genes, mas, todos os membros têm em comum quatro características: seqüência altamente conservada, massa molecular em torno de 70 kDa, atividade ATPase e habilidade para ligar e liberar segmentos hidrofóbicos de cadeias polipeptídicas simples (PETRONINI, *e cols.* 1995).

O grupo de proteínas com domínio-J pode ser caracterizado por dois aspectos: a habilidade de modular o ciclo de ligação-liberação peptídica hsp70, e a presença de domínio-J extremamente conservado, o qual é responsável pela interação com a respectiva proteína hsp70. As proteínas domínio-J são, também, capazes de ligar proteínas simples (FEIGE & POLLA, 1994, KELLEY *e cols.* 1993).

Os fatores de permutação de nucleotídeos são achados somente em bactérias e leveduras. A função principal destas pequenas proteínas (20 kDa) é a promoção de liberação de adenina difosfato (ADP) pelas HSP70s.

As Hsp70s contêm dois domínios principais: domínio N-terminal ATPase, o mais conservado (cerca de 64 % identidade residual entre as Hsp70s eucarióticas) e a parte C-terminal ocupada por um domínio ligante-peptídico mais variável. Ambas as regiões são acompanhadas por sítio protease-sensitivo **Fig 3**.

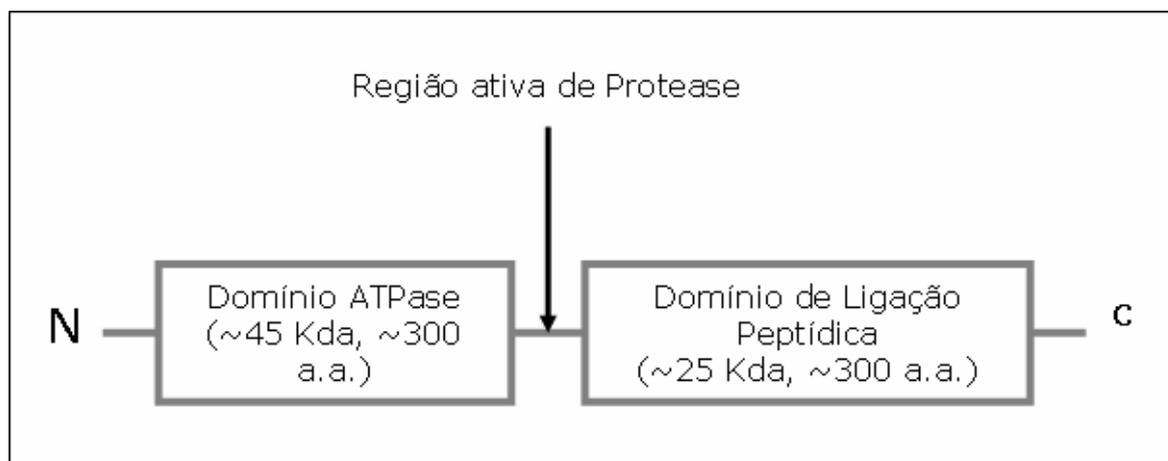


Figura 3 - Diagrama esquemático da molécula de HSP70

Os estudos realizados no sistema HSP70 de *Escherichia coli* (*E. coli*), demonstraram que o domínio ATPase de Dnak (um homólogo da HSP70 da *E. coli*) transmite mudanças conformacionais dependentes da presença de ATP no domínio ligante-peptídico, e é, também, responsável pela interação como domínio-J, proteína DnaJ e com GrpE (um fator de permutação nucleotídeo das *E. coli*) o qual promove a liberação de ADP. Apesar da ausência do homólogo GrpE em células eucarióticas, as mesmas também apresentam um fator envolvido na regulação da liberação de ADP, chamado HIP (do inglês, *hsp70 interacting protein*), porém com função diversa da GrpE, pois a ligação da HIP ao domínio ATPase da HSP70 inibe a dissociação da ADP estabilizando a HSP70 no estado ligante-peptídico (AMIN e cols. 1988).

O domínio ligante-peptídico, formado por duas lâminas β antiparalelas de quatro seqüências, tem um conjunto de terminações fazendo contato direto com peptídeo limítrofe, enquanto a extremidade da hélice não toca o peptídeo limítrofe, servindo mais como fator limitante da taxa de ligação/liberação do peptídeo, de acordo com o estado de domínio ATPase. Quando este último domínio forma um complexo com ATP a hélice adota uma conformação aberta, permitindo fácil ligação/liberação dos peptídeos. Quando a ADP ocupa a fenda ATP, a extremidade da hélice fecha, ancorando o peptídeo limítrofe, diminuindo, significativamente sua taxa de dissociação. Infelizmente, pouco se sabe sobre a estrutura de todas as moléculas HSP70 e a cerca das interações estéricas dos dois domínios funcionais descritos. Particularmente, não está claro o mecanismo molecular de transferência de energia entre a o domínio ATPase e a terminação ligante-peptídica

Fig 4.

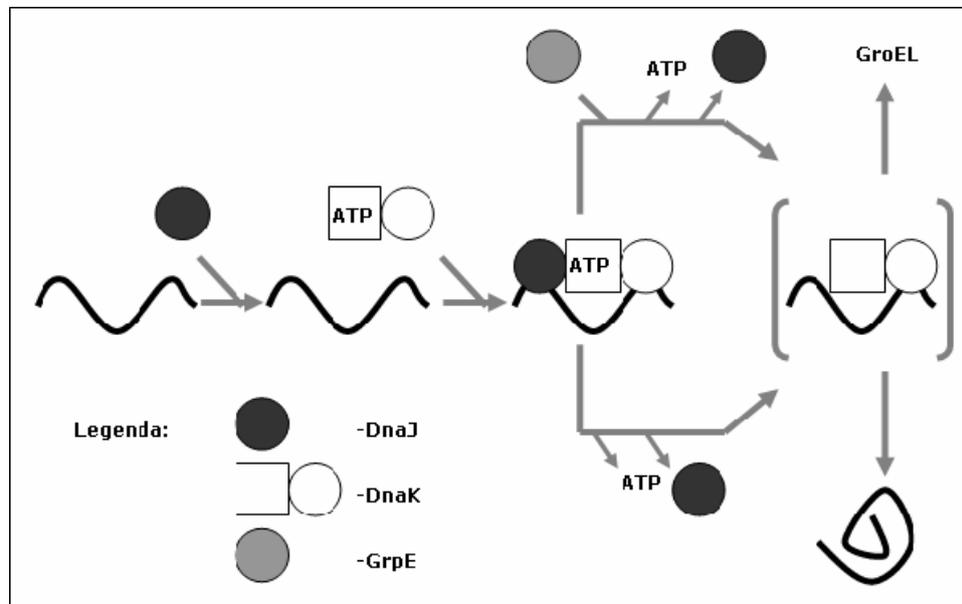


Figura 4 - Desenho esquemático do ciclo ligação/liberação das HSP70

O mecanismo de ação do ciclo ligação/liberação das HSP70 é significativamente distinto entre células procarióticas e eucarióticas. Por exemplo, nas E.Coli, o mecanismo inicia com a interação da DnaJ com o peptídeo não replicado e a molécula-alvo DnaK. Como anteriormente mencionado, a molécula DnaK, neste momento, está no estado "aberto" e pode, efetivamente, ligar-se ao peptídeo limítrofe. Na sequência a DnaJ promove a ação hidrolítica do domínio DnaK ATPase, enquanto a molécula GrpE facilita a liberação da ADP resultante. O restante do complexo DnaK + peptídeo torna-se instável e rapidamente se dissocia, liberando e.g. fragmentos de uma cadeia polipeptídica longa, mais estável.

A principal diferença no mecanismo de ação das HSP70 das células eucarióticas está na presença da Hip e nos estágios iniciais da reação. O peptídeo não replicado reage diretamente com a HSP70, mas

a presença da HSP40 (domínio-J) facilita significativamente o processo de ligação. Neste ponto a HSP40 liga-se ao complexo peptídeo/HSP70, estimula a atividade ATPase, e o complexo HSP70 adota um estado ADP-ligante mais estável, e a ligação da molécula Hip estabiliza este estado. O ciclo termina com a lenta dissociação da ADP, aquisição da próxima molécula de ATP, e dissociação do peptídeo (Kelley, 1998).

4 Prostaglandinas

As prostaglandinas (PGs) são substâncias naturais dos organismos vivos (BERGSTROM, CARLSON & WEEKS, 1968, IRVINE, 1982), que desempenham papel regulatório significativo em várias funções, entre elas, ação citoprotetora, promoção ou inibição de proliferação celular (BERGELSON, PINKUS & DANIEL, 1979; OHNO, *e cols.*, 1986) , atividade contrátil, e outras. As mesmas são ácidos graxos insaturados derivados de ácidos graxos de vinte carbonos contendo três, quatro ou cinco insaturações: ácido 8,11,14-eicosatrienóico ou di-homo- γ -linoleico (precursor das 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). No homem, o AA é o precursor mais abundante e pode ser sintetizado a partir do ácido linoleico (9,12-octadecadienóico) da dieta ou ingerido como tal.

As PGs, têm ação sobre eventos importantes, como sinalização transmembrana, diferenciação celular, proliferação (BOOYENS, *e cols.*, 1984), ativação para divisão celular (COWLEN & ELING, 1992) , ou paralisação da mesma (D'ONOFRIO, *e cols.*, 1986, 1992) como já citado. Além disso, estão presentes na resposta ao estresse, resposta imunológica, inativação da proliferação viral, ativação de proteínas de choque térmico (HSP) (AMICI *e cols.*, 1992, 1992b; AMICI & SANTORO, 1991), e produção de radicais livres (HEMPEL, *e cols.* 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).

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 *e cols.* 1991; HOMEM de BITTENCOURT, *e cols.*, 1989), e ocorre quando o AA é liberado para o citoplasma. A liberação de AA ocorre diretamente através da fosfolipase A₂ (PLA₂), ou indiretamente pelas fosfolipases A₁, C e D (BILLAH, *e cols.*, 1990, CHANG *e cols.* 1987). 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.

O AA pode fornecer uma grande variedade de eicosanóides (PARKER, 1986) por, pelo menos, três vias metabólicas conhecidas: a da ciclooxigenase (COX), das lipoxigenases (LOX) e a via do citocromo P450 ou epoxigenase (EPOX). A COX (PG endoperóxido sintase ou PGH sintase, E.C. 1.14.99.1), existe em, pelo menos, três isoformas altamente glicosiladas pós-traducionalmente, COX-1, COX-2 (OTTO *e cols.*, 1993) e COX-3 (ARITA *e cols.* 1990, BURGOYNE, 1990, WARNER & MITCHELL, 2002; CHANDRASEKHARAN *e cols.*, 2002; DING *e cols.*, 2003). A COX-1 localiza-se nas membranas do retículo endoplasmático e envelope nuclear e é, então, responsável pela produção dos prostanóides, terminologia usada para designar os produtos lipídicos contendo anel ciclopentano e derivados da PGH sintase, como as PGs.

A outra atividade enzimática importante ligada ao metabolismo do AA é a lipoxigenase. Através da atividade LOX (E.C. 1.13.11.12) o AA pode ser metabolizado nos mamíferos por, pelo

menos, três enzimas distintas. A 12-LOX converte o AA no ácido 12-S-hidroperóxi-eicosa-5,8,10,14-tetraenóico (12-HPETE), que, pela ação da glutathiona peroxidase (GSPx) é reduzido ao análogo hidroxilado, 12-HETE. O precursor hidroperóxido (12-HPETE) pode ainda ser enzimaticamente convertido no derivado 12-ceto-eicosatetraenóico (12-KETE) ou nas hepoxilinas (derivados hidróxi-epóxi-eicosatrienóicos) A e B, que, pela ação da hepoxilina hidrolase, são convertidas, em vários tecidos, nos derivados trienóicos trihidroxilados, as trioxilinas (PACE-ASCIAK & LEE, 1989; PIOMELLI & GREENGARD, 1990). Da combinação da atividade conjunta e ordenada das três LOX, surgem outros eicosanóides com importantes atividades biológicas nas interações célula-célula, como os ácidos diidróxi-eicosatetraenóicos (DHETE) e as lipoxinas (LX) - derivados trihidroxilados (SERHAN, 2002).

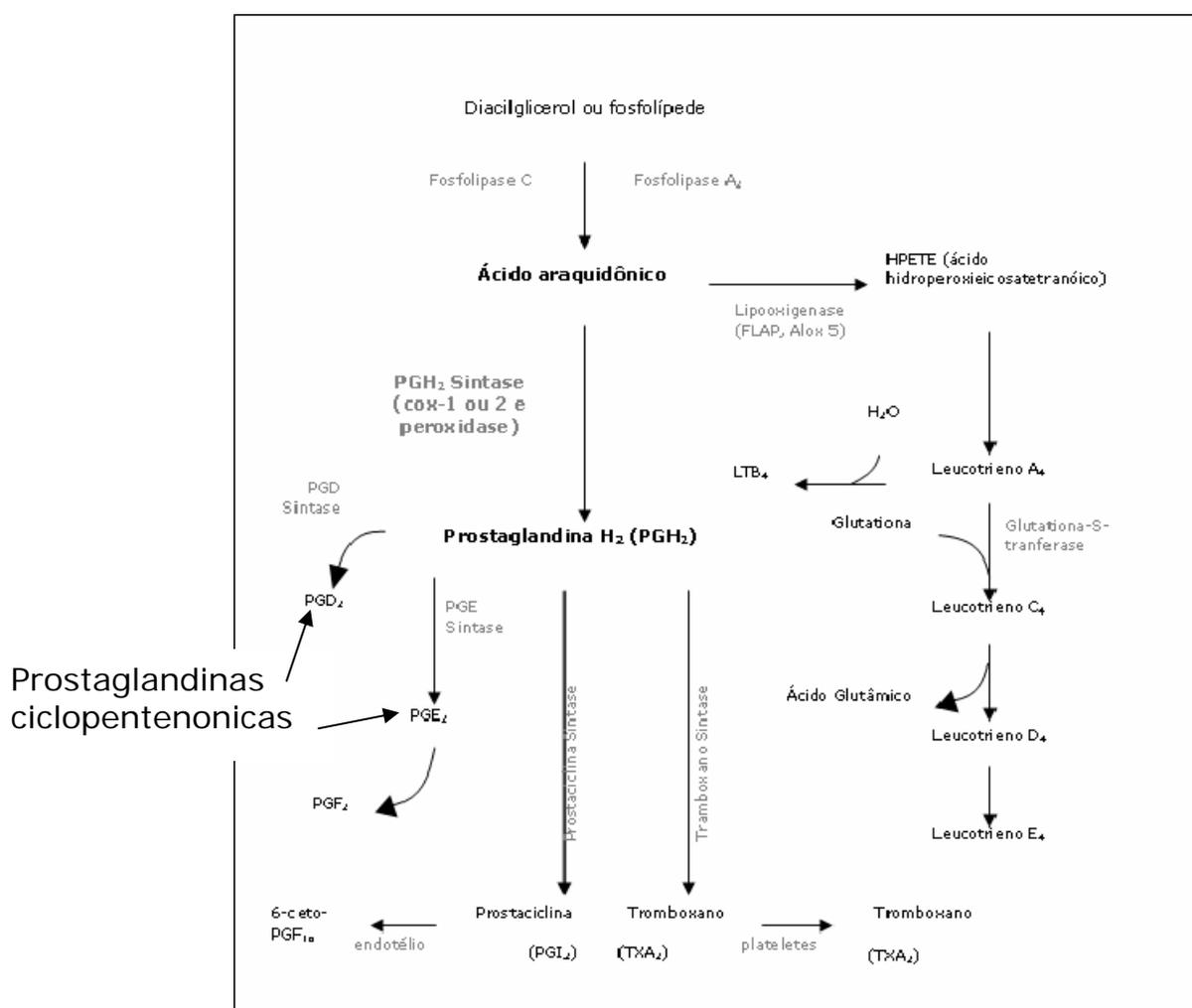


Figura 5 - Cascata de síntese de prostaglandinas, a partir da ativação do ácido araquidônico.

Uma terceira via de metabolização do AA, a EPOX, transformação pela atividade monooxigenase do complexo P450, pode oxigenar o substrato graxo para fornecer vários derivados monooxigenados (HETE) e uma série de quatro epóxidos, os ácidos epoxieicosatrienólicos (EET) [5,6-; 8,9-; 11,12-; 14,15-EET] em vários tecidos de mamíferos; estes podem ainda ser hidrolisados aos dióis vicinais correspondentes (McGIFF & QUILLEY, 1999).

Entre as prostaglandinas, é de especial interesse, de nosso grupo de trabalho, aquelas chamadas de ciclopentenônicas, ou CP-PGs. As prostaglandinas ciclopentenônicas têm sido motivo de estudo nas últimas três décadas (SANTORO e cols. 1976, 1977), por demonstrarem efeito sobre o crescimento de células tumorais, tendo sido inclusive eletivas como potenciais agentes terapêuticos antimetastáticos e anticâncer (FITZPATRICK & STRINGFELLOW, 1979; FUKUSHIMA e cols., 1982; NARUMIYA, 1986; IKAI e cols., 1987). Nessa época, também, surgiram as primeiras evidências de modulação da proliferação e diferenciação em células tumorais e do sistema imunológico e outros estudos, revelando que o efeito antiproliferativo destas PGs ciclopentenônicas é, na verdade, exercido apenas pelos derivados das PGE2 (OHNO e cols., 1986, PETRINI e cols. 1998, PHIPS, e cols. 1989, 1991) e PGD2 (NARUMIYA & FUKUSHIMA, 1985).

Apenas as prostaglandinas com anel ciclopentenônico (CP-PGs), que são produzidas pela desidratação das PGE2 e PGD2, apresentam atividade antiproliferativa devido ao grupo cetona α, β -insaturado (HONN & MARNETT, 1985; ITO e cols., 1989, ATSMON e cols., 1990). As CP-PGs produzidas como principais produtos de desidratação das PGs parentais são a PGA2, PGA1, PGJ2 e Δ 12-PGJ2. AS CP-PGs são formadas quando se expõe a PGE2 ou PGD2 ao plasma ou soluções contendo soro (KIKAWA e cols., 1984). Isto explica

também a o rápido desaparecimento da PGE2 e da PGD2 em meios de cultura contendo soro (FITZPATRICK & WYNALDA, 1983; KIKAWA e cols., 1984; ITO e cols., 1989). Uma vez internalizadas, as CP-PGs localizam-se no núcleo celular mas de maneiras diferentes: a PGA2 permanece na forma livre, enquanto que a Δ 12-PGJ2 liga-se covalentemente a proteínas da cromatina e da matriz nuclear (NARUMIYA e cols., 1987). Isto se reflete no poder inibitório de cada uma destas CP-PGs sobre a proliferação celular. Assim, o efeito antiproliferativo da Δ 12-PGJ2 é muito mais potente e irreversível, enquanto que o da PGA2 ou PGA1 é mais brando e pode ser revertido pela lavagem das células (OHNO e cols., 1988a). Entretanto as CP-PGs têm em comum a característica de induzir inibição da proliferação celular por impedir a progressão das células além da fase G1 do ciclo celular num processo que é sensível à cicloeximida (OHNO e cols., 1988a; NARUMIYA e cols., 1989).

O efeito inibitório das CP-PGs sobre a proliferação de todas as linhagens de células eucarióticas já testadas resultou numa grande quantidade de trabalhos onde foi avaliado o potencial anticâncer destas substâncias. Paralelamente a sua atividade antiproliferativa celular, entretanto, as CP-PGs exibem um notável efeito antiproliferativo, associado ao efeito antiviral. Assim como no efeito antiproliferativo exercido sobre células eucarióticas, a ação antiviral das CP-PGs depende da presença do anel ciclopentano contendo o grupamento cetônico α,β -insaturado; assim outras PGs como as das séries B, E, F, ou a prostaciclina (PGI2), 6-ceto-PGF1 α ou tromboxana (TXA2) não apresentam atividade antiviral (SANTORO e cols., 1990; AMICI & SANTORO, 1991).

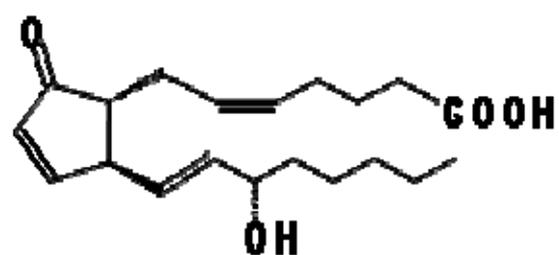
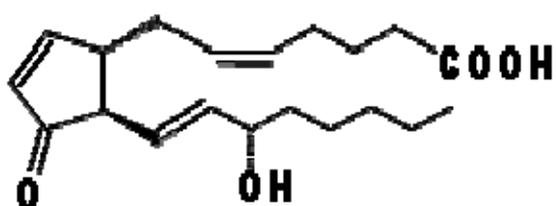
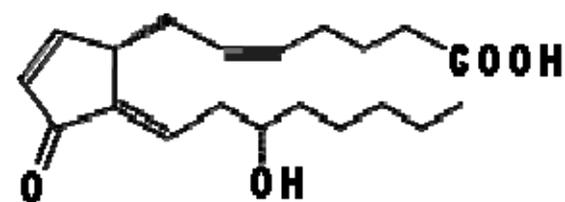
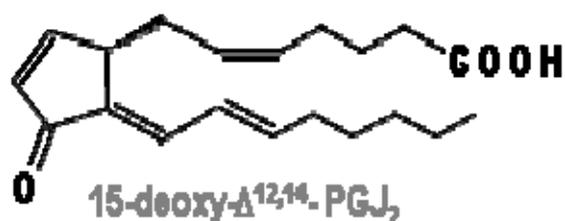
PGA₂PGJ₂ Δ^{12} -PGJ₂15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂

Figura 6 – Desenho esquemático das prostaglandinas ciclopentenônicas

O estudo dos mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa das CP-PGs sobre células eucarióticas ou vírus levou ao entendimento de alguns mecanismos básicos da ação destas PGs e que podem estar relacionados com um possível papel fisiológico das CP-PGs na regulação da proliferação e diferenciação celulares. Por exemplo, o efeito inibitório das CP-PGs sobre a replicação viral é dependente da célula hospedeira, uma vez que a adição de actinomicina D (que suprime a transcrição do DNA nas células hospedeiras mas não nos vírus testados) abole completamente o efeito antiviral destas PGs (SANTORO e cols., 1989; SANTORO e cols., 1989a; 1989b; AMICI & SANTORO, 1990). De fato, o efeito antiproliferativo das CP-PGs parece depender da síntese de um polipeptídeo de 74 kDa (nas células-alvo), identificado como uma proteína de choque térmico (HSP) e pertencente à família das HSP70 (OHNO e cols., 1988b; SANTORO, 2000; D'ONOFRIO e cols., 1994).

Como as HSP70 são uma classe de proteínas induzida pelas CP-PGs e sua síntese (pela célula tratada) está invariavelmente associada ao efeito antitumoral e antiviral destas PGs, é possível que as HSP70 possam mediar o efeito antiproliferativo das CP-PGs ou ainda que as CP-PGs possam ser os mediadores fisiológicos da ação das HSP70, cujo papel fisiológico preciso ainda não é conhecido (OHNO e cols., 1988b; SANTORO e cols., 1989; AMICI & SANTORO, 1990). Na verdade, em todos os modelos de células tumorais ou de células infectadas (ou não) com vírus, o tratamento com CP-PGs ativa os HSFs (fatores de transcrição para as HSP).

Outro fenômeno da maior importância que se observa após o tratamento de células humanas com doses não-tóxicas de CP-PGs é a termotolerância, a aquisição de resistência à exposição ao calor por curtos períodos de tempo (AMICI e cols., 1993; MAGER & MORADAS FERREIRA, 1993). De fato, as PGAs induzem resistência aos efeitos do choque térmico, avaliados pelo atraso de 24-48 h na expressão de

HSPs. Além disso, o estabelecimento do estado de termotolerância não é devido a um efeito direto da PGA, uma vez que, para que o mesmo se estabeleça, é necessária a síntese de novo de HSPs (AMICI e cols., 1993).

É interessante que existe uma nítida relação entre os mecanismos fisiológicos envolvidos nas alterações de temperatura e o metabolismo do AA. Como se sabe, as PGs do tipo E (precursoras das PGAs) induzem o estado febril por alteração no *set-point* hipotalâmico de controle da temperatura (CAMPBELL, 1990). Por outro lado, as PGAs medeiam a expressão de HSP induzidas por choque térmico e outros agentes estressantes ou têm sua síntese induzida pelas HSPs (SANTORO e cols., 1990). O próprio AA é um potente modulador da transcrição dos genes para HSPs humanos em doses fisiológicas (JURVICH e cols., 1994).

O estudo da indução de HSPs constitui-se, pelo que foi apresentado acima, numa ferramenta importante para a investigação da participação das CP-PGs em eventos fisiológicos, já que são uma classe de polipeptídeos induzidos por essas PGs. O tratamento de células de mamífero com PGA1, PGA2, PGJ2 ou Δ 12-PGJ2 resulta em expressiva síntese de HSP70, a mais importante proteína de choque térmico e de resposta ao estresse celular (OHNO e cols., 1988b; SANTORO e cols., 1989; SCHLESINGER, 1990; AMICI & SANTORO, 1991; AMICI e cols., 1992). Como a expressão de HSP70 é regulada pelo crescimento celular (SCHLESINGER, 1990; AMICI e cols., 1992), é razoável supor-se que a indução de HSP70 por CP-PGs poderia ser parte de um conjunto de efeitos fisiológicos relacionados ao crescimento celular e envolvendo PGs. É possível que as HSP70 estejam envolvidas no bloqueio do ciclo celular na fase G1 promovido pelas CP-PGs e, portanto, poderiam ser proteínas reguladoras fisiológicas da progressão do ciclo celular (OHNO e cols., 1988; MAGER & MORADAS FERREIRA,

1993). As HSP e, em particular as HSP70, são marcadores universais do estresse celular induzido por uma série de fatores como choque térmico, metais pesados, análogos de aminoácidos, agentes oxidantes e substâncias teratogênicas (OHNO e cols., 1988b; SANTORO e cols., 1989; SCHLESINGER, 1990; AMICI & SANTORO, 1991).

Em resumo, é fato sabido que pacientes na fase final de câncer apresentam caquexia associada à imunossupressão, e que, considerando resultados anteriormente por nosso laboratório (KOLBERG e cols., 2005) é possível que uma das explicações para esta condição seja o acúmulo de CP-PGs nos linfócitos que, por outro lado não acumulam nas células tumorais. As CP-PGs, ainda, são sabidamente causadoras de estresse oxidativo por proporcionarem o acúmulo de GSSG, alterando o balanço redox, e ainda que as mesmas expressam proteínas de choque térmico uma vez internalizadas. O acúmulo, ou não, das CP-PGs pode ser devido a baixa expressão e/ou ineficiente atividade da MRP-1/bomba GSx. Considerados em conjunto os dados aqui apresentados nos propusemos a pesquisar os efeitos da bomba MRP-G sobre o balanço redox celular e a influência do balanço redox celular sobre a expressão e atividade da bomba MRP-GSx, e para tanto estabelecemos os objetivos como segue.

OBJETIVOS

Considerando-se que estudos de nosso grupo e de outros laboratórios demonstram que a MRP1/bomba GS-X é capaz de extrudar GS-conjugados, como GSSG, é possível que a mesma participe da regulação do estado redox intracelular, em condições em que as células estejam sob a ação de promotores de estresse celular. Assim sendo, nosso objetivo foi avaliar:

O papel da MRP1/bomba GS-X para a manutenção do estado redox de linfócitos, através do desafio com diversos agentes estressantes: xantina/xantina oxidase, prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs), em particular a PGA_2 , β -mercaptoetanol (β ME) e choque térmico, comparando-se com a atividade da bomba em células controle e células transfectadas com o gene MRP-1, (superexpressando a bomba). Além disso, foi avaliada a expressão de HSP70, a concentração de glutathiona GSH, glutathiona oxidada (GSSG) e a relação [GSSG/GSH], a viabilidade celular (como índice de citotoxicidade) e incorporação de Timidina [$2-^{14}C$] (como estimativa de capacidade proliferativa).

Os objetivos específicos do trabalho foram investigar:

1. A viabilidade de se transfectar linfócitos com o gene codificando para a bomba MRP1/GS-X e as condições experimentais para tanto;

2. A expressão e atividade da bomba MRP1/GS-X em linfócitos transfectados submetidos a diferentes fontes de estresse celular (como oxidativo e térmico);
3. A relação entre a expressão de proteínas de choque térmico e a resistência ao estresse celular em linfócitos transfectados com o gene da bomba MRP1/GS-X;
4. A resistência de linfócitos transfectados aos efeitos citostáticos e citotóxicos do tratamento com CP-PGs;
5. A resistência ao estresse oxidativo em células transfectadas.

Desta forma, pretendeu-se identificar como e em que magnitude a expressão da MRP1/bomba GS-X influencia o estado redox celular de linfócitos, e se o próprio estado redox intracelular poderia modular a expressão e/ou atividade da bomba.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagentes e Soluções

A Seção de Reagentes e Soluções encontra-se no Apêndice Final.

2. Animais

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) adultos (3-4 meses) machos, obtidos biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, pesando 250 ± 50 g e mantidos a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ sob um ciclo de claro/escuro de 12/12 h (lâmpadas fluorescentes acendendo às 07 h 00 min), foram utilizados. Os animais receberam, *ad libitum*, dieta comercial-padrão para ratos de laboratório contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lípidos, tendo tido livre acesso a água.

3. Preparações celulares de linfócitos de linfonodos mesentéricos de ratos

Para realização dos experimentos com linfócitos, foram ortotanasiados 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 e cols. (1993) e KOLBERG e cols. (2005). Primeiramente os ratos foram sacrificados através de

deslocamento cervical, mergulhados em copo de béquer contendo álcool 70% e levados para a capela de fluxo laminar para extração dos linfócitos. Com auxílio de uma tesoura e bisturi foi feito um corte na região abdominal retirados os linfonodos (tendo o cuidado para retirar a camada de gordura evitando-se assim a coagulação) os quais foram colocados em um béquer contendo PBS com antibiótico (em torno de 20ml).

A seguir, os linfócitos foram separados do tecido linfóide por esmagamento (em obtentor gradeado de tecidos), (VIEIRA e cols., 1992), filtrados em filtro de Whatmann, e centrifugados a $1000 \times g$ por 5min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, após quebra, submetido à solução de hemólise por 5 min, em banho de gelo 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% CO_2 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 e cols., 1993). A determinação da viabilidade celular, foi 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. Testes de viabilidade celular indicaram uma proporção sempre maior que 97% de linfócitos viáveis após 48 h de cultivo nestas condições.

3.1. Hemólise de eritrócitos contaminantes

Para a remoção de eritrócitos contaminantes de preparações de linfócitos, as suspensões celulares brutas foram centrifugadas ($1000 \times g$ por 5 min a 4°C) e os precipitados celulares ressuspensos em 10 ml (por 10^7 - 10^8 células) do tampão Tris 17 mM/ NH_4Cl 144 mM pH 7,4 e mantidos em banho de gelo no referido tampão por 5 min. Em seguida, as suspensões foram diluídas a 1:5 com 40 ml de PBS a 4°C e centrifugadas novamente. Este tipo de protocolo garante preparações celulares virtualmente isentas de eritrócitos, prestando-se, portanto, ao estudo acurado do metabolismo da glutatona, quando hemácias contaminantes representariam fonte considerável de erro.

4. Produção de bactérias competentes:

Os plasmídeos pRc-RSV (que contêm os genes da MRP 1), foram mantidos em bactérias *Escherichia coli* em temperaturas abaixo de -70°C ou N_2 líquido, sendo reproduzidos quando necessário. Para a produção de bactérias competentes para serem transfectadas com o gene da bomba MRP/GS-X por eletroporação, foi feito o seguinte:

1. Foi selecionado um grupo de células crescidas e esgotada em LB ágar com ampicilina. Após crescimento *overnight* à 37°C com a placa invertida.
2. Foi selecionada uma colônia isolada da placa e colocada para crescer em 150ml de LB líquido (com ampicilina) em um Erlenmeyer de 250ml, à 37°C com agitação vigorosa (>250 ciclos por minuto); sendo monitorado o crescimento pela determinação da $\text{O.D}_{600\text{nm}}$ (densidade óptica).

Para uma transformação eficiente, é essencial que o número de células viáveis não exceda 2×10^8 células/ml

3. Quando $O.D. + 0,5$ (mais ou menos 6 horas), a cultura foi resfriada em 0°C deixando os tubos em gelo por 10 minutos.
4. Assepticamente e em gelo as células foram transferidas para um tubo Falcon de 50 ml (estéril).

#Importante: todos os outros passos deste procedimento foram feitos assepticamente.

5. Foram centrifugadas a 4000rpm por 10min a 4°C
6. O sobrenadante foi descartado, deixando o *pellet* o mais seco possível e mantendo os tubos invertidos por 1min permitindo com que os últimos traços de meio fossem escorridos.
7. O *pellet* foi ressuspensão cuidadosamente (com a pipeta) em 5ml de 50 mM CaCl_2 gelado.
8. Manteve-se em gelo por 30min
9. Foi centrifugada a solução de células tratadas com CaCl_2 , a 4000 rpm por 5min a 4°C . Foi retirado o sobrenadante e mantidos os tubos invertidos por 1 min permitindo com que os últimos traços de meio fossem escorridos.
10. As células foram ressuspensas em 2ml de 50mM de CaCl_2 gelado. Após esta etapa juntou-se em um único tubo todas as alíquotas de células.
11. Na solução obtida adicionou-se $70\mu\text{l}$ de DMSO, misturando gentilmente, e as células foram mantidas no gelo por 15min, adicionados mais $70\mu\text{l}$ de DMSO e misturado gentilmente.

12. Dividiu-se a solução de células (300µl em tubos Eppendorf, sendo as células mantidas a -70°C ou N₂ líquido).

5. Purificação de DNA plasmideal a partir de 50ml cultura de *Escherichia coli*

A) PROCEDIMENTO

1. A cultura de bactérias competentes foi colocada para crescer (5 ml de meio LB, 50 µl de bactérias), adicionado 62,5 µl de ampicilina à cultura = CULTURA *OVERNIGHT* (9-16 h crescido em placa de Petri com antibiótico para selecionar as colônias; selecionada uma colônia única e preparado em meio líquido LB + ampicilina, *overnight* por 9-16 h).

2. Transferido 1 ml da cultura *overnight* para um balão de 250 ml, contendo 50 ml de meio LB e 625 µl de ampicilina e crescido novamente *overnight* com agitação vigorosa a 37°C.

3. Lida a absorbância a 600 nm, a qual deve estar em torno de 4/ml para a amostra concentrada (para ler no espectrofotômetro, a amostra foi diluída a 1:10 com água tomando 100 µl de suspensão e dispersando em 900 µl de água; a absorbância da amostra diluída apresentou-se em torno de 0,4).

LISE CELULAR

São transferidos 50ml da cultura "overnight" de *E.Coli* para um falcon de 50ml, e centrifugado a 7700 x g, por 10 minutos para peletar as células.

Nota: A velocidade apropriada de centrifugação pode ser calculada usando-se a seguinte formula: $RCF=(1.12)(r)(rpm/1000)^2$, onde RCF=força centrífuga relativa; r= radio medido do centro do eixo até o fundo do "bucket" e

rpm= revoluções por minuto. Para uma força de 7700 x g, onde r= 108mm, a velocidade apropriada seria de 8000 rpm.

À partir deste momento foram utilizados dois diferentes métodos de extração e purificação plasmideal: método de extração isopropanol-fenol-clorofórmio e *kit* de extração "*middi-prep*" (veja extração com *kit* de extração no Apêndice Final).

B) PRECIPITAÇÃO DO DNA PLASMIDEAL COM ISOPROPANOL-FENOL-CLOROFÓRMIO

16. Foi adicionado 1 volume de isopropanol ao lisado (sobrenadante), ou seja, 1 ml para cada ml de sobrenadante.

17. Foi misturado e mantido à temperatura ambiente por 15 min para permitir a precipitação do DNA plasmideal, o que deixa a solução turva.

18. O plasmídeo foi precipitado e centrifugando a 12.000 x g por 15 min ou 15.000 x g por 10 min à temperatura ambiente (20 – 25°C).

19 O sobrenadante foi aspirado e descartado.

20. Foi ressuspenso o precipitado plasmideal em 500 µl de TE pH 8,0.

21. Foram adicionado 500 µl de Fenol-Clorofórmio pH 7,5-8,0

Obs.: o pH alcalino é essencial para evitar-se o seqüestro do DNA plasmideal na fase orgânica – clorofórmio, que está na parte inferior do tubo.

22. Foi agitado em vórtex por 30 s.

23. Seguiu-se centrifugação a 15.000 x g por 2 min à temperatura ambiente (20 – 25°C).

24. Foi coletada a fase aquosa (que contém o plasmídeo) e transferido para outro Eppendorf.
25. Foram adicionados 500 µl de clorofórmio e a suspensão agitada em vórtex por 30 s

Obs.: o clorofórmio serve para remover o excesso de fenol.

26. Foi centrifugado a 15.000 x *g* por 2 min à temperatura ambiente (20 – 25°C).
27. Foi coletada a fase aquosa (que contém o plasmídeo) e transferida para outro Eppendorf.
28. Foram adicionados 2 volumes (cerca de 1 ml nesta preparação) de Etanol 95% gelado.
29. Foi agitado em vórtex por 5 s e deixado precipitando o plasmídeo no etanol por 10 min a –20°C (no freezer).
30. Foi centrifugado a 12.000 x *g* por 15 min ou 15.000 x *g* por 10 min a 4°C.
31. Foi desprezado o sobrenadante.
32. Foi ressuspenso o precipitado em 1 ml de Etanol 70% (v/v) e agitado em vórtex.
33. Foi centrifugado a 12.000 x *g* por 5 min ou 15.000 x *g* por 2 min a 4°C.
34. O sobrenadante foi desprezado.
35. Centrifugado por 10 s em microcentrífuga à temperatura ambiente para retirar qualquer líquido residual que pode ser removido por aspiração.
36. O precipitado foi secado à temperatura ambiente.
37. O plasmídeo dissolvido em 150 µl de TE pH 8,0.

Rendimento com as técnicas utilizadas:

Ambos os protocolos fornecem de 100 a 500 μg de DNA plasmideal para cada 50 ml iniciais de cultura de bactérias. A determinação da concentração de DNA foi feita em espectrofotômetro Amersham Biosciences Ultrospec 2000 (veja no Apêndice final).

Para transfecção transientes de células eucarióticas por eletroporação, usamos de **10–40 μg** de DNA por seção (1 cubeta de eletroporação contendo volume de 800 μl) (Potter e cols., 1984).

O rendimento de 100-500 μg de DNA plasmideal por frasco de 50 ml de cultura, em 250 ml de cultura obtido foi de 500-2500 μg de DNA. Em 500 μl de tampão de ensaio (TE) (1–5 mg de DNA/ml).

6. Produção de células competentes**PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE ELETROPORAÇÃO**

Partiu-se de uma cultura de linfócitos (obtida dos linfonodos mesentéricos de um *pool* de 4 ratos), mantida em frasco de 25 cm^2 de poliestireno (FALCON, Becton Dickinson, UK ou Corning, NY, USA) até a confluência (1 a 4 x 10⁷ células), descartado o sobrenadante (SN).

Adicionado 2 ml de Tripsina (0,05%) , incubado em atmosfera umidificada de 5% (v/v) de CO₂ em ar, numa estufa-incubadora (Harris, USA) estufa de CO₂, a 37°C, por 5 minutos, as células foram desprendidas do frasco por agitação , adicionados 15 ml de meio RPMI, e as células contadas em câmara de Neubauer (diluição de 1:100 com PBS e 1:1 com TripánBlue). Para uma eletroporação e transfecção eficiente a quantidade de células inicial deveria ser de 1 x 10⁷ células).

1. Padronizada a voltagem ideal:

- Utilizada cubeta de 800 μ l.
- Pipetados 800 μ l da suspensão celular nas cubetas e incubado em gelo por 10 minutos.
- Eletropulsadas as células em diferentes voltagens nominais: 500 volts, 1000 volts, 1500 volts, 2000 volts e 2500 volts.
- Para cada voltagem nominal utilizada, realizados 1, 2 e 3 pulsos.

2. Verificada a viabilidade celular tempo-pulso-dependente

- Após a identificação das voltagens ideais, eletropulsadas as células, e aliqüotadas 1ml da suspensão celular em cada poço de uma placa de 24 poços.
- Verificada a viabilidade celular em 24 horas, 48 horas, 72 horas, uma semana e duas semanas

7. 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 (linfócitos transfectados ou não) foram incubadas por diferentes períodos de tempo (15, 30, 45 e 60 min) na presença de 1-Cl-2,4-dinitrobenzeno 50 μ M (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, AWASTHI e cols., 1981 e 1991,

HENDERSON, e cols., 1994) que medeia a conjugação de moléculas de GSH com substâncias eletrofílicas.

O CDNB é uma substância altamente eletrofílica reagindo prontamente com GSH para produzir o conjugado (2,4-dinitrofenil)-S-glutationa (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 (veja figura abaixo com o esquema da reação intracelular, por favor). 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).

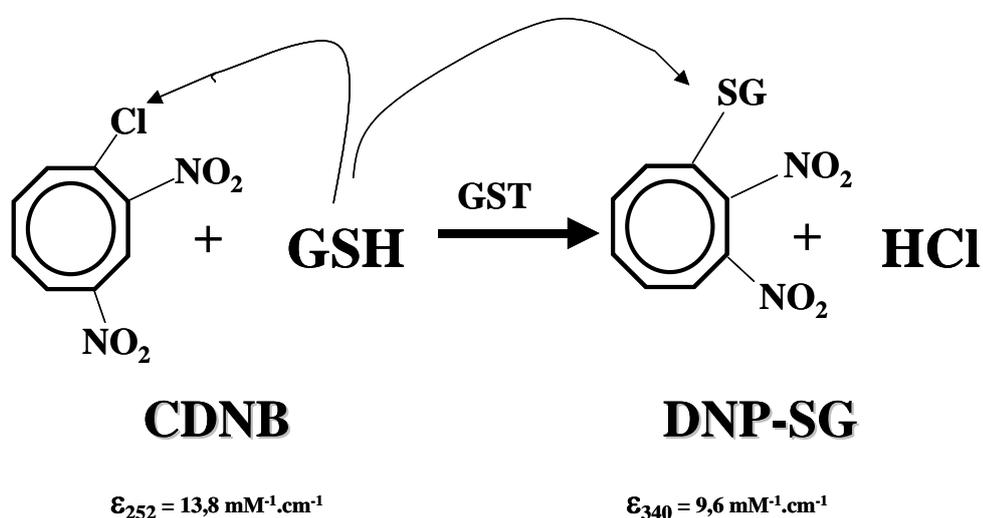


Figura 7. Esquema representativo da exportação de DNP-SG, mostrando a conjugação do grupo tiol (-SH), via GST. **GSH:** glutationa; **CDNB:** clorodinitrobenzeno **GST:** Glutationa S-transferase;; **DNP-SG:** (2,4-dinitrofenil)-S-glutationa

Para as incubações, foram preparados linfócitos de linfonodos mesentéricos 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 estiveram entre 2-3 horas.

Após as preparações, as células foram ressuspensas em 21 ml de solução HBSS e separadas 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 ($15.000 \times g$) 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 ($50 \mu\text{M}$) ou no veículo (PBS). Soluções-estoque de CDNB foram preparadas em etanol absoluto na concentração de 100 mM tendo sido utilizado $1 \mu\text{l}$ desta solução para cada 2 ml de solução final em PBS. Os tubos foram mantidos em banho-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 absorbâncias 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 glutathiona foram marcados com [2-³H]-glicina indicaram que as células estudadas sintetizam DNP-SG ([2-³H]-glicina) quando incubadas com CDNB (HOMEM DE BITTENCOURT e cols., 1998a). Também não foi observada 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 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 $\text{pmol}/\text{min}/10^6$.

8. Determinação do conteúdo intracelular de GSH e GSSG e relação [GSSG/GSH]

Para a determinação dos conteúdos intracelulares de glutathiona (GSH) e dissulfeto de glutathiona (glutathiona "oxidada", GSSG), as células (cerca $1 \text{ a } 4 \times 10^7$) foram lavadas duas vezes em PBS (4°C) e imediatamente rompidas em 200 μl de ácido metafosfórico 5% (m/v) com homogeneização por micropipeta para análise cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (=DTNB) e GSSG redutase (GSRd) de ANDERSON (1985). A rápida homogeneização das células 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, CARLBERG, 1985).

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), as células foram submetidas a incubação com tampão de hemólise para a retirada de eritrócitos contaminantes, como descrito anteriormente (item **3**), 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 glutatona "total" (GSH+ GSSG) medido em equivalentes de GSH 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 restituição 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 ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22$

mM⁻¹ .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 nmol) 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 700 µl de NADPH (concentração final 0,17 mM) e 100 µl de DTNB (final 1,26 mM), ambos em tampão fosfato de sódio 143 mM (pH 7,5), a cerca de 25 µl de amostra (em MPA 5%) num volume final 990 µl em cubeta de 1 cm de caminho óptico a 37°C, tendo sido registrada a absorbância a 412 nm em jaqueta termostatizada com aquisição direta e processamento cinético automático (em espectrofotômetro Gilford-Response I, Chicago 60609, USA) até a estabilização das leituras (12 min). Em seguida, foram adicionados 10 µl de GSRd (atividade final na cubeta de 0,5 U/ml) sob agitação e as amostras foram analisadas espectrofotometricamente a 412 nm por cerca de 20 min adicionais.

Antes da determinação do conteúdo de GSSG, alíquotas de 100 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, 35 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 20 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 μ M inibe o processo de dosagem da GSSG por reciclagem em até 30% foi efetuado por extração com 500 μ l de acetato de etila 3 vezes, tendo o excesso de solvente sido evaporado em concentrador SpeedVac e por passagem em corrente de nitrogênio. Posteriormente, cerca de 25 μ l de amostra foram ensaiados pelo método da reciclagem, como descrito para a GSH, exceto que as amostras foram inicialmente incubadas com a GSRd por 5 min a 37°C, tendo sido monitorada a absorbância a 340 nm (consumo de NADPH) até a estabilização. Depois, foi adicionado o DTNB e as leituras a 412 nm (produção de TNB) foram acompanhadas espectrofotometricamente conforme descrito acima. A diferença entre os valores obtidos para glutathiona "total" e GSSG forneceu os valores dos conteúdos de GSH procurados.

9. Expressão de proteínas de choque térmico (HSP) por *Western Blot*

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 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 (SIGMA HS1470) (hibridoma BRM-22) contra HSP70 humana (SIGMA - Amersham) que dá reação cruzada contra a proteína de rato, permitindo, assim, sua identificação (veja a seguir). Para a separação destas proteínas, foi aplicado o método de eletroforese em poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, Laemmli e cols., 1970), utilizando-se como amostras suspensões contendo linfócitos normais, e linfócitos transfectados com o gene MRP-1, contido no vetor pRc/RSV. 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 homogeneizadas e a quantidade total de proteína pudesse ser medida (BRADFORD, 1974). A seguir as preparações foram diluídas em tampão de amostra e quantidades iguais de proteína foram carregadas e submetidas a corridas eletroforéticas em cuba Mini-Protean II (Bio-Rad) conforme método SDS-PAGE descrito no apêndice.

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

Para o *Western blotting* das HSP70, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 h sob agitação enérgica em tampão de bloqueio a 0,05% (v/v) na presença de anticorpo monoclonal BRM-22 de ascite de camundongo, 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, as membranas foram lavadas três vezes sob agitação por 10 min com 5 ml de TEN-Tween e incubada por 1 h com 5 ml de solução contendo o segundo anticorpo, de coelho contra IgG

de camundongo conjugado a peroxidase de rabanete (Sigma A 9044) 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%, ou reveladas pela técnica de ECL (veja no apêndice). 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.

10. Expressão de HSP70 e MRP1 em linfócitos transfectados com o gene MRP1 na presença de PGA₂

A TRANSFECCÃO DOS LINFÓCITOS FOI EFETUADA EM ALÍQUOTAS DE 10⁷ CÉLULAS (em 500 µl) POR VEZ;

As cubetas de eletroporação estéreis foram colocadas em gelo na câmara de fluxo laminar, por 10min;

Foram pipetados cerca de 500 µl de suspensão celular, contendo aproximadamente 1,0 x 10⁷ linfócitos (o volume exato dependeu de cada preparação), nas cubetas de eletroporação, ainda em gelo, na câmara de fluxo laminar;

Foram pipetados de 50 a 100 µl de DNA plasmideal (contendo os 10 µg de DNA necessários por transfecção), sobre as células nas cubetas, isto é, um volume calculado a partir de uma solução de DNA com concentração girando em torno de 100 a 200 µg de DNA plasmideal purificado por ml = 01-0,2 mg/ml). As células

controle (que não receberam o DNA) foram eletropulsadas com volume equivalente de TE estéril ou meio de cultura;

Secadas as cubetas externamente com papel-toalha e eletropulsadas as células a 1500 V nominais (400 V reais);

Anotada a voltagem, real e o tempo de eletroporação que são determinados automaticamente pelo aparelho Eppendorf;

As células eletroporadas foram diluídas imediatamente (na câmara de Fluxo Laminar) com um volume de 20 x (10 ml no presente caso) de meio de cultura RPMI 1640, utilizando-se dos tubos Falcon de 50 ml previamente preparados = para as placas de 24 poços, sendo 12 controles (sem DNA; só chocadas) e 12 efetivamente transfectadas, foram preparados 2 tubos Falcon de 50 ml contendo previamente 40 ml de meio RPMI sem soro, cada. A cada eletropulso as células (controles ou transfectadas) foram transferidas para os respectivos tubos e dispersadas no meio de cultura com o auxílio de uma pipeta automática com ponteira cortada (estéril).

Deixadas as células repousando por 10 min à temperatura ambiente; os dois Falcon de 50 ml (contendo cerca de 47 ml cada) a 1.000 x g por 5 min à temperatura ambiente;

Descartado o sobrenadante na câmara de fluxo laminar e ressuspensas as células em 13,0 ml (por tubo) de meio RPMI 1640 contendo 10% SFB e 3 µg/ml de Con A (a mistura contendo Con A e SFB em meio de cultura foi preparada durante a centrifugação das células). A mistura de meio continha 26 ml para os dois tubos: 2,6 ml de SFB inativado pelo calor, 156 µl Con A à 500 µg/ml estéril e 23,24 ml de meio RPMI 1640;

À medida em que as células foram sendo transfectadas, as células foram transferidas para Tubo Falcon de 50 ml contendo apenas meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO BRL Life Technologies Ltd. USA) contendo L-glutamina 2 mM;

Depois que todas as alíquotas foram transfectadas e repousarem por 10 min à temperatura ambiente, as mesmas foram somadas na mesma placa de 25 cm² onde foram pré-incubadas (por 2 h) para serem cultivadas por 24 h na presença de Con A;

Cultivados os linfócitos na mesma garrafa (contendo os macrófagos) onde as células foram pré-incubadas para a adesão de dos mesmos.

Após o cultivo, as células foram ressuspensas (POR INVERSÃO, NAS PRÓPRIAS GARRAFAS) e transferido o conteúdo de cada garrafa para um Falcon de 15 ml para centrifugação;

Centrifugadas as células por 10 min a 1000 x *g* à temperatura ambiente;

Ressuspensão o conteúdo de cada tubo DELICADAMENTE com a mão com 13 ml de meio (sem soro nem nada) = 13 alíquotas de 1,0 ml de células a serem semeadas nas placas de 24 poços por grupo (controle/DNA);

Avaliada a contagem total e viabilidade celular na alíquota restante dos 13 ml;

Foram semeadas cuidadosamente (AGITANDO POR INVERSÃO O TUBO A CADA PIPETADA) as alíquotas de 1,0 ml (contendo cerca de 10⁷ linfócitos cada) em cada poço;

Adicionados 10µl da solução de SBF+ConA (226µl SFB + 24µlConA) a cada poço e a prostaglandina A₂ nas concentrações de 0µM, 10µM e 40µM, tanto para as células controle quanto para as

transfectadas, e tanto para cultivo por 6 horas (**Fig. 8**) quanto por 24 horas (**Fig. 9**).

PLACA 1

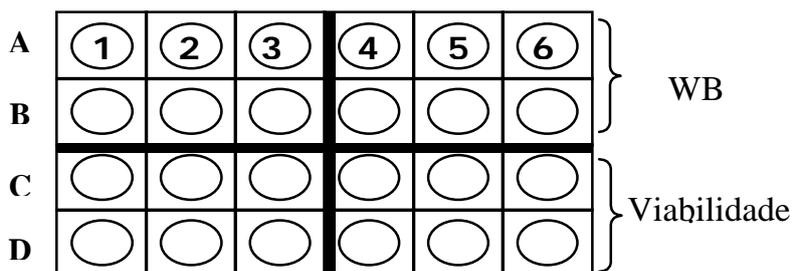


Figura 8. Desenho esquemático da distribuição experimental. **1**-Linfócito controle; **2**-Linfócito controle mais PGA_2 10 μM ; **3**-Linfócito controle mais PGA_2 40 μM ; **4**-Linfócito Transfectado Controle; **5**-Linfócito Transfectado mais PGA_2 10 μM ; **6**-Linfócito transfectado mais PGA_2 40 μM . **A**-Amostras para medida de expressão de HSP70 por *Western Blot*; **B**-Amostras para medida de expressão de MRP1 por *Western blot*; **C**-Amostras para medida de incorporação de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$]; **D**-Amostras para medida de captação e incorporação de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$], para **Placa 1**, coletada após 6 horas de incubação.

Após 6 horas, foi coletada a suspensão dos 6 primeiros poços agitando com pipeta, e foi transferido para tubo de centrifuga (*ependorf*) de 2ml, os poços foram lavados 1 x com PBS o qual foi transferido para o mesmo tubo. Os tubos foram centrifugados a 16000G 2min, e homogeneizado o *pellet* em 100 μl SDS 0,1% + leupeptina + 1 μl PMSF.

Foi medida a concentração de proteínas na leitora de Elisa, adicionado *sample buffer* e as amostras foram fervidas 5 min para posterior western blott (Apêndice Final) .

Após 24 horas, foi verificada a viabilidade celular, que esteve em 1 a 2 x 10^7 células, e foi adicionada Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$] (código Amersham CFA 219), 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$ para um *pool* de 1 a 2 x 10^7

células, aguardou-se 12 horas (ou mais) e foi adicionado TCA (método descrito a seguir) para medida da incorporação.

Para a Placa 2 (**Fig 9.**) aguardou-se 24 horas, e foram repetidos todos os passos necessários para preparação das amostras, tanto para western blot (medida de expressão de HSP70 e MRP1), quanto para viabilidade (medida da incorporação da Timidina).

PLACA 2

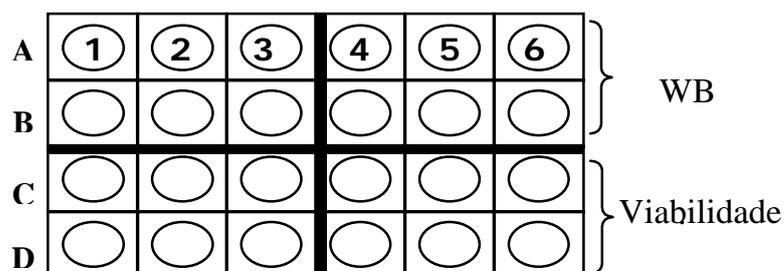


Figura 9. Desenho esquemático da distribuição experimental. **1**-Linfócito controle; **2**-Linfócito controle mais PGA_2 10 μM ; **3**-Linfócito controle mais PGA_2 40 μM ; **4**-Linfócito Transfectado Controle; **5**-Linfócito Transfectado mais PGA_2 10 μM ; **6**-Linfócito transfectado mais PGA_2 40 μM . **A**-Amostras para medida de expressão de HSP70 por *Western blot*; **B**-Amostras para medida de expressão de MRP1 por *Western blot*; **C**-Amostras para medida de incorporação de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$]; **D**-Amostras para medida de captação e incorporação de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$], para **Placa 2**, coletada após 24 horas de incubação.

11. Efeito da Xantina/Xantina Oxidase sobre a expressão de HSP70 e MRP1

À partir de cultura de linfócitos, transfectados e controle (veja método 6), e após 24 horas em concanavalina A (ConA), a suspensão foi centrifugada, 1000g x 10 min, descartado o sobrenadante e as células ressuspensas em 13ml de meio RPMI 1640 (GIBCO BRL Life

Technologies Ltd. USA) contendo L-glutamina 2 mM, e distribuídas como mostrado na **Fig. 10**:

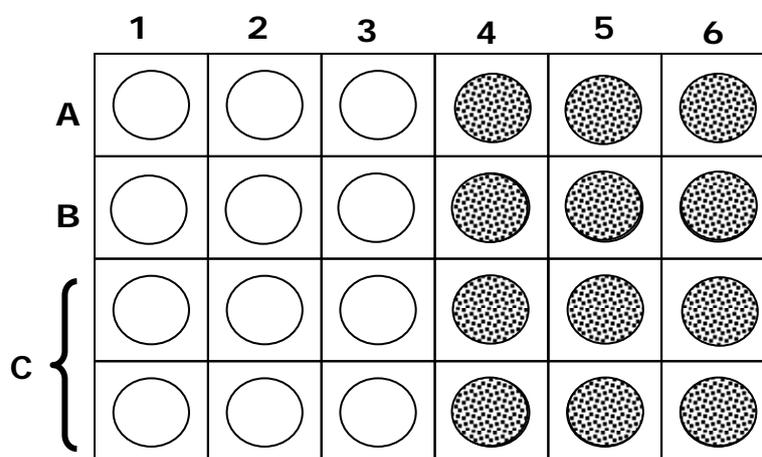


Figura 10. Desenho esquemático da distribuição experimental. **1**-Linfócito controle; **2**-Linfócito controle mais xantina/xantina oxidase;**3**-Linfócito controle mais xantina/xantina oxidase/SOD;**4**- Linfócito Transfectado Controle;**5**-Linfócito Transfectado mais xantina/xantina oxidase;**6**- Linfócito transfectado mais xantina/xantina oxidase/SOD. **A**-Amostras para medida de expressão de HSP70 por *Western blot*; **B**-Amostras para medida de expressão de MRP1 por *Western blot*; **C**-Amostras para medida de concentração de GSH, GSSG e da relação [GSSG/GSH].

1. Primeiramente foi adicionada a superóxido dismutase (SOD), 40µl da solução (15000U/ml) aos 2ml de cada poço, exceto os controle;

2. A seguir, foram adicionados 20µl de Xantina 0,004 V/ml final (SIGMA -69-89-6) (2,25mM em NaOH 1mM);

3. Por fim, foram adicionados 20µl de Xantina Oxidase 0,004 v/ml final (SIGMA 9002-17-9), para dar o *start* na reação;

4. Após 30 min, aspirados os poços reservados para MPA, e transferidos para tubos de centrifuga (ependorf), lavado uma vez o poço com PBS e transferido para o tubo, centrifugar 1600G 2min, quebrado o *pellet* e ressuspenso em 200µl MPA 5%, para medida de concentração de GSH, GSSG e[GSSG/GSH].

5. Foi utilizado o mesmo procedimento com os poços reservados para western blot, aspirados os poços, lavados 2x com

PBS, centrifugados a 16000G por 2 min e ressuspensos em meio RPMI + SFB 10% em placa nova, incubado por 6 horas.

6. Após as seis horas, aspirado o conteúdo dos poços, lavado uma vez com PBS, transferindo para eppendorf de 2ml, centrifugada a 16000G por 2 min, homogeneizado o *pellet* e ressuspensão em 100 μ l de SDS + Leupeptina + 1 μ l PMSF.

7. Foi medida concentração de proteínas na leitora de Elisa, adicionado *sample buffer* e fervido 5 min, para posterior western blott (veja no Apêndice Final) .

12. Efeito da Xantina/Xantina Oxidase + β ME na expressão de HSP70

A partir de cultura de linfócitos transfectados e controle (veja método 6), e após 24 horas em concanavalina A (ConA), a suspensão foi centrifugada a 1000g por 10min, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 13ml de meio RPMI 1640 (GIBCO BRL Life Technologies Ltd. USA) contendo L-glutamina 2 mM, e distribuídas como mostrado na **Fig. 11**:

Objetivo: Verificar a resposta celular ao agente redutor β ME

Soluções e preparações:

β ME = Peso Molecular (MW) 78,13 g/mol

ρ (densid.) = 1,12g/ml

volume final 0,5 ml \rightarrow usando 10 μ l \rightarrow 50X \rightarrow 1mM final

preparar 50mM e 25mM e 10mM

50mM = 50 μ mol/ml x 78,13 μ g/ μ mol = 3,907mg/ml

$$\rho \text{ (densid.)} = 1,12\text{g/ml} \rightarrow 1,12\text{mg} \text{ — } 1\mu\text{l}$$

$$3,907\text{mg} \text{ — } x = 3,49\mu\text{l}$$

Preparação = 996,5 μl Meio RPMI e 3,49 μl βME = 50mM
 \rightarrow 1:1 meio \rightarrow 25mM \rightarrow 1:5 \rightarrow 10mM

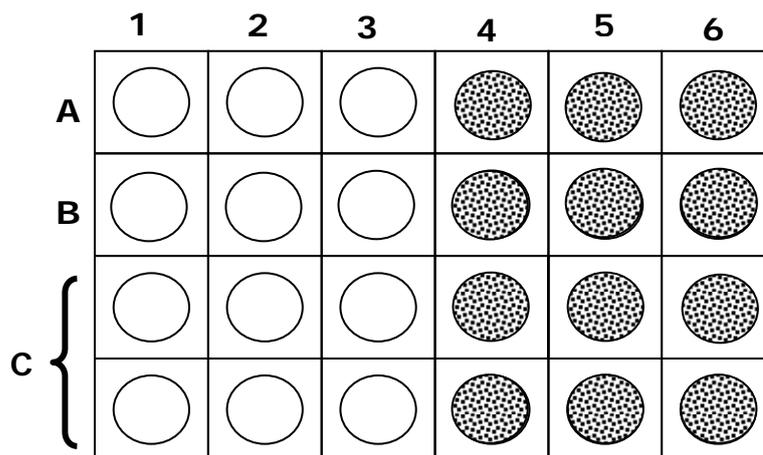


Figura 11. Desenho esquemático da distribuição experimental. **1**-Linfócito controle mais xantina/xantina oxidase/ βME 10mM; **2**-Linfócito controle mais xantina/xantina oxidase/ βME 25mM; **3**-Linfócito controle mais xantina/xantina oxidase/ βME 50mM; **4**-Linfócito Transfectado mais xantina/xantina oxidase/ βME 10mM; **5**-Linfócito Transfectado mais xantina/xantina oxidase/ βME 25mM; **6**-Linfócito transfectado mais xantina/xantina oxidase/ βME 50mM. **A**-Amostras para medida de expressão de HSP70 por *Western blot*; **B**-Amostras para medida de expressão de MRP1 por *Western blot*; **C**-Amostras para medida de concentração de GSH, GSSG e da relação [GSSG/GSH].

1. Primeiramente, foi adicionado o βME para cada poço, nas concentrações indicadas, após foi adicionada a xantina, e por último foi dado o *start* na reação com xantina oxidase.

3. Após 30 min o conteúdo dos poços foi aspirado, os poços lavados duas vezes com PBS, sendo o lavado transferido para tubo de 2ml (*ependorf*), foi centrifugado a 16000G por 2 min, o *pellet* foi homogeneizado e ressuspensão em 100 μl de SDS + Leupeptina + 1 μl PMSF.

4. Foi medida concentração de proteínas na leitora de Elisa, as amostras foram padronizadas, adicionou-se *sample buffer* e, as mesmas foram fervidas 5 min, para posterior western blott (ver Apêndice Final) .

13. Efeito do choque térmico na expressão de HSP70 e MRP1

A partir de uma cultura de linfócitos, transfectados e controle (veja método 6), e após 24 horas em concanavalina A (ConA), a suspensão foi centrifugada, 1000g x10min, descartado o sobrenadante e as células ressuspensas em 13ml de meio RPMI e distribuídas como mostrado na **Fig. 12**:

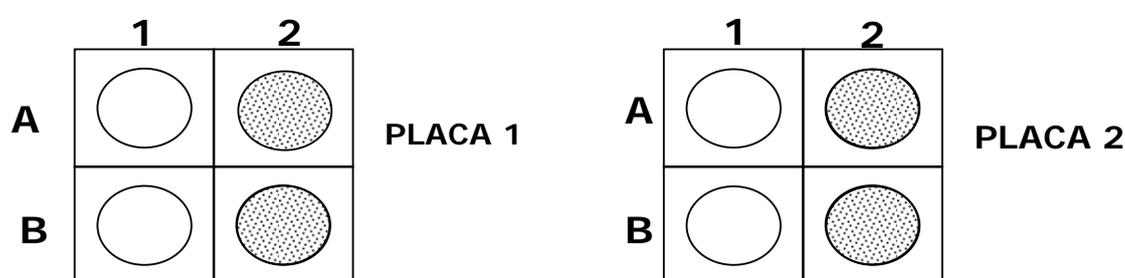


Figura 12. Desenho esquemático da distribuição experimental. **1**-Linfócito controle **2**-Linfócito transfectado **A**-Amostras para medida de expressão de HSP70 por *Western blot*; **B**-Amostras para medida de expressão de MRP1 por *Western blot*; **Placa 1**-um choque térmico de 42°C, por duas horas; **Placa 2**-um choque térmico de 42°C, por duas horas, e outro choque térmico 24 horas após o primeiro;

1. As placas 1 e 2 foram submetidas, a choque térmico de 42°C por duas horas;
2. Seguiu-se incubação por 6 horas em estufa de CO₂ 5%, a 37°C.

3. Após 6 horas a suspensão da placa 1 foi coletada, sendo agitada com pipeta, o poço foi lavado 1 x com PBS e transferido tudo para tubo de 2ml (*eppendorf*);

4. Seguiu-se centrifugação a 16000G por 2min;

5. O *pellet* foi homogeneizado em 100 μ l de SDS 0,1% + Leupeptina + 1 μ l de PMSF;

6. A concentração de proteínas foi medida na leitora de Elisa, as amostras foram padronizadas, adicionou-se sample buffer e, as mesmas foram fervidas por 5 min, para posterior western blott (ver Apêndice final) .

7. Após 24 horas, a viabilidade foi medida (em torno de 1 a 2 x 10⁷ células);

8 . Foi adicionada Timidina 0,1 μ Ci/ml para um *pool* de 1 a 2 x 10⁷ células ;

9. Foi adicionado o TCA (método a seguir) e realizada a leitura da incorporação.

10. 24 horas após o primeiro choque, foi realizado o segundo choque na placa 2, de 42°C por duas horas, e incubado em estufa de CO₂ 5%, a 37C, após 6 horas de incubação procedido da mesma forma como os passos 3 a 9 realizados com a placa 1.

14. Preparações celulares para avaliação da taxa de captação e incorporação de Timidina [2-¹⁴C]

Princípio: Tendo em vista que, dos 5 nucleotídeos componentes de ácidos nucleicos (A, C, G, T e U), somente a timidina (T) é incorporada **apenas** em DNA, a incorporação da mesma em células fornece pistas sobre a atividade de síntese de DNA.

Linfócitos obtidos de linfonodos mesentéricos de um *pool* de 4 ratos (crescendo aderidos às placas), foram cultivados em meio

RPMI, adicionado de 10% (v/v) de soro fetal bovino em placas de cultura estéreis de 24 poços (para experimentos com PGA) ou 4 poços (para experimentos com choque térmico).

A Timidina [**2-¹⁴C**] foi diluída em PBS ou meio de cultura a **10 μ Ci/ml** (para utilizar 50 μ L/500 μ L finais em placas de 24 poços, ou 200 μ L/2 mL finais em placas de 6 poços, concentração final 0,1 μ Ci/mL ou 0,02 μ Ci/well

Para os experimentos com concanavalina A (con A) a mesma foi preparada em meio estéril (em meio de cultura); solução-mãe a 500 μ g/ml. Como a concentração final da lectina (con A) deve ser 5 μ g/ml (acima do que ocorre perda de viabilidade de linfócitos), a diluição da solução-mãe foi realizada diretamente no meio de cultura a 1:100 (100 μ L de con A para 10 ml finais de meio com SFB); posteriormente a solução-mãe foi diluída 1:5 com meio de cultura (por exemplo, 200 μ L de con A concentrada + 800 μ L de meio) e, em seguida 1:20 já nas placas (por exemplo, **25 μ L** da solução diluída a 1:5 + 475 μ L de meio contendo os demais aditivos, ou, ainda, 100 μ L da solução diluída 1:5 + 1900 μ L de meio contendo os demais aditivos)

Os linfócitos ativados com Con A foram obtidos pela adição da lectina como descrito acima, enquanto que as células controle (quiescentes) receberam quantidades idênticas de meio. Excetuando-se o pulso de timidina [2-¹⁴C], todas as adições celulares foram realizadas no início das culturas. Depois dos períodos de incubação/cultura prévios, as células receberam um pulso de timidina (timidina [2-¹⁴C] 0,02 μ Ci/poços e foram cultivadas por **15 h adicionais**. Depois deste período, as células foram coletadas para a avaliação da incorporação de timidina[2-¹⁴C].

Neste caso, a coleta de células foi feita automaticamente em um coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, Suffolk, UK) e papéis-de-filtro cat. Nº 1731 (Skatron Combi, Suffolk, UK), não

havendo necessidade de processos extrativos preparatórios para a obtenção do DNA celular. Os discos de papel contendo a radioatividade incorporada no DNA das células (apenas a fração insolúvel em TCA) foram levados para contagem em 5 ml de coquetel de cintilação hidrossolúvel.

Filtração em sistema Manifold Millipore®.

Após a incubação em TCA a 10% por 1 h, o material foi centrifugado (15.000 x g por 5 min) e foi efetuada a coleta de alíquotas de volume conhecido do sobrenadante (por exemplo 450 µL de 500 mL) para a determinação da radioatividade incorporada ao material solúvel em TCA (timidina captada mas não incorporada ao DNA) como na preparação anterior. Neste caso, entretanto, a suspensão foi agitada em vórtex e o precipitado (os tubos *Eppendorf* foram lavados com TCA 5% para retirar qualquer resíduo de material) foi transferida para o sistema Millipore equipada com membranas (0,45 µm) de nitrocelulose. Em seguida, as amostras foram lavadas por três vezes com volumes de 5 mL TCA 5% e deixadas secar na linha de vácuo do sistema até o final. Após, as membranas (filtros) foram transferidas diretamente para os vials para contagem da radioatividade incorporada em 1,5 mL de líquido de cintilação.

Cálculo da taxa de captação/incorporação de timidina em DNA

A estimativa das alterações na incorporação de timidina marcada no DNA das células foi feita diretamente a partir das contagens em cpm ou dpm e expressas pelo número de células estudadas por well. Exemplo: 3.450 cpm/10⁵ células. Embora a incorporação de timidina em DNA seja o resultado pretendido, não se pode deixar de compará-la com a CAPTAÇÃO TOTAL = (TIMIDINA CAPTADA + TIMIDINA INCORPORADA EM DNA) uma vez que as

células como um todo podem apresentar uma falsa incorporação alta (alta captação e baixa incorporação em DNA) caso as células como um todo sejam medidas. Ao contrário, baixas incorporações podem, na verdade constituir-se baixa captação e não baixa incorporação em DNA.

Valores de referência (n=12):

Linfócitos quiescentes: 389 ± 56

Linfócitos estimulados com Con A: 4105 ± 531 (10,55 x em relação aos controles)

15. Cálculo das concentrações de proteínas nas amostras analisadas

Na determinação das concentrações de proteínas nas amostras, quando demandado em cada caso, foram utilizados os métodos de BRADFORD (1976) e de LOWRY e cols. (1951), conforme indicado. Em ambas as determinações, foram utilizadas 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 e cols.. Este, por sua vez, baseia-se na ligação do reagente de Folin-Ciocalteu 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. Por outro lado, em amostras contendo dodecilsulfato de sódio (SDS), EDTA, EGTA, sacarose, Triton X-100 e Tris, devido à razoável interferência apresentada, optou-se pela utilização do método de LOWRY e cols..

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, Tukey-Kramer ou Bonferroni para análise de variância.

RESULTADOS

1. Transfecção

Determinação da voltagem e número de pulsos

Um fator crítico na transfecção de células eucarióticas é a escolha do procedimento de transfecção celular. O procedimento deve apresentar eficiência e não deixar resíduos, já que as células devem ser preparadas e posteriormente submetidas à presença de substâncias oxidantes e redutoras, com a finalidade de determinar a resposta de manutenção do estado redox celular.

Das várias técnicas disponíveis, escolhemos a eletroporação por ser limpa, rápida e apresentar um rendimento razoável em termos de μg de DNA/número de células expostas. A eletroporação consiste num pulso elétrico rápido (8 ms, constante determinado pelo aparelho, *Eppendorf*) aplicado às células em suspensão de sorte que as células ficam altamente despolarizadas com abertura de todos os canais iônicos e com exposição do intracelular ao meio externo durante este período de tempo. Como o DNA é negativo, migra rapidamente pela diferença de potencial eletroquímico estabelecido. Contudo, uma limitação da técnica é a voltagem a ser aplicada: quanto maior, melhor a eficiência. No entanto, quanto maior, maior a taxa de mortalidade celular.

Para testar qual a melhor voltagem para transfecção de linfócitos foram utilizadas entre $1,0$ à $3,5 \times 10^7$ células, obtidas de

linfonodos mesentéricos e ressuspensos em 4ml de meio RPMI1640 (sem soro). Esta suspensão era fracionada em 500 μ l, as células contadas e, depois, eletroporadas com diferentes voltagens. Iniciamos com 40 V até 1500 V. Após, dividíamos as células vivas pelo somatório entre vivas e as mortas, obtendo a porcentagem de células vivas (**Fig. 7**). Desta forma ficou determinado que 400 V de diferença de potencial real (não a nominal aplicada no aparelho) representava o máximo de voltagem a ser aplicado sem comprometimento da viabilidade celular.

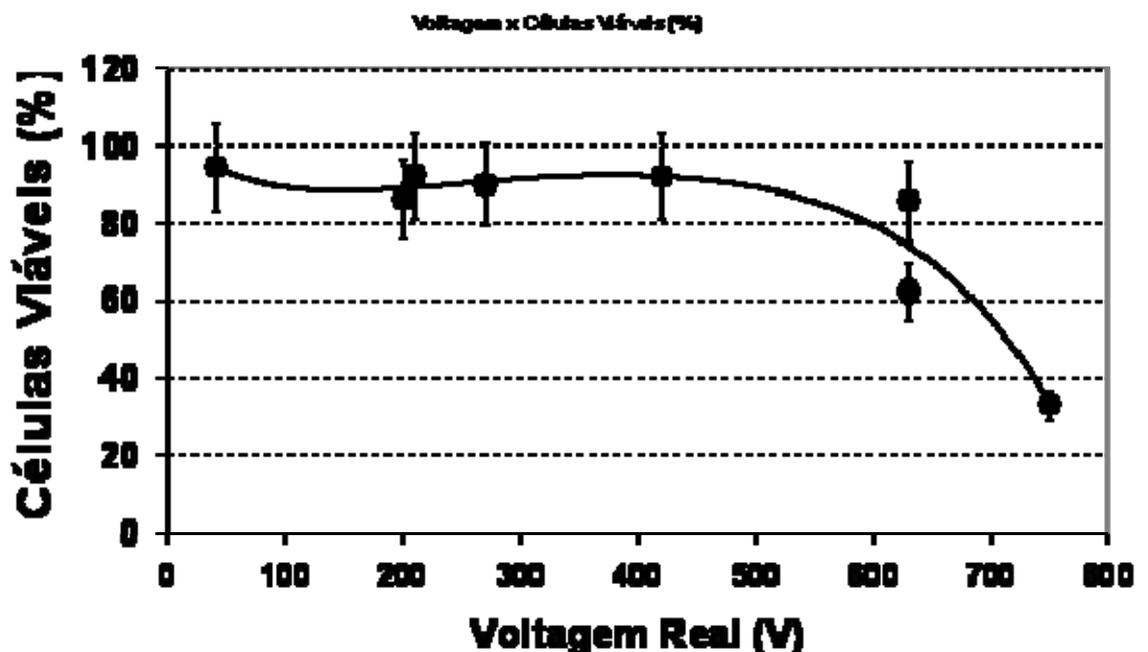


Figura 7. Viabilidade celular de linfócitos (10^7 em 0,5 ml de meio de cultura RPMI1640) transfectados por eletroporação com o gene MRP-1 contido no vetor pRc/RSV a várias voltagens diferentes, conforme descrito em Materiais e Métodos, imediatamente após a transfecção.

Além da voltagem, o número de pulsos também foi testado. Para tanto foi repetido o procedimento descrito anteriormente, utilizando-se voltagem programada de 250 a 1200 V, aplicando-se um, dois e três pulsos, verificando-se o percentual de células vivas, usando o mesmo critério já descrito. Os resultados obtidos demonstraram que a melhor viabilidade é obtida quando aplicamos apenas um pulso elétrico com voltagem de 400V (voltagem real). Podemos observar que quando aplicamos dois pulsos o percentual de células viáveis tende a aumentar, porém não ultrapassa 40%. Quando foram aplicados três pulsos a viabilidade diminui aproximando-se de zero (**Fig. 8**).

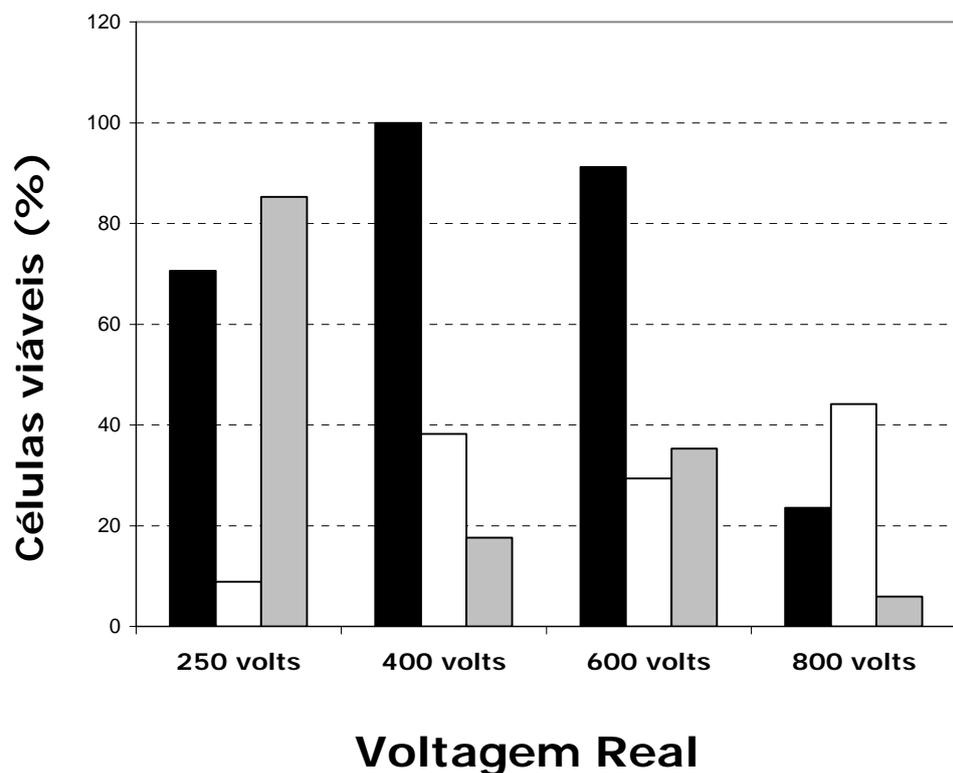


Figura 8 - Viabilidade celular de linfócitos (10^7 em 0,5 ml de meio de cultura RPMI1640) transfectados com o gene MRP-1 contido no vetor pRc/RSV, por eletroporação, com ■ - 1 eletropulso; □ - 2 eletropulsos; e ▒ 3 eletropulsos de 250, 400, 600 e 800 volts de voltagem real ;, sendo da diferente número de pulsos, conforme descrito em Materiais e Métodos, imediatamente após a transfecção. (gráfico representativo de 4 experimentos)

Determinação da efetividade da transfecção

Segundo a literatura, transfecções eficientes são obtidas utilizando-se, para transfecção transiente, uma relação de 10 a 40 μg de plasmídeo para 1 a 2 $\times 10^7$ células (POTTER *et al.*,1984) . Para verificação da eficiência da transfecção, foram tomadas entre 1,0 à 3,5 $\times 10^7$ células, obtidas de linfonodos mesentéricos e ressuspensos em 4ml de meio RPMI1640 (sem soro). Esta suspensão dividida em 500 μl separada em dois grupos, controle e transfectadas. O grupo controle foi eletroporado a 400 V, em um dois e três pulsos (choques). O grupo transfectado recebeu o plasmídeo pRc-RSV na proporção de 40 μg para 1,28 $\times 10^7$ células, sendo eletroporado com 400 V em um dois e três pulsos.

Os linfócitos foram então incubados por 24 horas na presença de conA, conforme descrito no capítulo de métodos, e a determinação da eficiência da transfecção foi realizada por *Western Blot*, utilizando-se 5 μl de anticorpo monoclonal Anti-MRP1 (M9192 SIGMA). O grupo transfectado utilizando-se um pulso apresentou uma expressão de MRP1 34%, maior que o grupo controle eletroporado com apenas um pulso, e 21% maior, $p < 0,05$, que o grupo transfectado com dois pulsos.(Fig. 9).

EXPRESSION DE MRP EM LINFÓCITOS CONTROLE E TRANSFECTADOS

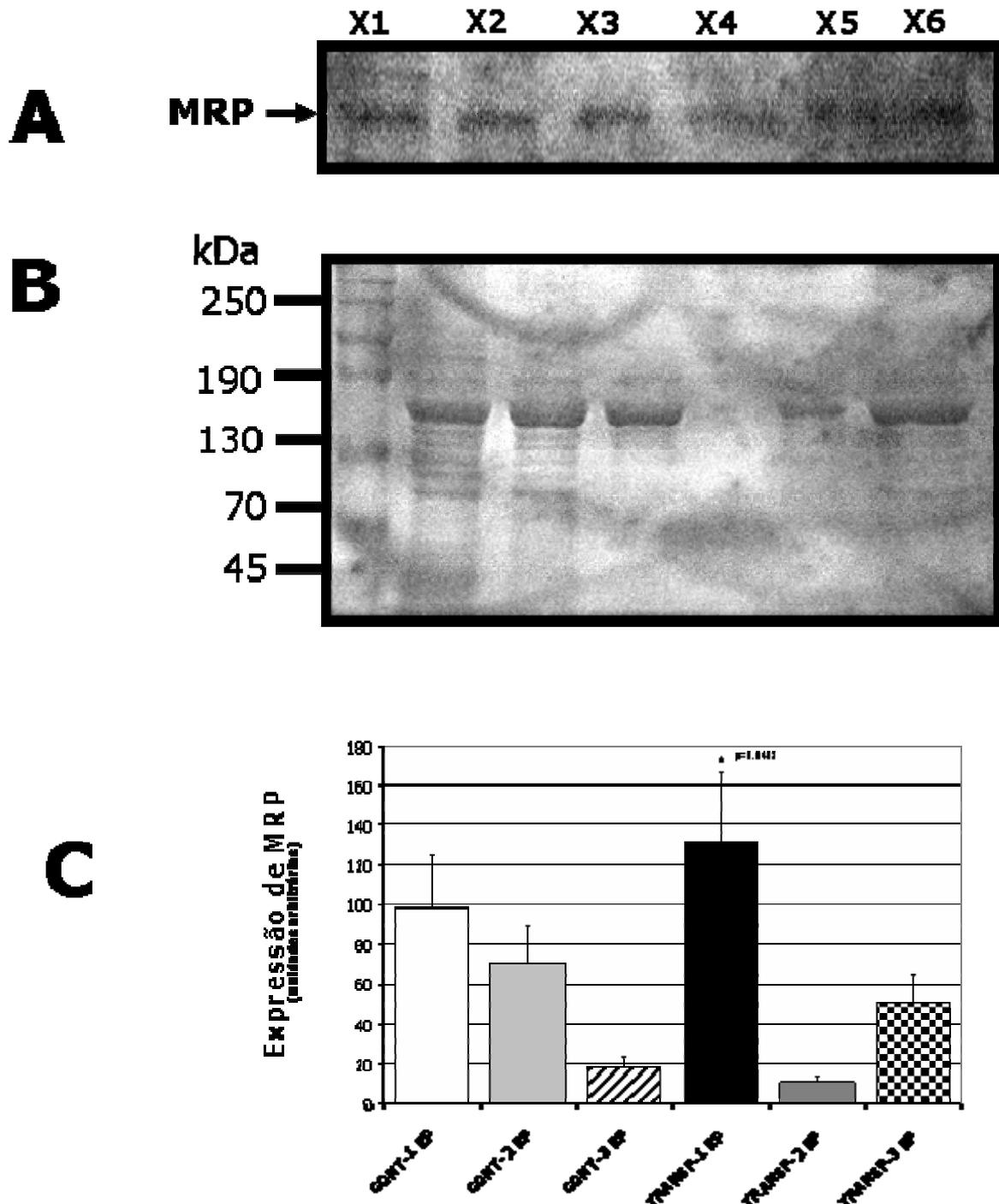


Figura 9 – Expressão de MRP1 em Linfócitos controle e transfetados com o com o gene MRP-1 contido no vetor pRc/RSV, X1–células controle um eletropulso; X2– células controle dois eletropulsos; X3–células controle três eletropulsos; X4–células transfetadas um eletropulso; X5– células transfetadas dois eletropulsos; X6– células transfetadas três eletropulsos. Em **A**, tem-se a análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a western blot como descrito. Em **B**, tem-se um gel representativo corado com Commassie Blue e, em **C**, os valores arbitrários da expressão da MRP-1. $p < 0,05$ Gráfico representativo de 2 experimentos, cada um em duplicata. Análise estatística por teste T de *student*.

2. Expressão de Proteínas de Choque Térmico HSP70 em Linfócitos Controle e Transfectados, na presença de Prostaglandina A₂

Prostaglandinas A₂ (PGA₂) são substâncias sabidamente eletrofílicas, e portanto, de fácil conjugação com substâncias doadoras de elétrons (por exemplo glutathiona). A presença destas prostaglandinas pode causar dano celular, pois além de conjugar-se com a glutathiona depletando-a e, conseqüentemente, diminuir a resposta ao estresse oxidativo celular, esta substância é também antiproliferativa, agindo na fase G1 para S do ciclo celular, impedindo a divisão. Quando ocorre a presença de PGA₂ intracelularmente, vários fatores de resposta ao estresse são ativados, entre estes a produção de proteínas de choque térmico (HSP).

A expressão de HSP70 (proteína de choque térmico de 70 kDa) foi analisada em linfócitos controle e transfectados, na presença de PGA₂ nas concentrações de 10 µM e 40 µM, seis horas e vinte e quatro horas após a incubação.

Foram utilizadas $2,65 \times 10^7$ células de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos, ressuspensas em 13ml de meio RPMI1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, mantidas por duas horas em estufa para adesão dos macrófagos. Após este período as células controle foram eletropulsadas com um pulso de 400 V, e as células transfectadas receberam 44,5 µg de plasmídeo pRc-RSV, contendo o gene da MRP1, e posteriormente foram eletropulsadas com um pulso de 400 V. Ambos os grupos foram incubados em presença de concanavalina A por 24 h. Após este período os grupos foram incubados

na presença de Prostaglandina A₂, nas concentrações de 10 μM e 40 μM (conforme descrito no capítulo de métodos), por 6 e 24 horas.

Nas incubações com 6 horas, as células não transfectadas, incubadas com PGA₂ 10μM, quando comparadas com seu respectivo controle, tiveram um aumento na expressão de HSP70 (em torno de 11%). Já com 40 μM, houve queda da expressão (em torno de 30%; p=0,0812), o que pode ser atribuído a morte celular, já que esta concentração é extremamente tóxica para linfócitos (Homem de Bittencourt e cols., 1998b,c).

Por outro lado, as células transfectadas, incubadas com PGA₂ 10μM, quando comparadas com seu respectivo controle apresentam uma ligeira queda da expressão de HSP70 enquanto que incubadas com 40 μM apresentaram um aumento da expressão de HSP70 da ordem de 25% (p=0,0806) (**FIG 10**).

Nas incubações por 24 h, as células não transfectadas quando comparadas com seu próprio controle não apresentaram diferenças significativas. Já as células transfectadas e incubadas com 10 μM de PGA₂ apresentaram uma queda na expressão de HSP70 na ordem de 42% (p=0,0157), situação que se inverte com as células transfectadas na presença de PGA₂ 40 μM que apresentam uma expressão 48% (p=0,0098) maior de HSP70, quando comparada com seu próprio controle (**FIG 11**).

EXPRESSÃO DE HSP70 NA PRESENÇA DE PGA₂ – APÓS 6 HORAS

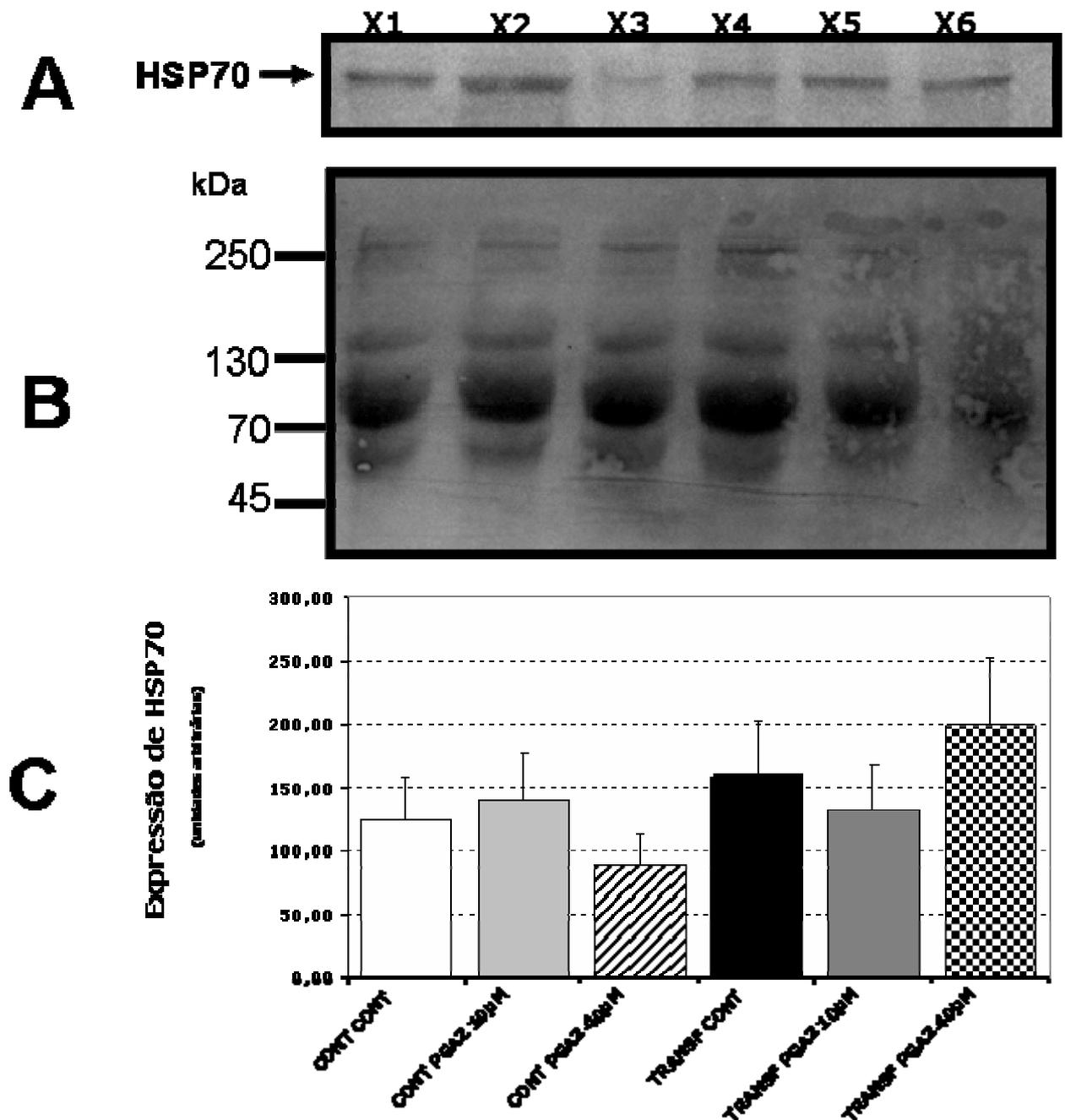


Figura 10 – Expressão de proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) em linfócitos controle e transfectados com o gene MRP-1 contido no vetor pRc/RSV, **X1**–células controle **X2**–células controle incubadas com Prostaglandina A₂ (PGA₂) 10 µM; **X3**–células controle incubadas com Prostaglandina A₂ (PGA₂) 40 µM; **X4**–células transfectadas; **X5**–células transfectadas incubadas com Prostaglandina A₂ (PGA₂) 10 µM; **X6**–células controle incubadas com Prostaglandina A₂ (PGA₂) 40 µM, pelo período de 6 horas. Em **A**, tem-se a análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a western blot como descrito. Em **B**, tem-se a membrana corada com *red Ponceau* e, em **C**, os valores arbitrários da expressão da HSP70.

EXPRESSÃO DE HSP70 NA PRESENÇA DE PGA_2 – APÓS 24 HORAS

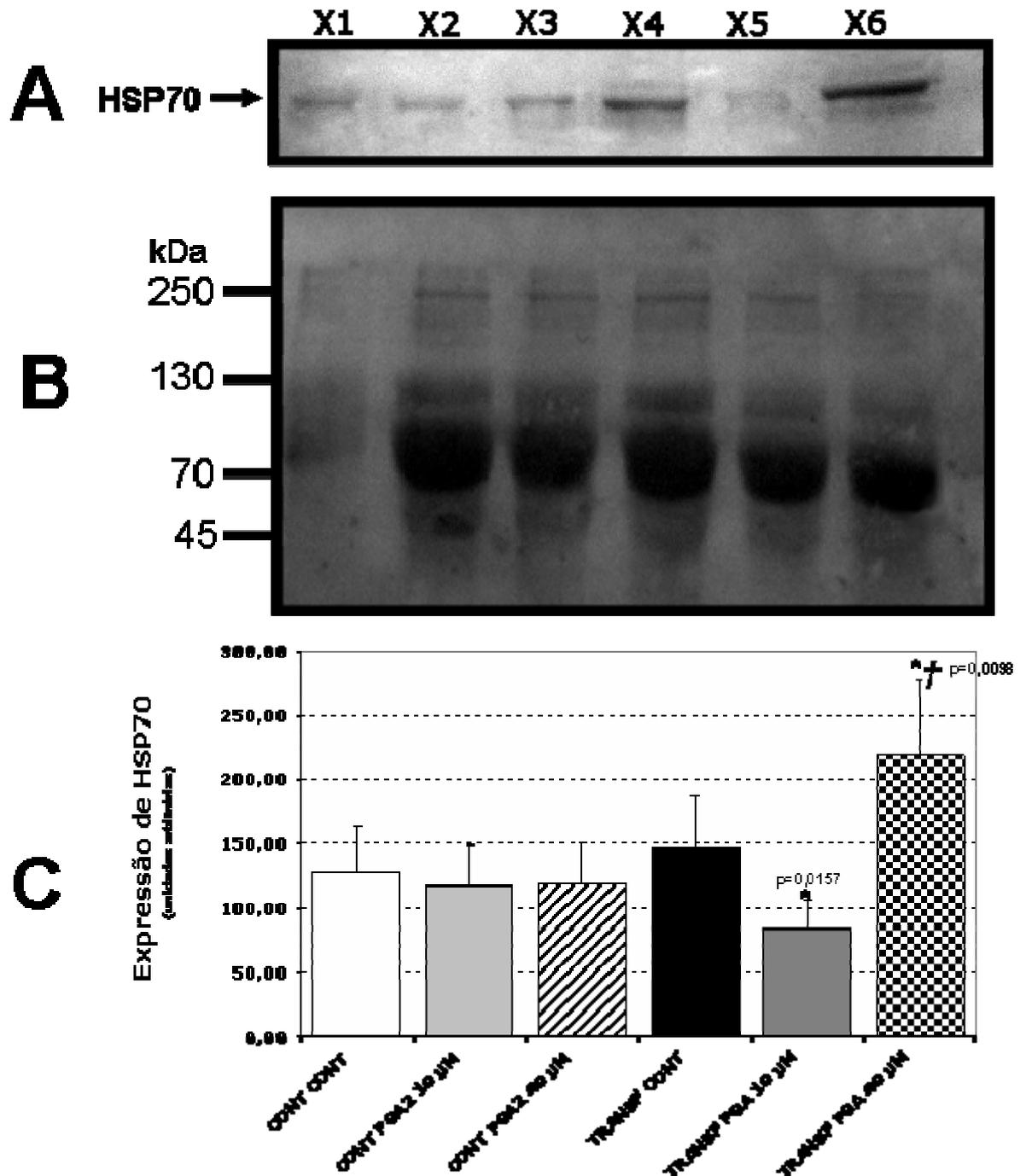


Figura 11 – Expressão de proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) em linfócitos controle e transfectados com o gene MRP-1 contido no vetor pRC/RSV, X1-linfócitos controle; X2-linfócitos controle incubados na presença de Prostaglandina A_2 (PGA_2) 10 mM; X3-linfócitos controle incubados na presença de Prostaglandina A_2 (PGA_2) 40 mM X4-linfócitos transfectados; X5-linfócitos transfectados incubados na presença de Prostaglandina A_2 (PGA_2) 10 mM; X6-linfócitos transfectados incubados na presença de Prostaglandina A_2 (PGA_2) 40 mM, pelo período de 24 horas. A-análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot* B- a membrana corada com *red Ponceau* e, em C, os valores arbitrários da expressão da HSP70. *Western blot* representativo de 4 experimentos independentes. Análise estatística por teste T de *student*)

3. Expressão de Proteínas de Choque Térmico HSP70 em Linfócitos Controle e Transfectados, na presença Xantina/Xantina Oxidase, SOD e β ME

Espécies ativas do oxigênio (por exemplo superóxido) são produzidas pelo oxigênio molecular em vários processos biológicos. Dentre estes a reação da enzima Xantina oxidase quando catalisa a oxidação da Xantina à ácido úrico. O aumento de espécies ativas do oxigênio, intracelularmente, leva ao desbalanço do estado de oxidação/redução, conhecido como estresse celular.

Com a finalidade de avaliar a expressão de proteínas de choque térmico HSP70 em células transfectadas e não transfectadas com o gene da MRP1, contido no plasmídeo pRc-RSV, as mesmas foram incubadas na presença de xantina/xantina e superóxido dismutase.

Foram utilizadas $2,58 \times 10^7$ células de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos, ressuspensas em 13ml de meio RPMI1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, mantidas por duas horas em estufa para adesão dos macrófagos. Após este período as células controle foram eletropulsadas com um pulso de 400 V, e as células transfectadas receberam 44,5 μ g de plasmídeo pRc-RSV, contendo o gene da MRP1, e posteriormente foram eletropulsadas com um pulso de 400 V. Ambos os grupos foram incubados em presença de concanavalina A por 24 h. Após este período as células foram incubadas na presença de Xantina (26,8 U/ml) e Xantina Oxidase (0,4 U/ml) e superóxido dismutase (SOD - 15000 U/ml) (conforme descrito no capítulo de métodos) por 30 min.

As células não transfectadas, quando comparadas com seu controle, apresentaram uma queda de 70% na expressão de HSP70 quando incubadas com xantina e xantina oxidase. Quando se adicionou superóxido dismutase (SOD), enzima de redução do superóxido, o comportamento permaneceu semelhante. As células transfectadas e incubadas com xantina/xantina oxidase, mostram uma expressão de HSP70 quatro vezes menor, quando comparadas ao seu controle. Situação totalmente revertida pela adição de SOD (FIG 12).

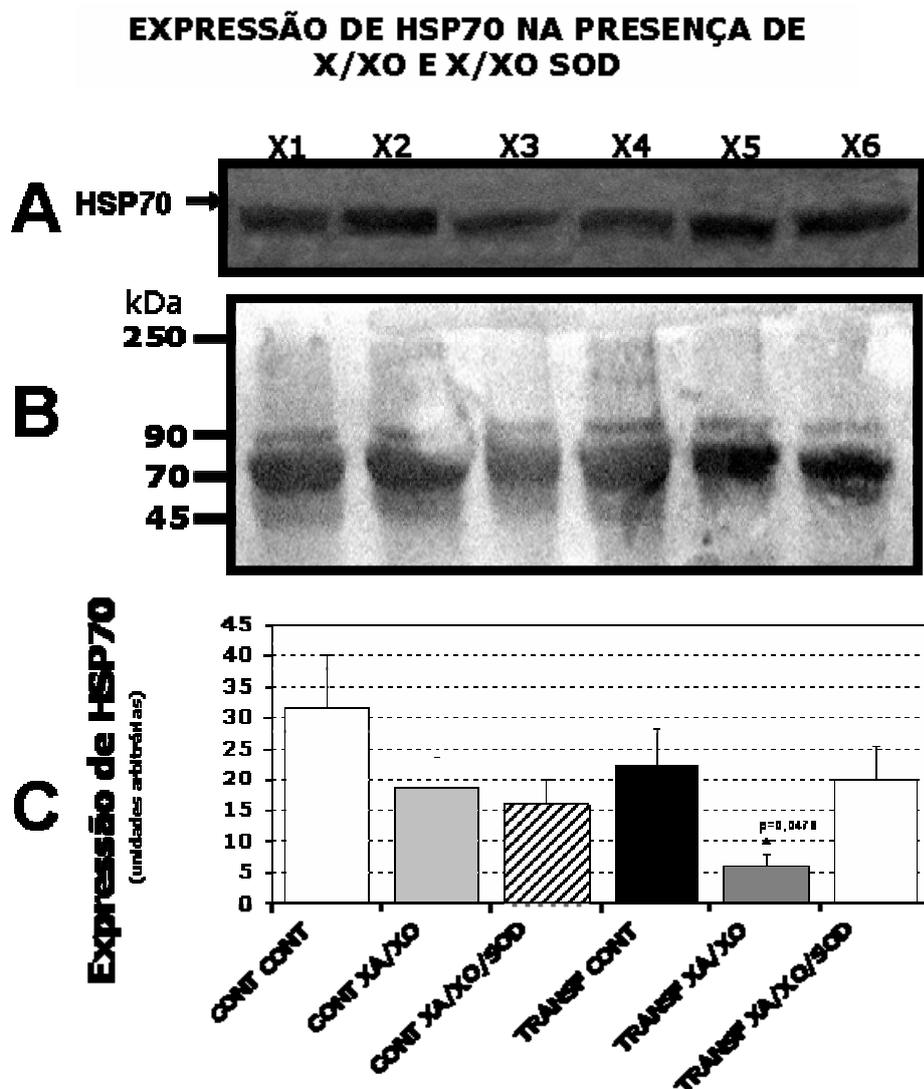


Figura 12 - Expressão de proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) em linfócitos controle e transfectados com o gene MRP-1 contido no vetor pRc/RSV, X1-células controle; X2-células controle incubadas na presença de Xantina/Xantina Oxidase X3-células controle incubadas na presença de Xantina/Xantina Oxidase/SOD X4-células transfectadas; X5 - células transfectadas incubadas na presença de Xantina/Xantina Oxidase X6 - células transfectadas incubadas na presença de Xantina/Xantina Oxidase/SOD. **A** - a análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *Western Blot*; **B** - a membrana corada com *red Ponceau*; **C** - os valores arbitrários da expressão da HSP70. *Western blot* representativo de 3 experimentos independentes, cada um em duplicata. Análise estatística por teste *t* de student.

A expressão de HSP70 foi avaliada também nas células transfectadas e não transfectadas, incubadas na presença de xantina/xantina oxidase, porém com a adição do agente redutor beta mercaptoetanol (β ME).

Foram utilizadas $1,72 \times 10^7$ células de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos, ressuspensas em 13ml de meio RPMI1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, mantidas por duas horas em estufa para adesão dos macrófagos. Após este período as células controle foram eletropulsadas com um pulso de 400 V, e as células transfectadas receberam 23 μ g de plasmídeo pRc-RSV, contendo o gene da MRP1, e posteriormente foram eletropulsadas com um pulso de 400 V. Ambos os grupos foram incubados em presença de concanavalina A por 24 h. Após este período os grupos foram incubados na presença de Xantina (26,8 U/ml) e Xantina Oxidase (0,4 U/ml) e beta mercaptoetanol (β ME) nas concentrações de 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M, por 30 min.

Não houve diferença significativa na expressão de HSP70, entre os grupos das células não transfectadas. As células transfectadas apresentaram expressão de HSP70 duas vezes menor no grupo incubado na presença de β ME na concentração de 25 μ M, em comparação com o grupo incubado com 10 μ M. A mesma redução de expressão de HSP70 foi verificada no grupo tratado com 50 μ M com relação do grupo incubado com 10 μ M (**FIG 13**).

EXPRESSÃO DE HSP70 NA PRESENÇA DE β ME EM CONCENTRAÇÕES DIFERENTES

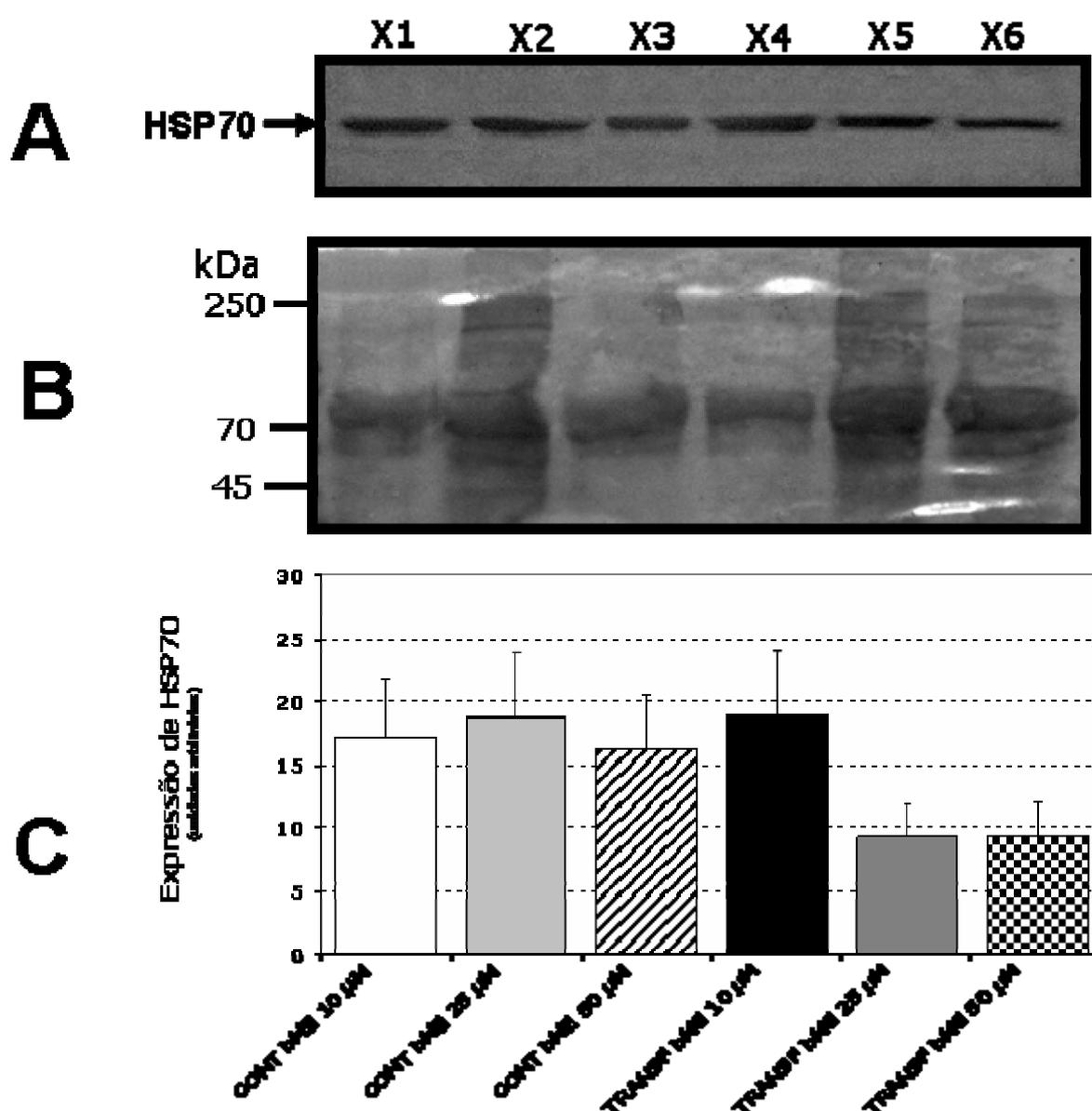


Figura 13 - Expressão de proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) em linfócitos controle e transfectados com o gene MRP-1 contido no vetor pRc/RSV, X1- linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase e β ME 10 μ M; X2- linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase e β ME 25 μ M; X3- linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase e β ME 50 μ M; X4- linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase e β ME 10 μ M; X5- linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase e β ME 25 μ M; X6- linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase e β ME 50 μ M; **A** - tem-se a análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a western blot como descrito; **B** - membrana corada com *red Ponceau*; **C** - valores arbitrários da expressão da HSP70. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes.

4. Expressão da MRP1/bomba GS-X em Linfócitos Controle e Transfectados, na presença de Prostaglandina A₂

A MRP1/Bomba GS-X é uma proteína de membrana capaz de reconhecer conjugados sulfidríla, tais como: dissulfetos de glutathione (GSSG), CPPG-SG (conjugados -SG resultantes da conjugação de prostaglandinas ciclopentenônicas e GSH), medicamentos, e exportá-los para o espaço extracelular, e, neste processo depletar glutathione reduzida (GSH), podendo afetar o balanço redox celular, alterando a resposta ao estresse celular mediada pela ação da GSH.

A expressão da MRP/Bomba GS-X (proteína de múltipla resistência à drogas) foi analisada em linfócitos controle e transfectados, na presença de PGA₂ nas concentrações de 10 µM e 40 µM, seis horas e vinte e quatro horas após a incubação.

Foram utilizadas $1,76 \times 10^7$ células de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos, ressuspensas em 13ml de meio RPMI1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, mantidas por duas horas em estufa para adesão dos macrófagos. Após este período as células controle foram eletropulsadas com um pulso de 400 V, e as células transfectadas receberam 46 µg de plasmídeo pRc-RSV, contendo o gene da MRP1, e posteriormente foram eletropulsadas com um pulso de 400 V.

Nas incubações de 6 h, as células não transfectadas, quando incubadas com PGA₂ 10µM, apresentaram uma expressão de MRP1 duas vezes maior que o controle. Apesar da aparente queda de expressão nas células incubadas com 40 µM, os valores obtidos não demonstram diferença significativa. As células transfectadas apresentaram uma

expressão de MRP1 cinco vezes maior que as não tratadas, demonstrando assim a efetividade da transfecção. E, quando comparadas com seu controle mostram uma discreta queda progressiva da expressão de MRP, para os grupos incubados com a PGA_2 nas concentrações de 10 μM e 40 μM (FIG 14).

Nas incubações de 24 h, as células não transfectadas, e incubadas com PGA_2 nas concentrações de 10 μM e 40 μM não apresentaram diferenças significativas na expressão de MRP1. As células transfectadas e incubadas com PGA_2 na concentração de 40 μM , apresentaram um aumento da expressão de MRP1 33% quando comparadas com seu controle (FIG 15).

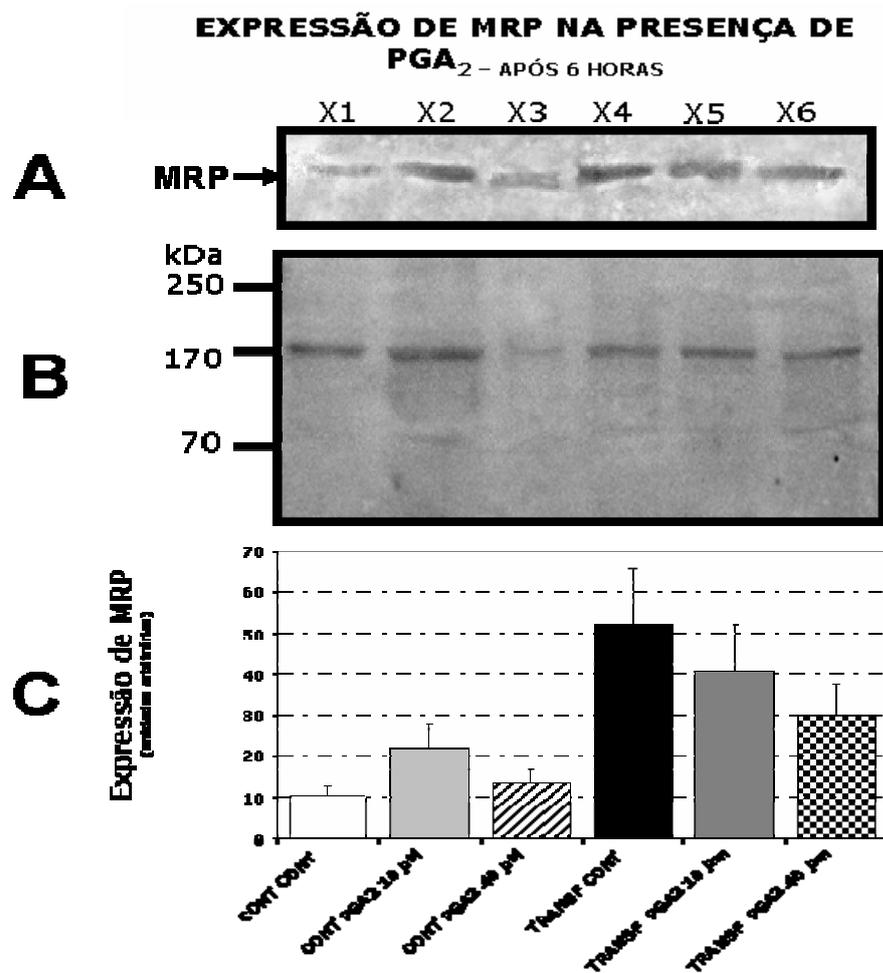


Figura 14 - Expressão de MRP-1 em linfócitos controle e transfectados com o gene MRP-1 contido no vetor pRc/RSV, X1 - linfócitos controle; X2 - linfócitos controle incubados na presença de Prostaglandina A_2 (PGA_2) 10 μM ; X3 - linfócitos controle incubados na presença de Prostaglandina A_2 (PGA_2) 40 μM ; X4 - linfócitos transfectados; X5 - linfócitos transfectados incubados na presença de Prostaglandina A_2 (PGA_2) 10 μM ; X6 - linfócitos transfectados incubados na presença de Prostaglandina A_2 (PGA_2) 40 μM , pelo período de 6 horas. **A** - análise por imunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a western blot. **B** - membrana corada com red Ponceau; **C** - os valores arbitrários da expressão da MRP-1.

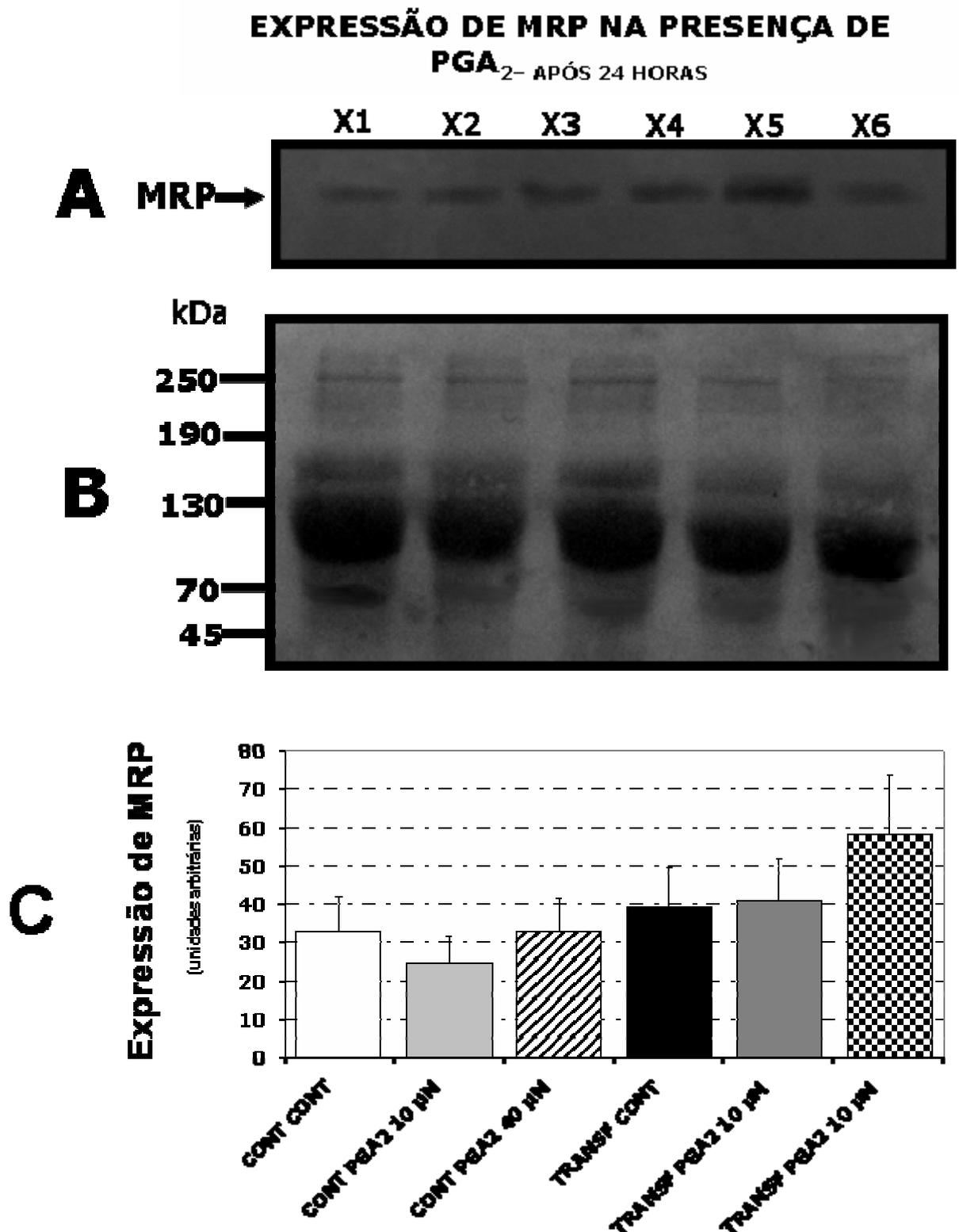


Figura 15 - Expressão de MRP-1 em linfócitos controle e transfetados com o gene MRP-1 contido no vetor pRC/RSV, X1 - linfócitos controle; X2 - linfócitos controle incubados na presença de Prostaglandina A2 (PGA2) 10 μ M; X3 - linfócitos controle incubados na presença de Prostaglandina A2 (PGA2) 40 μ M; X4 - linfócitos transfetados; X5 - linfócitos transfetados incubados na presença de Prostaglandina A2 (PGA2) 10 μ M; X6 - linfócitos transfetados incubados na presença de Prostaglandina A2 (PGA2) 40 μ M pelo período de 24 horas. A - análise por immunoblot das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a *western blot*. B - membrana corada com *red Ponceau*; C - os valores arbitrários da expressão da MRP-1 normalizados pela expressão da β -actina. *Western blot* representativo de 3 experimentos independentes, cada um em duplicata.

5. Expressão de MRP1 na presença de Xantina/Xantina Oxidase e SOD

Como anteriormente descrito a reação da enzima Xantina oxidase, quando catalisa a oxidação da Xantina à ácido úrico, produz superóxido causando estresse oxidativo. Analisamos a expressão de MRP1 em células controle e transfectadas, sob o efeito do estresse produzido pelo par xantina/xantina oxidase e com a adição de SOD.

Foram utilizadas $2,57 \times 10^7$ células de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos, ressuspensas em 13ml de meio RPMI1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, mantidas por duas horas em estufa para adesão dos macrófagos. Após este período as células controle foram eletropulsadas com um pulso de 400 V, e as células transfectadas receberam 48 μ g de plasmídeo pRc-RSV, contendo o gene da MRP1, e posteriormente foram eletropulsadas com um pulso de 400 V, 8s. Ambos os grupos foram incubados em presença de Xantina (26,8 U/ml) e Xantina Oxidase (0,4 U/ml) e superóxido dismutase (SOD – 15000 U/ml) (conforme descrito no capítulo de métodos) por 30 min.

As células não transfectadas, quando comparadas com seu controle, não apresentam diferenças significativas na expressão de MRP1 entre os grupos tratados. As células transfectadas com o gene da MRP1, contido no plasmídeo pRc-RSV, comparadas ao seu controle, apresentaram uma expressão 2 vezes maior, $p < 0,01$, da MRP1, quando incubadas com xantina e xantina oxidase. Quando se adicionou superóxido dismutase (SOD), enzima de redução do superóxido, a expressão de MRP1 foi ainda 1,5 vezes maior que o controle $p < 0,01$, sugerindo que o estresse oxidativo possa estar colaborando na expressão da bomba (**Fig. 16**).

**EXPRESSÃO DE MRP EM LINFÓCITOS
CONTROLE E TRANSFECTADOS NA
PRESENÇA DE X/XO E X/XO/SOD**

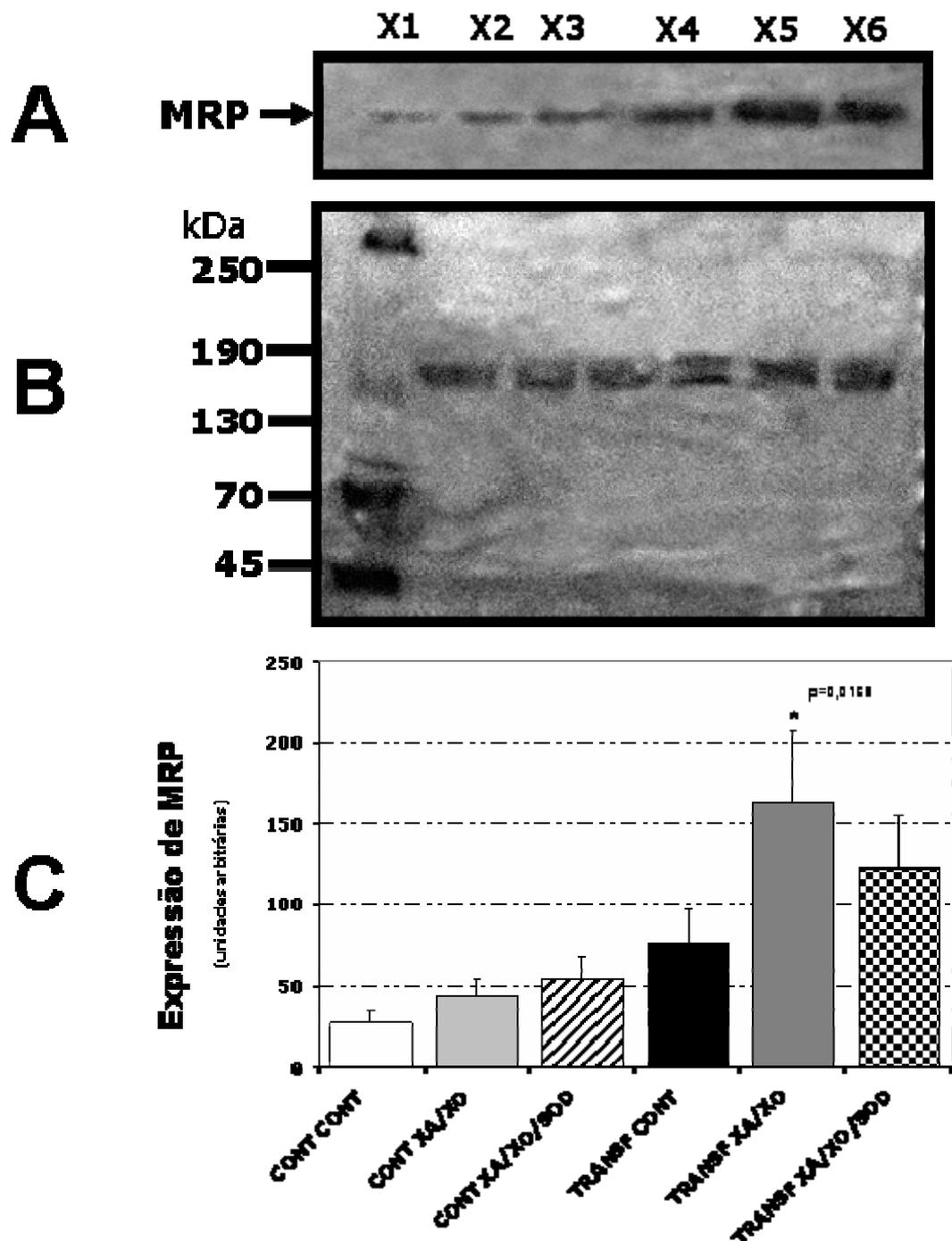


Figura 16 - Expressão do gene MRP1 em X1 - linfócitos controle; X2 - linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase; X3 - linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase/ SOD; X4 - linfócitos transfectados; X5 - linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase; X6 - linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase/SOD. **A** - análise por *immunoblot* das amostras transferidas para membranas de nitrocelulose e submetidas a western blot como descrito; **B** - a membrana corada com vermelho Ponceau; **C**, os valores arbitrários da expressão da HSP70. *Western blot* representativo de 3 experimentos independentes. $p < 0,005$ Análise estatística por teste T de *student*.

6. Medida das concentrações de GSH, GSSG e relação [GSSG/GSH]

Com a finalidade de determinar a resposta ao estresse oxidativo produzido pela reação xantina/xantina oxidase (aumento da produção de superóxido) em linfócitos controle e transfectados com o gene da MRP1 contido no plasmídeo pRc-RSV, foram determinadas as concentrações de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e a relação entre estas.

Foram utilizadas $2,58 \times 10^7$ células de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos, ressuspensas em 13ml de meio RPMI1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, mantidas por duas horas em estufa para adesão dos macrófagos. Após este período as células controle foram eletropulsadas com um pulso de 400 V, e as células transfectadas receberam 44,5 μ g de plasmídeo pRc-RSV, contendo o gene da MRP1, e posteriormente foram eletropulsadas com um pulso de 400 V. Ambos os grupos foram incubados em presença de concanavalina A por 24 h. Após este período as células foram incubadas na presença de Xantina (26,8 U/ml) e Xantina Oxidase (0,4 U/ml) e superóxido dismutase (SOD – 15000 U/ml), por 30 min. As medidas das concentrações de GSH, GSSG e a relação GSH/GSSG foi analisada por espectrofotometria em leitora de Elisa (conforme descrito no capítulo de métodos).

As células não transfectadas e incubadas na presença de xantina/xantina oxidase (X/XO), apresentaram concentração de GSH 78% vezes menor, $p < 0,05$, quando comparadas com seu controle. Recuperando a expressão de GSH quando se adicionou SOD. Ao contrário, as células transfectadas e incubadas na presença de X/XO,

apresentaram um aumento de 91%, $p < 0,05$, na concentração de GSH, quando comparadas com seu controle. Quando comparamos os dois grupos celulares incubados na presença de X/XO, transfectados e não transfectados, podemos observar que as células transfectadas apresentaram uma concentração de GSH quase treze vezes maior que as células não transfectadas, $p < 0,05$, (**FIG 17**).

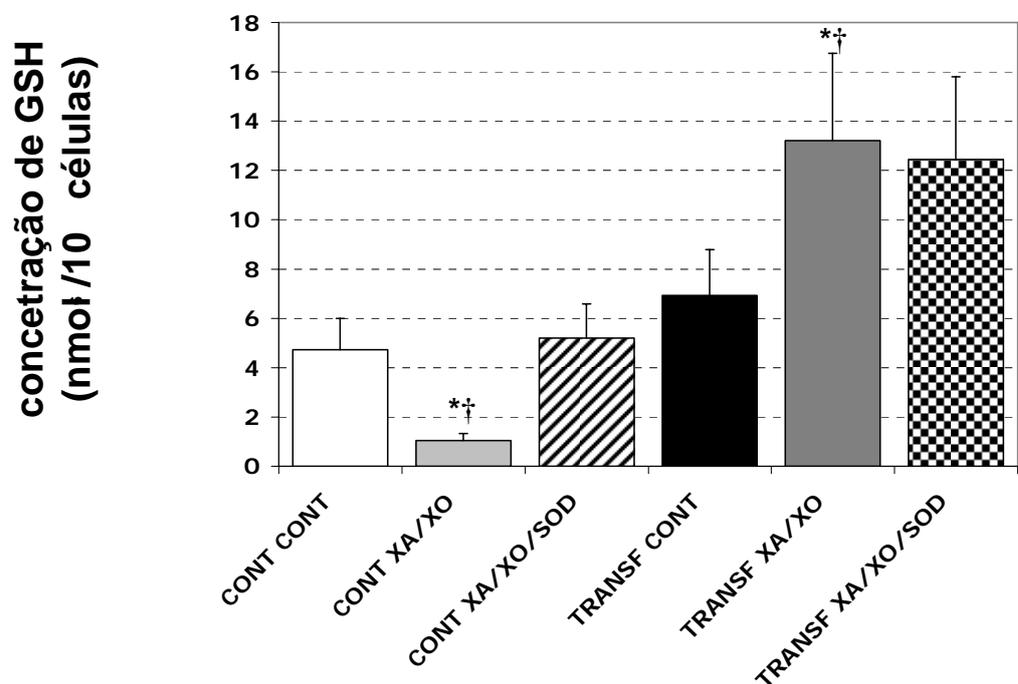


Figura 17 –Concentração de GSH em **CONT CONT**–linfócitos controle; **CONT XA/XO**–linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase; **CONT XA/XO/SOD** linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase/SOD; **TRANSF CONT**–linfócitos transfectados; **TRANSF XA/XO** - linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase; **TRANSF XA/XO/SOD**-linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase/SOD., $p < 0,005$. Gráfico representativo da média de sete experimentos independentes, cada um em duplicata.(Análise estatística por Tukey-Kramer/Bonferroni e teste T de *student*).

Com relação às concentrações intracelulares de GSSG, tanto as células transfectadas quanto as não-transfectadas não mostraram diferença significativa. Quando incubadas com X/XO, ou com X/XO e SOD, também não apresentaram diferenças significativas, conforme avaliação pelos testes t de *Student*, por ANOVA, seguida de teste de Bonferroni (**FIG 18**).

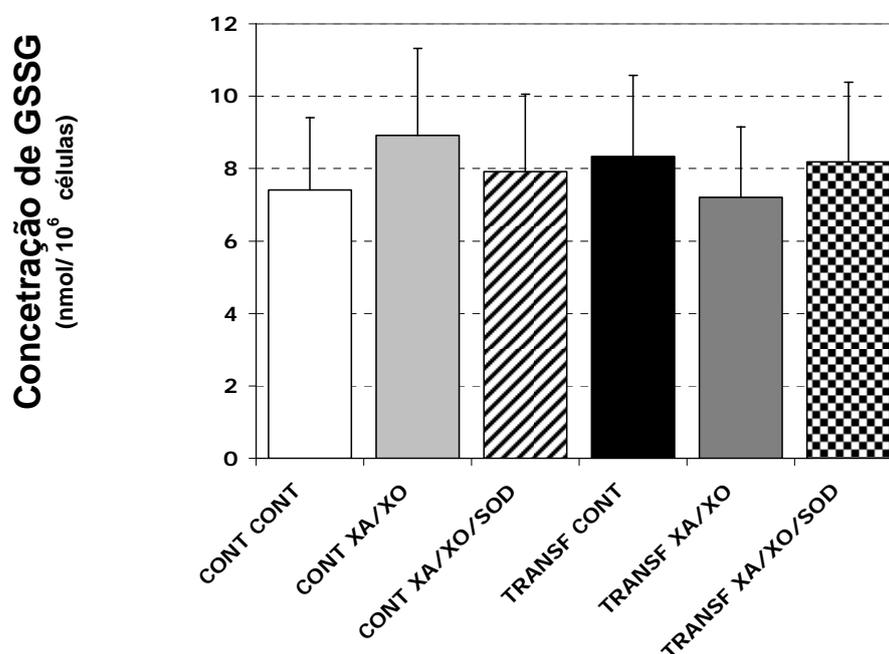


Figura 18 –Concentração de GSSG em **CONT CONT**–linfócitos controle; **CONT XA/XO**–linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase; **CONT XA/XO/SOD** linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase/SOD;**TRANSF CONT**–linfócitos transfectados; **TRANSF XA/XO**–linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase; **TRANSF XA/XO/SOD**-linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase/SOD. Não se observam diferenças significativas nas concentração de GSSG nos grupos estudados. Gráfico representativo de sete experimentos independentes, cada um em duplicata.

A relação [GSSG/GSH] é um importante indicador da resposta celular ao estresse, pois o balanço redox celular, depende em grande parte da manutenção do metabolismo da glutatona, em especial de sua forma reduzida (GSH). Quando analisamos as células não-transfectadas, pudemos observar que o grupo incubado na presença de

X/XO apresenta uma relação [GSSG/GSH] 5,5 vezes ($p < 0,001$) maior que seu controle (**FIG 19**) sugerindo um intenso estresse oxidativo. No entanto, as células transfectadas não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratados.

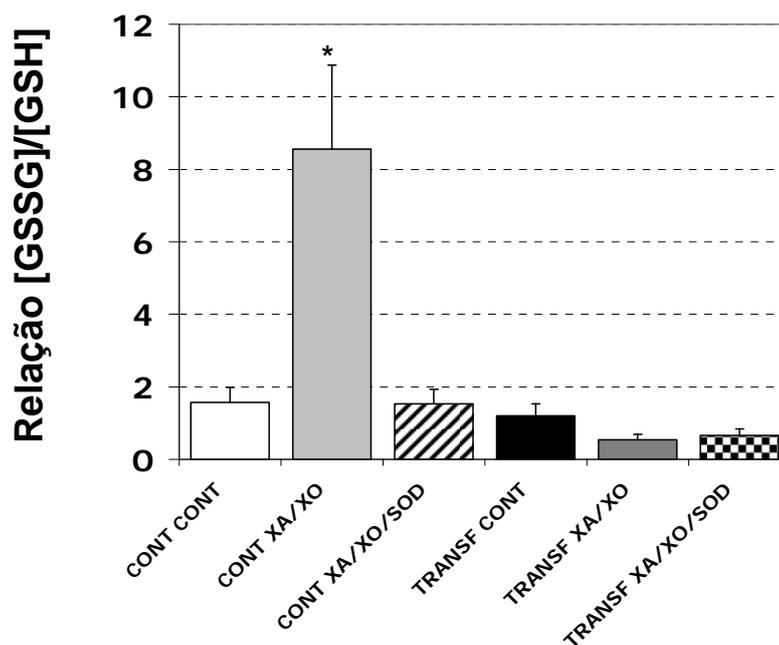


Figura 19 – Relação [GSSG/GSH] **CONT CONT** - linfócitos controle; **CONT XA/XO**—linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase; **CONT XA/XO/SOD** linfócitos controle incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase/SOD; **TRANSF CONT**—linfócitos transfectados; **TRANSF XA/XO**—linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase; **TRANSF XA/XO/SOD**-linfócitos transfectados incubados na presença de Xantina/Xantina Oxidase/SOD. ($p < 0,001$). Gráfico representativo de sete experimentos independentes, cada um em duplicata. (Análise estatística por Bonferroni).

7. Incorporação de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$]

Como já comentado anteriormente, as células dependem da sustentação do metabolismo da glutathiona para manutenção do estado redox celular e reposta ao estresse oxidativo. Em situações onde aconteça a depleção da glutathiona, sem a posterior recuperação, ocorre o acúmulo de glutathiona oxidada (GSSG) e substâncias citotóxicas, tais como radicais livres. O acúmulo de radicais livres intracelularmente causam a alteração do DNA, por peroxidação das bases e dano às

proteínas; atacam os ácidos graxos insaturados nos fosfolípidos e outros componentes lipídicos das membranas celulares, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos, alterando a estrutura das membranas e perturbando sua função normal, o que pode ativar o mecanismo de apoptose celular.

Primeiramente foi determinada a incorporação da Timidina [2-¹⁴C] em linfócitos controle e linfócitos incubados na presença de concanavalina A (ConA), agente mitógeno. Observa-se uma incorporação cinco vezes maior, $p < 0,001$, nos linfócitos tratados com ConA (FIG 20).

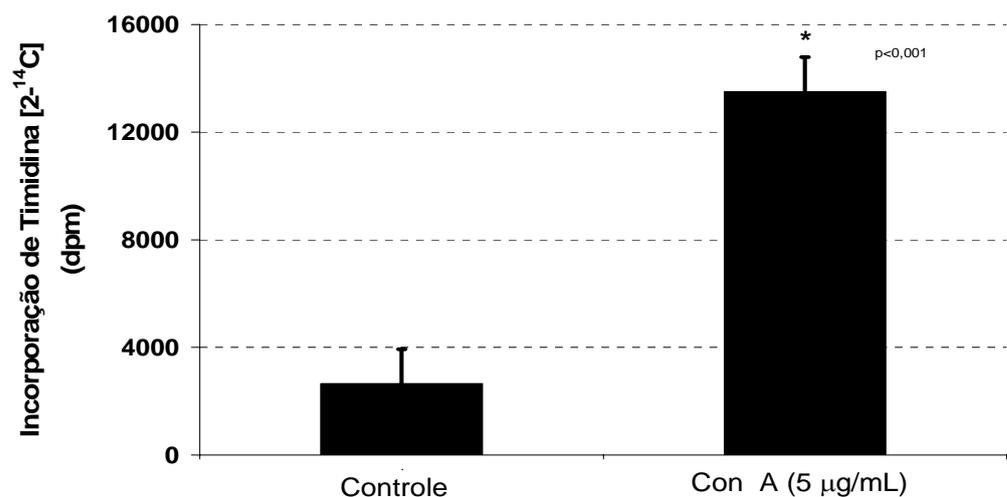


Figura 20 – Gráfico representativo incorporação de timidina [2-¹⁴C] em células (linfócitos) controle e na presença de concanavalina A, onde se observa uma incorporação 5 vezes maior nas células tratadas com Con A, $p < 0,001$. Gráfico representativo de dois experimentos independentes, cada um em duplicata. (Análise estatística por teste t de *student*).

Para verificar a função imunológica apresentada pelas células, transfectados não transfectados, incubadas na presença de PGA_2 nas concentrações de 10 μM e 40 μM ou submetidas a choque térmico de 42°C, as mesmas foram incubadas na presença de Timidina [2-¹⁴C], com a finalidade de medir a captação e incorporação da mesma.

Foram utilizadas $2,65 \times 10^7$ células de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos, ressuspensas em 13ml de meio RPMI1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, mantidas por duas horas em estufa para adesão dos macrófagos. Após este período as células controle foram eletropulsadas com um pulso de 400 V, e as células transfectadas receberam 44,5 μg de plasmídeo pRc-RSV, contendo o gene da MRP1, e posteriormente foram eletropulsadas com um pulso de 400 V. Ambos os grupos foram incubados em presença de concanavalina A por 24 h. Após este período os grupos foram incubados na presença de Prostaglandina A_2 , nas concentrações de 10 μM e 40 μM , por 6 e 24 horas e adicionada Timidina[2- ^{14}C] (conforme descrito no capítulo de métodos).

A capacidade de captação de Timidina [2- ^{14}C], pelos grupos celulares estudados foi avaliada para excluir a possibilidade de que alterações na captação pudessem refletir-se nos resultados de incorporação obtidos.

As células não transfectadas, quando tratadas com PGA_2 10 μM , por 6 horas, apresentam leve tendência para aumentar a captação quando comparadas ao controle. No entanto, as diferenças de captação apresentadas pelos grupos de células transfectadas e não transfectadas, entre si, ou entre grupos, não foram significativas (**FIG 21**). Resultado semelhante foi obtido nos grupos tratados por 24 horas (**FIG 22**), ou mesmo para os grupos tratados com choque térmico (**FIG 23**).

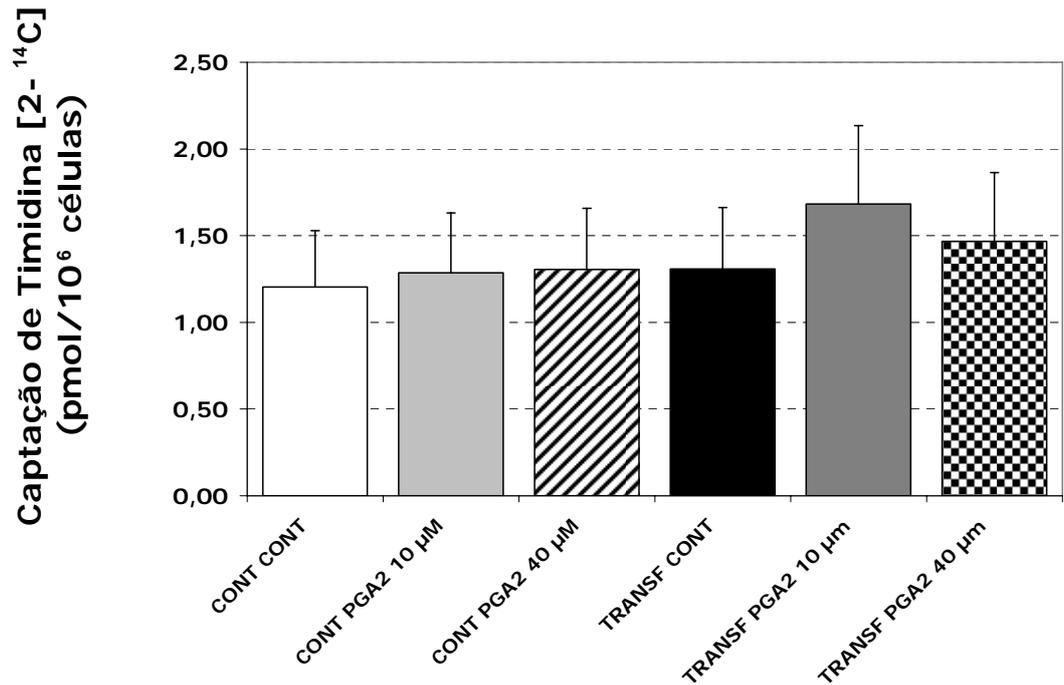


Figura 21 – Captação de timidina [2-¹⁴C] em **X1**–linfócitos controle;**X2**- linfócitos controle incubados na presença de PGA₂ 10μM; **X3**- linfócitos controle incubados na presença de PGA₂ 40 μM; **X4**–linfócitos transfectados;**X5**- linfócitos transfectados incubados na presença de PGA₂ 10μM; **X6**- linfócitos transfectados incubados na presença de PGA₂ 40 μM; pelo período de 6 h. Não se observam diferenças significativas entre os grupos estudados. Gráfico representativo de dois experimentos independentes, cada um em duplicata. (Análise por ANOVA).

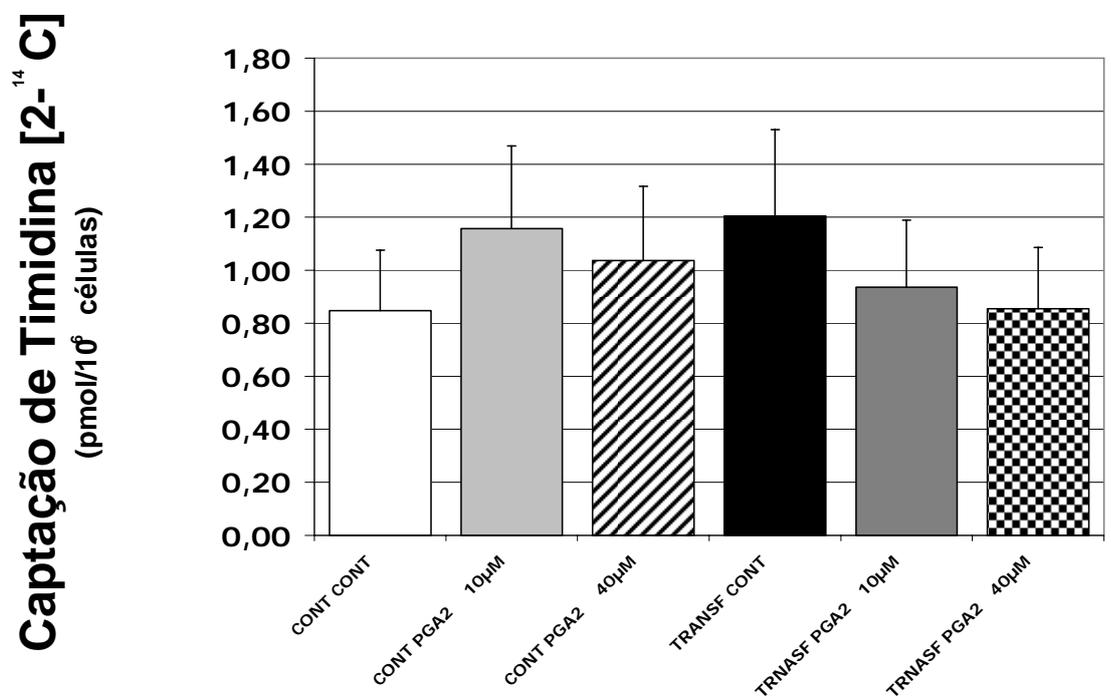


Figura 22 – Captação de timidina [2-¹⁴C] em **X1**–linfócitos controle;**X2**- linfócitos controle incubados na presença de PGA₂ 10 μM; **X3**- linfócitos controle incubados na presença de PGA₂ 40 μM; **X4**–linfócitos transfectados;**X5**- linfócitos transfectados incubados na presença de PGA₂ 10μM; **X6**- linfócitos transfectados incubados na presença de PGA₂ 40 μM; pelo período de 24 h. Não se observam diferenças significativas entre os grupos estudados. Gráfico representativo de dois experimentos independentes, cada um em duplicata. (Análise por ANOVA)

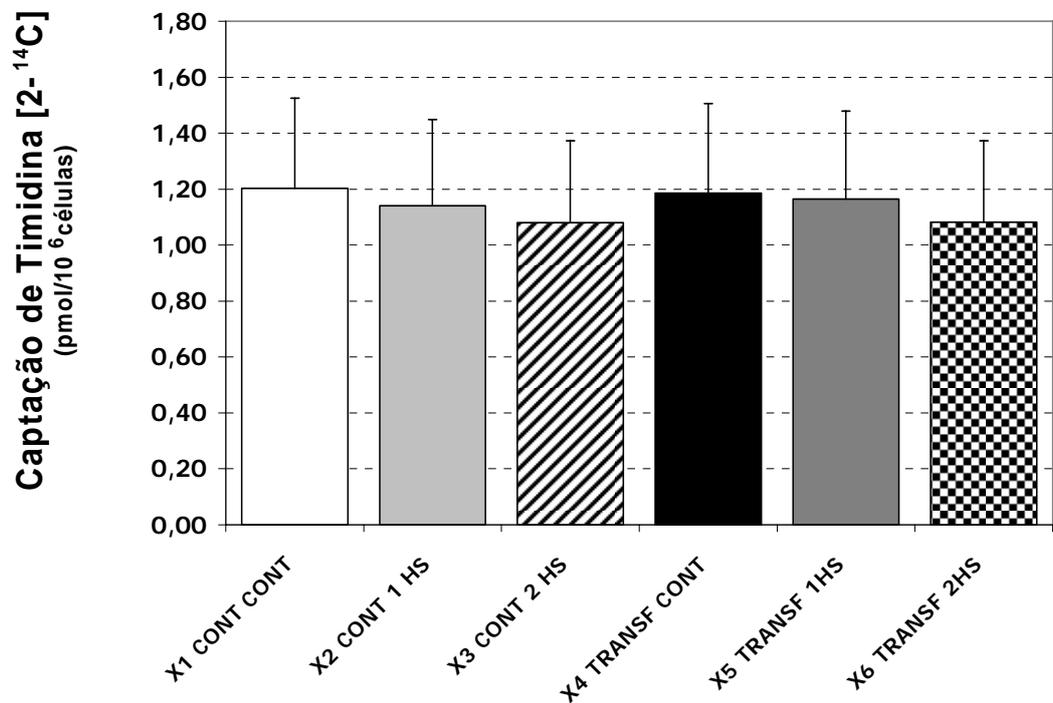


Figura 23 – Captação de timidina [2-¹⁴C] em **X1**-linfócitos controle; **X2**-linfócitos controle submetidos a um choque térmico de 42°C por duas horas; **X3**-linfócitos controle submetidos a dois choques térmicos de 42°C por duas horas; **X4**-linfócitos transfectados; **X5**-linfócitos transfectados submetidos a um choque térmico de 42°C por duas horas; **X6**-linfócitos transfectados submetidos a dois choques térmicos de 42°C por duas horas. Não se observam diferenças significativas entre os grupos estudados. Gráfico representativo de dois experimentos independentes, cada um em duplicata. Análise por ANOVA.

Posteriormente foi avaliada a capacidade de incorporação de Timidina [2-¹⁴C], no DNA das células tratadas (linfócitos controle e transfectados). Não se observam diferenças significativas entre os grupos controle e transfectados, na presença de prostaglandina A₂, após 6 horas de incubação (**FIG 24**). Resultado semelhante para incubação durante 24 horas (**FIG 25**).

Incorporação de Timidina [2-¹⁴C]
(pmol/10⁶ células)

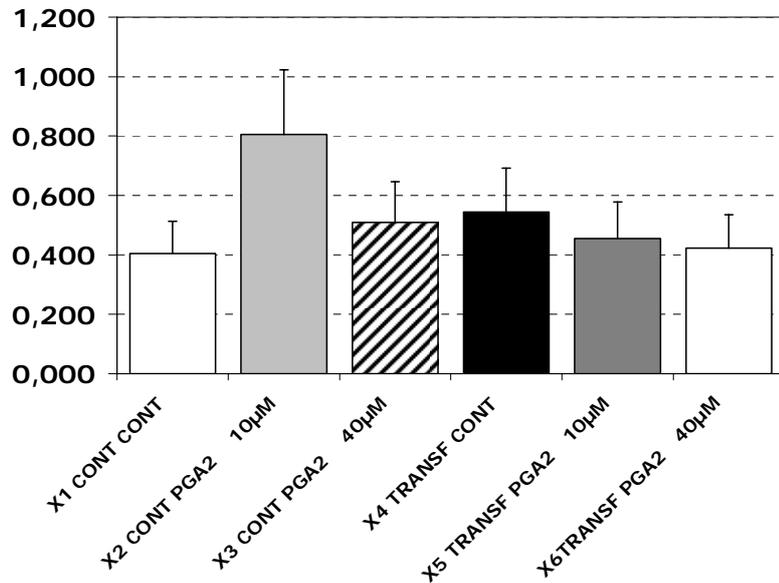


Figura 24 – Incorporação de timidina [2-¹⁴C] em **X1**–linfócitos controle;**X2**- linfócitos controle incubados na presença de PGA₂ 10 µM; **X3**- linfócitos controle incubados na presença de PGA₂ 40 µM; **X4**–linfócitos transfectados;**X5**- linfócitos transfectados incubados na presença de PGA₂ 10 µM; **X6**- linfócitos transfectados incubados na presença de PGA₂ 40 µM; pelo período de 6 h. Não se observam diferenças significativas entre os grupos estudados. (Análise por ANOVA)

Incorporação de Timidina [2-¹⁴C]
(pmol/10⁶ células)

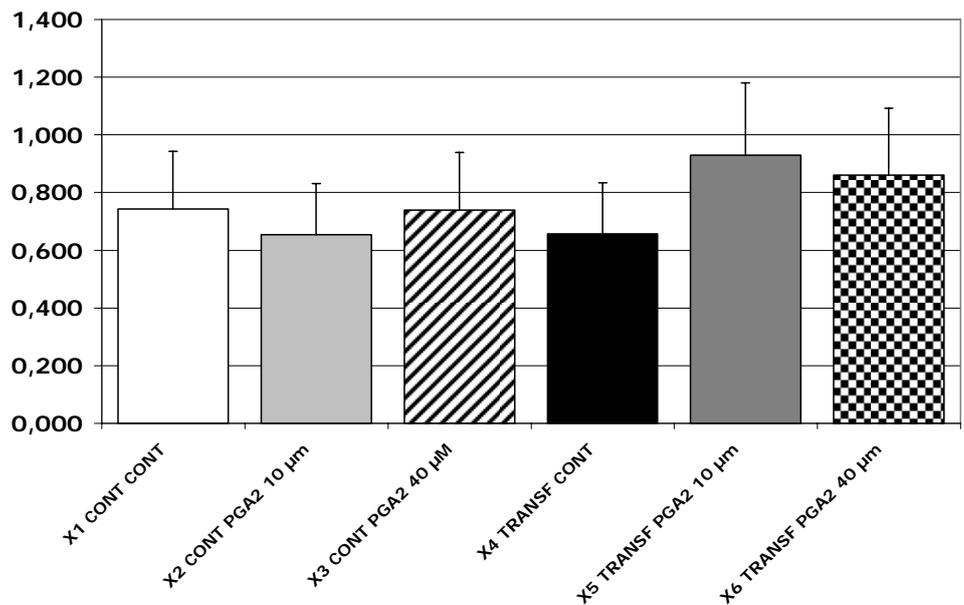


Figura 25 – Incorporação de timidina [2-¹⁴C] em **X1**–linfócitos controle;**X2**- linfócitos controle incubados na presença de PGA₂ 10µM; **X3**- linfócitos controle incubados na presença de PGA₂ 40 µM; **X4**–linfócitos transfectados;**X5**- linfócitos transfectados incubados na presença de PGA₂ 10µM; **X6**- linfócitos transfectados incubados na presença de PGA₂ 40 µM; pelo período de 24 h. Não se observam diferenças significativas entre os grupos estudados. Gráfico representativo de dois experimentos independentes, cada um em duplicata. (Análise por ANOVA).

As células (linfócitos controle e transfectados) foram, também, tratadas com choque térmico e incubadas com Timidina [2-¹⁴C], não sendo possível identificar diferenças significativas entre os grupos (**FIG 26**).

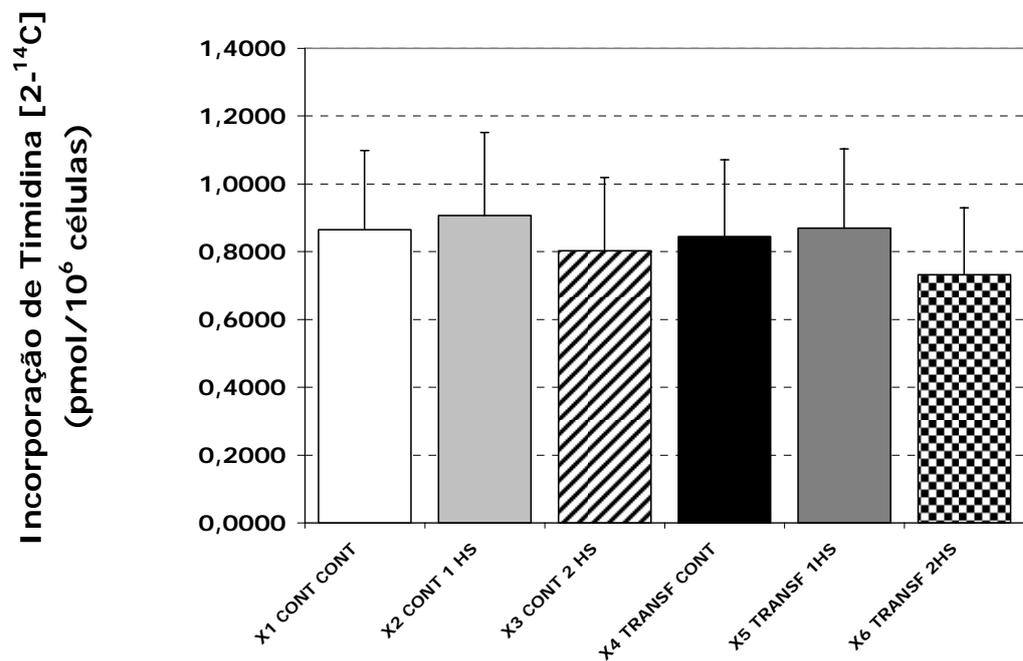


Figura 26 – Incorporação de timidina [2-¹⁴C] em **X1**-linfócitos controle; **X2**-linfócitos controle submetidos a um choque térmico de 42°C por duas horas; **X3**-linfócitos controle submetidos a dois choques térmicos de 42°C por duas horas; **X4**-linfócitos transfectados; **X5**-linfócitos transfectados submetidos a um choque térmico de 42°C por duas horas; **X6**-linfócitos transfectados submetidos a dois choques térmicos de 42°C por duas horas. Não se observam diferenças significativas entre os grupos estudados. Gráfico representativo de dois experimentos independentes, cada um em duplicata. (Análise por ANOVA).

8. Exportação de DNP-SG

A bomba MRP1/GS-x, é sabidamente, responsável pela exportação de conjugados sulfidríla para o espaço extracelular. Com a finalidade de determinar a atividade desta bomba, os grupos celulares (linfócitos controle e transfectados com o gene da MRP1/GS-x), foram incubados na presença de clorodinitrobenzeno (CDNB), e a atividade da bomba determinada pela taxa de exportação de DNP-SG, conforme descrito no capítulo de Métodos.

É possível observar que os linfócitos transfectados com o gene da bomba MRP1/GS-X mostram uma curva de atividade de exportação mais eficiente do que os linfócitos controle (**FIG 27**).

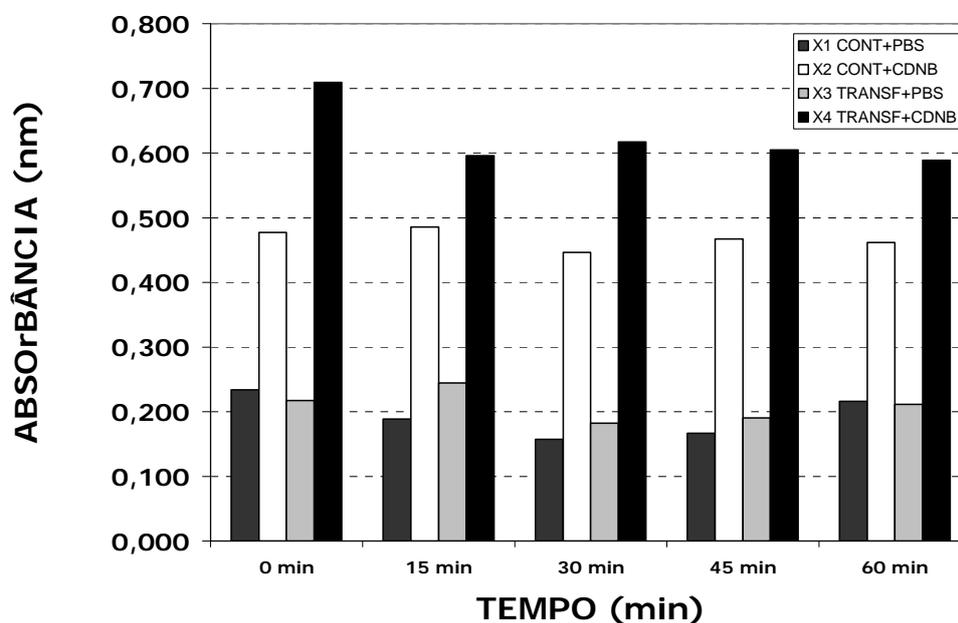


Figura 27 – Exportação de DNP-SG em X1-linfócitos controle; X2-linfócitos controle incubados com clorodinitrobenzeno (CDNB); X3-linfócitos transfectados; X4-linfócitos transfectados incubados com CDNB. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes, todos preparados em duplicata.

9. Efeitos da PGA_2 na Viabilidade de linfócitos controle e transfectados

Com a finalidade de avaliar o possível efeito citotóxico e citostático das PGA_2 (LEUNG & MIHING, 1980), linfócitos controle e transfectados com o gene da MRP1, contido no plasmídeo pRc-RSV, foram cultivados na presença de PGA_2 nas concentrações de 0, 1, 5, 10, e 40 μM .

Foram tomadas $1,75 \times 10^7$ células de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos, ressuspensas em 13ml de meio RPMI1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, mantidas por duas horas em estufa para adesão dos macrófagos. Após este período as células controle foram eletroporadas com um pulso de 400 V, e as células transfectadas receberam 46 μg de plasmídeo pRc-RSV, contendo o gene da MRP1, e posteriormente foram eletroporadas com um pulso de 400 V, 8s. Ambos os grupos foram incubados em presença de 3 μg concanavalina A por mais de 72 h. Após este período os grupos foram incubados na presença de PGA_2 nas concentrações de 0, 1, 5, 10, e 40 μM . por 30 min (**Fig. 28**).

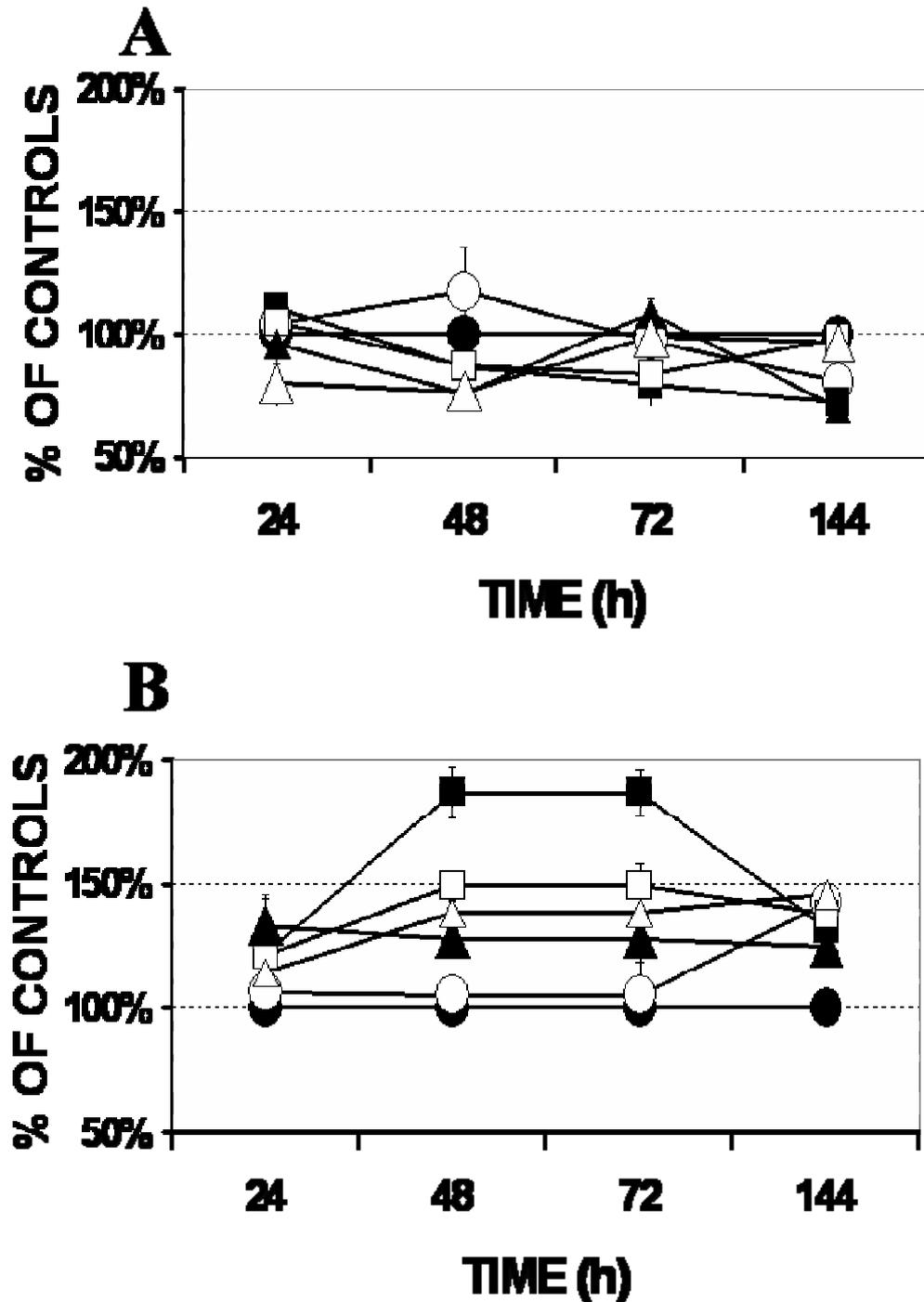


Figura 28. Resistência dos linfócitos não transfectados, e transfecção com gene *MRP1*/bombaGS-X, aos efeitos citostáticos e citotóxicos da PGA_2 . **(A)** células transfectadas com o gene *MRP1* contido no plasmídeo pRc-RSV **(B)** células controle. No tempo zero (logo após a eletropulsão e tempo de condicionamento), ambos os grupos foram tratados com a CP-PG PGA_2 em diferentes concentrações: 0 (●), 1 (○), 5 (■), 10 (□), 20 (▲) ou 40 (△) μM . As células, então, foram colhidas nos tempos indicados para avaliação da contagem celular e viabilidade pela técnica de exclusão por Trypan. Os dados, em termos de percentual de controles, foram expressados como \pm S.E.M. das três diferentes preparações, cada uma preparada em dobro. (Figura já publicada em KOLBERG e cols., 2005)

DISCUSSÃO

Como apresentado na seção de introdução, prostaglandinas ciclopentenônicas (CP-PGs) podem ser produzidas em grandes quantidades no plasma de indivíduos com câncer nos estágios finais. Dado que estas substâncias possuem uma potente atividade antiproliferativa e que são captadas por todas as células do organismo, a fisiologia dos vários sistemas começa a entrar em colapso e os pacientes tendem a evoluir ao óbito.

Um dos maiores desequilíbrios homeostáticos verificados nesses estágios da doença é a imunossupressão. Considerando-se que o sistema imunológico é fundamental para que o organismo se oponha ao crescimento do tumor, a falência do sistema imunológico propicia o agravamento do estado de caquexia e a morte. Estudos de nosso grupo sugerem que o acúmulo de CP-PGs em linfócitos nesses estágios possa ser responsável, pelo menos em parte, pela grave imunossupressão que afeta esses doentes de câncer (KOLBERG *et cols.*, 2005; HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 2001).

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 ativas e seletivamente transportadas para dentro das células, por um carreador de membrana, e, então, transferidas para o núcleo, onde se ligam a proteínas nucleares e atuam especificamente na interface G₁/S do ciclo

celular (OHNO e cols., 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 (OHNO e cols., 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. 6**) 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 e cols., 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 e cols., 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.

Vários achados experimentais sugerem a ocorrência de superprodução de PGs no plasma de indivíduos com câncer (WILLIAMS & SIDDIQUI, 1987) e que essas possam transformar-se em CP-PGs (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 2001). Por outro lado, linfonodos de animais portadores do tumor de Walker 256 acumulam grandes quantidades de CP-PGs enquanto que o próprio tecido tumoral não (HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 2001). Uma possível explicação para este acúmulo de CP-PGs observado em células imunológicas seria a baixa atividade da MRP1/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 hematopoéticas da linhagem branca apresentam apenas uma atividade irrisória desta ATPase (HOMEM DE BITTENCOURT e cols., 1998a,b). Entretanto, apenas recentemente, ficou demonstrado que a enorme diferença entre a alta resistência de células tumorais e a grande sensibilidade de linfócitos ao tratamento com CP-PGs estavam realmente associados a diferentes níveis de expressão da bomba MRP1/GS-X (KOLBERG e cols., 2005). Por isso conduzimos vários experimentos com linfócitos para testar sua sensibilidade ao tratamento com CP-PGs. Entretanto, havia ainda um impedimento técnico. Para o estudo dos efeitos de CP-PGs e outros agentes estressantes sobre a fisiologia de linfócitos em termos da capacidade de exportação de GS-conjugados através da bomba GS-X, eram necessários estudos com linfócitos transfectados com o gene codificando para a bomba GS-X/MRP1.

Por outro lado, um fator crítico na transfecção de células eucarióticas é a escolha do procedimento de transfecção celular. O procedimento deve apresentar eficiência e não deixar resíduos, já que as células devem ser preparadas e posteriormente submetidas à presença de substâncias oxidantes e redutoras, com a finalidade de determinar a resposta de manutenção do estado redox celular.

Nosso estudo mostrou que 400 V de diferença de potencial real (não a nominal aplicada no aparelho) representava o máximo de voltagem a ser aplicado sem comprometimento da viabilidade celular (**Fig. 7**). Além da voltagem, o número de pulsos também foi testado. Os resultados obtidos demonstraram que a melhor viabilidade é obtida quando aplicamos apenas um pulso elétrico com voltagem de 400V (voltagem real). Podemos observar que quando aplicamos dois pulsos o percentual de células viáveis tende a aumentar, porém não ultrapassa 40%. Quando foram aplicados três pulsos a viabilidade diminuiu aproximando-se de zero (**Fig.8**). Assim, pela primeira vez, foi possível efetuar estudos com linfócitos transfectados por eletroporação, uma técnica que, apesar de limpa, apresenta maior mortalidade celular que outras técnicas clássicas, como lipofecção, transfecção viral e cloreto de cálcio. Os resultados apresentados nesse trabalho bem como outros que já publicamos (KOLBERG e cols., 2005) permitiram, então, que pudéssemos avançar com os estudos sobre os efeitos de CP-PGs e outros agentes estressantes, como estresse oxidativo e térmico, sobre a funcionalidade de linfócitos.

A eletrofilicidade de CP-PGs, como PGA_2 é bem conhecida, conforme já avaliado na seção de Introdução. Assim, a presença destas prostaglandinas pode causar dano celular, pois além de conjugar-se com a glutathiona depletando-a e, conseqüentemente, diminuir a resposta ao estresse oxidativo celular, esta substância é também antiproliferativa, agindo na fase G1 para S do ciclo celular, impedindo a

divisão. Quando ocorre a presença de PGA_2 intracelularmente, vários fatores de resposta ao estresse são ativados, entre estes a produção de proteínas de choque térmico (HS).

A expressão de HSP70 foi analisada em linfócitos controle e transfectados, na presença de PGA_2 nas concentrações de 10 μM e 40 μM , seis horas e vinte e quatro horas após a incubação. Após este período as células controle foram eletropulsadas com um pulso de 400 V, e as células transfectadas receberam 44,5 μg de plasmídeo pRc-RSV, contendo o gene da MRP1 humana (seqüência completa), e posteriormente foram eletropulsadas com um pulso de 400 V. Ambos os grupos foram incubados em presença de concanavalina A por 24 h. Após este período os grupos foram incubados na presença de PGA_2 , nas concentrações de 10 μM e 40 μM (conforme descrito no capítulo de métodos), por 6 e 24 horas.

Nas incubações com 6 horas, as células não transfectadas, incubadas com PGA_2 10 μM , quando comparadas com seu respectivo controle, tiveram um aumento esperado na expressão de HSP70 (em torno de 11%). Já com 40 μM , houve queda da expressão (em torno de 40%), o que pode ser atribuído a morte celular, já que esta concentração é extremamente tóxica para linfócitos (HOMEM DE BITTENCOURT *e cols*, 1998b,c). Por outro lado, as células transfectadas, incubadas com PGA_2 10 μM , quando comparadas com seu respectivo controle apresentam uma ligeira queda da expressão de HSP70 enquanto que incubadas com 40 μM apresentaram um aumento da expressão de HSP70 da ordem de 25% (**FIG. 10**). Nas incubações por 24 h, as células não transfectadas quando comparadas com seu próprio controle não apresentaram diferenças significativas. Já as células transfectadas e incubadas com 10 μM de PGA_2 apresentaram uma queda na expressão de HSP70 na ordem de 70%, situação que se inverte com as células transfectadas na presença de PGA_2 40 μM que

apresentam uma expressão 48% maior de HSP70, quando comparada com seu próprio controle (**FIG 11**). Apesar de alguma discreta mas não-significativa diferença entre os grupos, de maneira geral, os dados sugerem que a transfecção com o gene da bomba MRP1/GS-X não tenha tido um efeito acentuado sobre a expressão de HSP70. Isto não significa dizer que as células não estejam protegidas contra o tratamento com PGA_2 (ver a seguir). Significa apenas que, quando tratadas com PGA_2 , a capacidade de resposta celular em termos de expressão de HSP70 parece ser a mesma nos dois grupos.

Espécies ativas do oxigênio (por exemplo superóxido) são produzidas pelo oxigênio molecular em vários processos biológicos. Dentre estes a reação da enzima Xantina oxidase quando cataliza a oxidação da Xantina a ácido úrico. O aumento de espécies ativas do oxigênio, intracelularmente, leva ao desbalanço do estado de oxidação/redução, conhecido como estresse celular.

Com a finalidade de avaliar a expressão de proteínas de choque térmico HSP70 em células transfectadas e não transfectadas com o gene da MRP1, contido no plasmídeo pRc-RSV, as mesmas foram incubadas na presença de xantina/xantina oxidase e superóxido dismutase. Quando comparadas com seus respectivos controles, as células não transfectadas apresentaram uma queda de 70% na expressão de HSP70 quando incubadas com xantina e xantina oxidase. Quando se adicionou superóxido dismutase (SOD), enzima de redução do superóxido, o comportamento permaneceu semelhante. As células transfectadas e incubadas com xantina/xantina oxidase, mostram uma expressão de HSP70 quatro vezes menor, quando comparadas ao seu controle. Situação totalmente revertida pela adição de SOD (**FIG 12**). A expressão de HSP70 foi avaliada também nas células transfectadas e não transfectadas, incubadas na presença de xantina/xantina oxidase, porém com a adição do agente redutor beta mercaptoetanol (βME). Neste

caso, não houve diferença significativa na expressão de HSP70, entre os grupos das células não transfectadas (**FIG 13**). Esses resultados sugerem que o estresse causado pela adição de agentes geradores de ânions superóxido é menor em células transfectadas mas que o tratamento com β -ME não atenua esses efeitos em nenhum dos grupos (só a adição de SOD foi capaz de minimizar o estresse provocado pelo par xantina/xantina oxidase). Note-se que a resposta ao tratamento com substâncias que geram estresse oxidativo em linfócitos é bem diferente daquela induzida pelo tratamento com PGA_2 . A resposta à PGA_2 é muito mais acentuada, embora o estresse oxidativo gerado pela adição do par xantina/xantina oxidase seja muito maior, o que sugere que a PGA_2 ative outros mecanismos de estresse 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 e cols., 1998 a, b) bem como à supressão do crescimento celular no câncer (ISHIKAWA e cols., 1998).

Quando comparadas com seus controles, linfócitos transfectados mostraram uma discreta queda progressiva da expressão de MRP, para os grupos incubados por 6 h com a PGA_2 nas concentrações de 10 μM e 40 μM (**FIG 14**). Nas incubações de 24 h, as células transfectadas e incubadas com PGA_2 na concentração de 40 μM , apresentaram uma expressão de MRP1 49% maior quando comparadas com seu controle (**FIG 15**). Esses achados sugerem que, ao contrário do que se observou para a expressão da HSP70, a expressão da bomba MRP1/GS-X parece estar afetada pelo tratamento com PGA_2 . Isto é, o estresse celular causado pela adição de PGA_2 pode estar modulando a

expressão dessa proteína que regula o estado redox celular. Por outro lado, quando os linfócitos foram desafiados com o grupo xantina/xantina oxidase, é possível observar que, embora não significativo, ocorre aumento na expressão da MRP1/GS-X, que se mantém quando é adicionada a SOD, enquanto que nos linfócitos ocorre um aumento significativo ($p,0,05$) na expressão da bomba, quando os mesmos são desafiados com o grupo xantina/xantina oxidase, efeito que se inverte ligeiramente quando a SOD é adicionada.

É possível observar ainda que os linfócitos transfectados com o gene da bomba MRP1/GS-X mostram uma curva de atividade de exportação de GS-conjugados mais eficiente do que os linfócitos controle (**FIG 27**).

Ao longo da evolução os seres vivos tiveram que desenvolver um mecanismo capaz de enfrentar as situações de estresse oxidativo, desenvolvendo um sistema de defesa que permitisse recuperar o balanço redução/oxidação, ou balanço redox celular (HAMMOND *e cols.* 1982, MONKS *e cols.*, 1990). Várias são as substâncias que participam ativamente deste sistema de defesa, por exemplo: a enzima superoxidodismutase (SOD) - responsável pela destruição do radical superóxido formando peróxido de hidrogênio; a catalase - enzima responsável pela redução do peróxido de hidrogênio à água; a glutathione peroxidase – enzima responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio à água, converter dissulfetos; vitaminas (E e C) e outras. Dentre as defesas contra o estresse oxidativo, uma das mais importantes é a glutathione (GSH).

A glutathione é um tripeptídeo composto por um glutamato, uma glicina e uma cisteína. Está presente em todas as células dos mamíferos, e se apresenta em altas concentrações (milimolares) nos tecidos do rim, fígado, cérebro, músculo esquelético e eritrócitos. A glutathione é um potente destoxicante, que permite ao organismo

livrar-se de radicais livres, toxinas e poluentes, formando compostos solúveis (através da ligação com o grupo sulfidril existente na cisteína) que podem ser excretados (JAESCHKE, 1990).

A conjugação intracelular de PGAs com moléculas de GSH e sua exportação pela bomba GS-X na forma de GS-conjugados pode ser uma estratégia celular importante na manutenção da homeostase. O primeiro passo na inativação de muitas substâncias endógenas e exógenas dá-se pela conjugação com moléculas de GSH (MEISTER, 1983; MEISTER, 1985a; MEISTER, 1985b; HONN & MARNETT, 1985; GOUIN e cols., 1986) e o papel desse processo pode ser inferido pela importância das GST na destoxificação contra substâncias eletrofílicas (PHILLIPS & MANTLE; 1993; GOTOH e cols., 1993; WANG & LEE, 1993; HALES & HUANG, 1994; ZHANG & DAS, 1994). No caso da PGA_1 , que reage avidamente com proteínas contendo grupos sulfidril (HAM e cols., 1975), a conjugação com moléculas de GSH é fundamental, porque abole todo seu caráter eletrofílico e, portanto, seus efeitos deletérios sobre a células. O segundo passo no processo de eliminação de substâncias como as CP-PGs seria, então, a exportação destas na forma de GS-conjugados, como sugerido anteriormente (ISHIKAWA, 1992). Esta etapa é capital no processo de defesa celular contra eletrófilos porque desloca o equilíbrio da reação catalisada pelas GST para a direita, no sentido da eliminação de mais moléculas do eletrófilo.

Com a finalidade de determinar a resposta ao estresse oxidativo produzido pela reação xantina/xantina oxidase (aumento da produção de superóxido) em linfócitos controle e transfectados com o gene da MRP1 contido no plasmídeo pRc-RSV, foram determinadas as concentrações de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e a relação entre estas. Os resultados mostraram que as células não transfectadas e incubadas na presença de xantina/xantina oxidase (X/XO), apresentaram concentração de GSH 78% menor, $p < 0,05$,

quando comparadas com seus controles. Nos controles tratados com X/XO houve um aumento esperado quando da adição de SOD (que dismuta os ânions superóxidos formados). Ao contrário, as células transfectadas e incubadas na presença de X/XO, apresentaram um aumento de 91%, $p < 0,05$ (por ANOVA), na concentração de GSH, quando comparadas com seu controle. Quando comparamos os dois grupos celulares incubados na presença de X/XO, transfectados e não transfectados, podemos observar que as células transfectadas apresentaram uma concentração de GSH quase 13 vezes maior que as células não transfectadas, $p < 0,05$, (**FIG 17**). Estes resultados sugerem que, apesar de não existir diferença significativa para a expressão de HSP70 (um marcador de estresse celular) as células transfectadas têm uma capacidade de regeneração de GSH muito maior que suas contrapartes não transfectadas. Essa noção é reforçada pelo fato de que as concentrações de GSSG (forma oxidada da GSH) não se alteram entre os grupos. Logo, é de se esperar que a diferença entre eles seja devida a uma capacidade de regeneração maior de GSH, já que, sabidamente o tratamento com X/XO gasta GSH oxidando-a. Entretanto, como o tratamento com o par gerador de superóxido também aumenta as concentrações de GSSG, o fato de as concentrações de GSSG terem se mantido constantes sugere também que este dissulfeto possa ter sido eliminado das células pela bomba MRP1/GS-X. O estresse oxidativo (avaliado pela relação $[GSSG]/[GSH]$) foi muito menor nas células transfectadas que nas células controle não-transfectadas, sugerindo que a superexpressão da bomba MRP1/GS-X tenha um importante papel na manutenção do estado redox celular.

Um dos efeitos diretos das CP-PGs é a depleção dos estoques intracelulares de GSH. Por outro lado, a redução nas concentrações de GSH cria um ambiente "oxidativo" e interfere numa série de processos celulares, como o favorecimento da síntese de certas PGs e LTs (HUWYLER *e cols.*, 1990; HEMPEL & WESSELS, 1994),

ativação de proteínas sensíveis ao estado redox, como as p56^{lck} e p59^{lyn}, que são tirosina-quinases da família *src* (DRÖGE *e cols.*, 1994), ativação de fatores transcripcionais responsivos a substâncias eletrofílicas, como HSFs (CHEN *e cols.*, 1995) ou NFκB (DRÖGE *e cols.*, 1994; TOYOKUNI *e cols.*, 1995) e iniciação da transcrição dos oncogenes *fos* e *jun* (BERGELSON *e cols.*, 1994). Somados, os efeitos da depleção nos estoques de GSH influenciam na modulação da resposta imunológica (GMÜNDER *e cols.*, 1990; DRÖGE *e cols.*, 1994) e no desenvolvimento de certos tipos de cânceres humanos (SILBER *e cols.*, 1992; SCHWARTZ *e cols.*, 1993; TOYOKUNI *e cols.*, 1995). Na verdade, a maioria das células tumorais já caracterizadas apresenta alta taxa de geração de espécies ativas de oxigênio e/ou intenso estresse oxidativo, que foi definido por TOYOKUNI *e cols.* (1995) como "estresse oxidativo persistente". Este, por sua vez, como mencionado acima, favorece a ativação de fatores de transcrição e proto-oncogenes, além de estar relacionado com a instabilidade genômica, resistência múltipla a agentes quimioterápicos, invasividade e metástase (TOYOKUNI *e cols.*, 1995). A razão pela qual se estabelece este estresse não é conhecida atualmente. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que a alta atividade da COX presente nos tumores possa ser um fator gerador desse estado, já que a síntese de PGs é acompanhada de geração de hidroperóxidos, necessários para a ativação da própria enzima (CAMPBELL, 1990; VANE, 1994).

Para verificar a resposta proliferativa, um indicativo da função imunológica, apresentada pelos linfócitos em estudo, transfectados e não-transfectados, incubados na presença de PGA₂ nas concentrações de 10 μM e 40 μM ou submetidas a choque térmico de 42°C, as células foram incubadas na presença de Timidina [2-¹⁴C], com a finalidade de medir a captação pelas células e incorporação da mesma em DNA. A capacidade de captação de Timidina [2-¹⁴C], pelos grupos celulares

estudados foi avaliada para excluir a possibilidade de que alterações na captação (que é mediada por transportadores específicos para nucleotídeos) pudessem refletir-se nos resultados de incorporação obtidos.

As células não-trasfectadas, quando tratadas com PGA_2 10 μM , por 6 horas, apresentam tendência para aumentar a captação quando comparadas ao controle. No entanto, as diferenças de captação apresentadas pelos grupos de células transfectadas e não transfectadas, entre si, ou entre grupos, não foram significativas (**FIG 21**). Resultado semelhante foi obtido nos grupos tratados por 24 horas (**FIG 22**), ou mesmo para os grupos tratados com choque térmico (**FIG 23**). Posteriormente foi avaliada a capacidade de incorporação de Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$], no DNA das células tratadas (linfócitos controle e transfectados). Não se observam diferenças significativas entre os grupos controle e transfectados, na presença de prostaglandina A_2 , após 6 horas de incubação (**FIG 24**). Resultado semelhante para incubação durante 24 horas (**FIG 25**). As células (linfócitos controle e transfectados) foram, também, tratadas com choque térmico e incubadas com Timidina [$2\text{-}^{14}\text{C}$], não sendo possível identificar diferenças significativas entre os grupos (**FIG 26**).

Conforme discutido acima, a presença da bomba MRP1/GS-X parece conferir resistência ao choque oxidativo. Assim, resolvemos testar a capacidade proliferativa de linfócitos transfectados com o gene da bomba MRP1/GS-X humana quando as células foram desafiadas com diferentes concentrações de PGA_2 . Os experimentos foram conduzidos por até 3 dias. A **Fig. 28** mostra os resultados obtidos. Apesar de os testes com incorporação de timidina marcada em DNA terem sido inconclusivos para 24 h de cultivo (**Fig. 25**), o que se reflete nas contagens celulares 1 dia após o tratamento com a PGA_2 (**Fig. 28A e B**), ao longo dos períodos de cultivo celular linfócitos transfectados

mostraram-se muito mais aptos a se proliferarem quando estimulados pela Con A. Na verdade, enquanto a viabilidade e a contagem celulares diminuíram significativamente nas células não-transfectadas tratadas com PGA_2 (ação citostática e citotóxica combinadas), as células superexpressando a bomba GS-X chegaram mesmo a apresentar um aumento na capacidade proliferativa entre 48 e 72 h de cultura (**Fig. 28 B**).

CP-PGs sendo produzidas intracelularmente podem regular, assim, uma série de processos vitais. De fato, como abordado anteriormente, as possibilidades de um papel funcional para as CP-PGs produzidas intracelularmente são muitas. Mas, mesmo que estes eicosanóides sejam produzidos apenas extracelularmente, pela interconversão a partir de PGs parentais, seu efeito sobre a funcionalidade celular é potentíssimo depois de serem captados pelas células. Logo, a exportação de CP-PGs conjugadas a moléculas de GSH através da ATPase MRP1/bomba GS-X fornece a base para a regulação das concentrações intracelulares de CP-PGs, modulando, portanto, o nível de supressão promovido por estes possíveis sinalizadores negativos.

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 com câncer com a finalidade de transfusão autóloga [(KOLBERG e cols., 2005 e HOMEM DE BITTENCOURT & CURI, 2001 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 tumor de Walker 256 (KOLBERG e cols., 2005). 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 sugerimos um método alternativo de transfecção de linfócitos, o qual está baseado na abordagem de um adeno-retrovírus quimérico (REYNOLDS e cols., 1999). 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.

Tomados como um todo os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a imunossupressão observada em portadores de câncer em fase final possa estar relacionada ao acúmulo de CP-PGs em linfócitos destes indivíduos. 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.

Em resumo, a transfecção de linfócitos com o gene da bomba MRP1/GS-X por eletroporação mostrou-se perfeitamente viável e sugere que a expressão desta proteína possa conferir resistência ao tratamento com substâncias eletrofílicas de maneira a ajustar o estado redox celular mais rapidamente, o que impede o efeito citotóxico destas substâncias. Os detalhes sobre o mecanismo pelo qual CP-PGs interferem na expressão fisiológica desta proteína estão sendo estudados atualmente em nosso laboratório.

Finalmente, o sucesso das técnicas transfecção e de avaliação das mesmas testadas neste trabalho, garantem que possamos, imediatamente, começar os estudos de autotransfusão de amostras contendo linfócitos superexpressando a bomba GS-X/MRP, pelo menos em ratos. Somados aos resultados do estresse oxidativo, metabolismo da glutathiona e expressão de proteínas de choque térmico, esses resultados permitem que se possa estabelecer o nível de necessidade de transfusão autóloga em animais experimentais e, possivelmente em humanos no futuro, de linfócitos transfectados com os genes codificando para as bombas GS-X a partir da "leitura" dos parâmetros aqui estudados.

CONCLUSÃO

O oxigênio molecular é responsável pela rápida produção de espécies ativas (radicais livres), mesmo durante processos fisiológicos, podendo causar alterações no balanço redox, levando ao estresse celular. Para enfrentar o desafio da presença destes e outros radicais livres, desenvolveu-se, ao longo da evolução, um sistema de defesa. A glutatona (GSH) é uma das substâncias diretamente envolvida na recuperação do balanço redox celular, facilitando a conversão das oxidações.

Resultados anteriores de nosso grupo de trabalho sugerem que a imunossupressão e caquexia presentes nos estágios avançados de câncer, possam estar relacionadas com a atividade e expressão da MRP1/bomba GS-X, a qual tem papel importante na exportação de metabólitos de medicamentos, dissulfetos e prostaglandinas ciclopentenônicas, causando acúmulo das mesmas em células do sistema imune (linfócitos) as quais apresentam menor expressão da bomba (KOLBERG *e cols*, 2005). Esses achados corroboram resultados existentes na literatura que sugerem um estado de estresse persistente no câncer, relacionado a massiva presença de radicais livres e a coincidente baixa expressão de enzimas antioxidantes, em células tumorais agressivas, de rápida proliferação e metastáticas, portanto, de alta malignidade (TOYOKUNI, *e cols*, 1985).

Os resultados dos experimentos realizados para identificar qual o envolvimento da MRP1 na resposta ao estresse celular, e qual a interferência do estresse celular na expressão e atividade da MRP1 permitiram concluir que:

1. Linfócitos, obtidos de linfonodos mesentéricos de rato, podem ser transfectados com o gene MRP1, por eletroporação, e serem, posteriormente cultivados por, pelo menos 72 horas, sob diferentes condições de estresse celular;

2. Os dados obtidos sugerem que linfócitos transfectados com o gene da MRP-1, que a expressão da MRP-bomba-GSx possa estar aumentada quando os mesmos são submetidos ao estresse celular, e, também, que a atividade da MRP-bomba GS-x possa estar aumentada, porém dados mais significativos deverão ser futuramente investigados.

3. Nossos resultados sugerem que a expressão de proteínas de choque térmico HSPs, em linfócitos mesentéricos de rato, transfectados com o gene da MRP-1 contido no plasmídeo pRc/RSV, está intimamente ligada à resposta ao estresse celular, confirmando dados já existentes na literatura para outros tipos celulares.

4. Linfócitos transfectados com o gene da MRP-1, contido no vetor pRc/RSV demonstraram ser mais resistentes aos efeitos citotóxicos e citostáticos ao tratamento com prostaglandinas PGA_2 , confirmando dados anteriores de nosso laboratório (KOBBERG *et al.*, 2005), o que sugere uma possível razão para sua eficiência em ao enfrentar situações de estresse celular.

5. Em conjunto nossos dados sugerem que linfócitos transfectados com o gene da MRP-1 demonstram melhor competência em enfrentar situações de estresse celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adler V., Yin Z, Tew, K.D. e Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*, 18:6104-11,1999.
2. Akerboom, T. P. M. & Sies, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.*, 77:373-82, 1981.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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, 1992.
9. Amici, C., Palamara A.T. e Santoro, M.G. Induction of thermotolerance by prostaglandin A in human cells. *Exp Cell Res*, 207(2):230-4, 1993.

10. Amin, J., Ananthan, J. and Voellmy R. Key features of heat shock regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3761-3769. 1988.
11. Anderson, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.*, 113:548-55, 1985.
12. Anderson, Mary E. e Meister, Alton. Transport and direct utilization of γ -glutamylcysteine for glutathione synthesis. *Biochemistry*, 80: 707-711, 1983.
13. Aniya, Y. & Naito, A. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 45:37-42, 1993.
14. 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.
15. Arrigo, A.P. Gene expression and thiol redox state. *Free Radic Biol Med.*, 27:936-44, 1999.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. Benjamin, I.J. Horie, S. Greenberg, M.L. Alpern, R.J. Williams, R.S. Induction of stress protein in cultured myogenic cells. Molecular signals for the activation of heat shock transcription factor during ischemia. *J. Clin. Invest.* 89: 1685-1689. 1992.
21. 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
22. Bergström, S.; Carlson, L. A.; Weeks, J. R. The prostaglandins: a family of biologically active lipids. *Pharmacol. Rev.*, 20:1-48, 1968.
23. Bertram, J., Palfner, K., Hiddemann, W. Kneba, M., Increase of PGP-mediated multidrug resistance by hsp90 beta. *Anticancer Drugs*, 7:838-45, 1996.
24. 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.
25. 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.
26. Board, Philip G. Transport of glutathione S-conjugate from human erythrocytes. *FEBS letters*, 124:2,1981.
27. Borst, P., Evers, R., Kool, M. e Wijnholds, J. The multidrug resistance protein family. *Biochem. Bhiophys Acta*, 1461: 347-357, 1999.
28. 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.
29. 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.

30. 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.
31. Bukau, B., Horwich, A.L., The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366, 1998.
32. Burgoyne, Robert D. & Morgan, Alan. The control of AA levels. *TIBS* 15:365-366, 1990.
33. Campbell G.A. Osteomalacia: diagnosis and management. *Br J Hosp Med.* 44(5): 332-3, 336-8. 1990.
34. Carlberg, I. & Mannervik, B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113:484-90, 1985.
35. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:13926-13931, 2002.
36. Chang, J.; Musser, J. H.; Mcgregor, H. Phospholipase A2: function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.*, 36:2429-36, 1987.
37. Chaudhary, P.M. e Robinson, I.B., Activation of *MDR1* (PGP) gene expression in human cells by protein kinase C agonists, *Oncol Res.*, 4:281-90, 1992.
38. Chen, H.W. Yang, H.L., Jing, H.H., Tsai, Y.F., Tsai, L.Y, Chen, S.S., Yang, R.C. Synthesis of HSP70 induced by exercise in high temperature. *Chin. J. Physiol.* 38:241-246. 1995.
39. Cheetham, M & Caplan, A.J. Structure, function and evolution of DnaF: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress & Chaperones*, 3 (1) 28-36, 1998.
40. Childs, S. e Ling, V., The *MDR* superfamily of genes and its biological implications. *Important Adv Oncol.*, 1994:21-36, 1984.
41. Cobb, M.H. e Goldsmith, E.T., How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem.*, 270:14843-6, 1995.
42. Cohem, D., Yu, L., Rzepka, R., Horwitz, S.B. Identification of two nuclear protein binding sites and their role in the regulation of murine *mdr1a* promoter. *DNA Cell Biol*, 13, 641-649, 1994.

43. Coles, J.G, Boscarino, C., Takahashi, M., Chang, A., Ritter, J., Dai, X., Du, C., Musso, G. Yamabi, H. Gonçalves, J. Kumar, A.S., Woodgett, J., Lu, H. e Hannigan G. Cardioprotective stress response in the human fetal heart. *J. Thorac Cardiovasc. Surg.* 129 (5): 1128-36, 2005.
44. Cole, S.P. & Deeley, R.G. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 20: 931-940, 1998
45. 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., and Deeley, R.G. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cell line. *Science* 258, 1650-1654, 1992.
46. Combates, N.J., Rzepka, R.W., Nhen, Y.N.P, Cohem, D. NF-IL6, a member of the C/EBP family of transcriptins factor, binds and trans-activates the human *MDR1* gene promoter. *J Biol chem*, 269:29715-19, 1994.
47. 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.
48. Curi, R., Homem de Bittencourt Jr., P.I., Costa Rosa, L.F.B.P., Fernandes, L.C., Santos, M.F., Almeida, A.F., and Carpinelli, A.R. Insulin and prostaglandins: possible signals between tumor and host immune system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28, 773-779, 1995.
49. D'Angio C.T. & Finkelstein J. N. (2000) Oxygen regulatin of gene expression: A study in opposites. *Mol Genet Metab* 71:371-80.
50. Davis, R.J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J biol Chem.*, 268:14553-6, 1993.
51. DE BRUIJN, M. H. L. Substrate specificity and the mdr pump. *Trends Biochem. Sci.*, 15:218-9, 1990.
52. Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2: 10, 2003.
53. 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.

54. 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.
55. Elia, G. & Santoro, M. G. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *Biochem. J.*, 300:201-9, 1994.
56. Elia, G. & Santoro, M. G. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *Biochem. J.*, 300:201-9, 1994.
57. Fardel, O., Lecreur, V. e Guillouzo, A., The PGP multidrug transporter. *Gen. Pharmacology*, 27:1283-91, 1996.
58. Favalli, C, Garaci, E., Etheredge, E. Santoro M.G. e jaffe, B.M. Influence of PGE on the immune response in melanoma-bearing mice. *J Immunol*, 125 (2): 897-902, 1980.
59. Fehrenbach, E. and Niess, A.M. Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exercise Immunology Review*. 5: 57-77. 1999.
60. Fehrenbach, E., Passek, f., Niess, a.m., Pohla, h., Weinstock, c., Dickhuth, h.h., Northoff, h. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. *Méd. Sci. Sports Exerc.* 32(3): 592-600. 2000.
61. Feige, U. & Polla, B.S., Heat shock proteins: the Hsp70 family, *Experientia* 50, 979-985, 1994.
62. Feinstein, D.L., Galea, E., Aquino, D.A., Li, G. C., Xu, H. e Reis, D. J. Heat shock protein 70 supresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NF- κ B activation. *J. Biol Chem*, 271:17724-17732, 1996.
63. Fitzpatrick, F. A. & Wynalda, M. A. Albumin-catalized metabolism of prostaglandin D2. *J. Biol. Chem.*, 258:11713-8, 1983.
64. Forman, B. M; Tontonoz, P.; Chen, J.; Brun, R. P.; Spiegelman, B. M.; Evans, R. M. 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83, 803-812, 1995
65. Fukushima, M., Kato, T., Ota, K., Arai, Y., Narumiya, S., Hayaishi, O. 9-deoxy- Δ 9-prostaglandin D2, a prostaglandin D2 derivative with potent antineoplastic and weak smooth muscle-contracting activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 626-633, 1982.

66. 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.
67. 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.
68. Galter, D., Mihm, S. & Dröge, W. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factors κ B and the activator protein-1. *J. Biochem*, 221: 639-648, 1994.
69. 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.
70. Germann, U.A., PGP-a mediator of *MDR* in tumor cells. *Eur J Cancer* 32^A:927-944. 1996.
71. Gmunder, H., Roth S., Eck H.P., Gallas H., Mihm S. , Drodge V. Interleukin-2 mRNA expression, lymphokine production and DNA synthesis in glutathione-depleted T cells. *Cell Immunol.* 130(2):520-8. 1990.
72. Godwin, A.K., Meister, A., Dwyer, P.J., Huang, C.S., Hamilton, T.C., and Anderson, M.E. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3070-3074, 1992.
73. Gouin E., Vulliez-Le Normand B., Gouyette A., Haidet V., Nagel M., Dray F. Tumor cell biotransformation products of prostaglandin A1 with growth inhibitory activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 141(3):1254-60. 1986.
74. Gotoh, N., Graham A ., Nikl, E. Darley-Usmar, V.M. Inhibition of glutathione synthesis increases the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to human monocytes and macrophages. *Biochem J.*296 (Pt 1): 151-4. 1993.
75. Habig, W. H. & Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.*, 77:218-31,1981a.
76. Habig, W. H. & Jakoby, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.*, 77:398-404, 1981b.

77. Hales B.F., Huang C. Regulation of the Yp subunit of glutathione S-transferase P in rat embryos and yolk sacs during organogenesis. *Biochem Pharmacol.* Jun 1;47(11):2029-37, 1994.
78. Ham, E.A., Cirillo, V.J., Zanetti, M.E., Kuehl F.A. Jr. Estrogen-directed synthesis of specific prostaglandins in uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72(4):1420-4. 1975.
79. Hammond, G.L., Lai, Y.K. Lai, e Markert, C.L. Diverse forms of stress lead to new patterns of gene expression through a common and essential metabolic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:3485-3488. 1982.
80. Hartl, U.F., Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-580, 1996.
81. Harvie, R.M.; Davey, M.W., Davey, R.A., Increased MRP expression is associated with resistance to radiation, anthracyclins and teoposide in cells treated with fractionated gamma-irradiation. *Int. J Cancer*, 73: 164-7, 1997.
82. Hempel, S.L. & Wessels Prostaglandin E2 synthesis after oxidant stress is dependent on cell glutathione content. *APS C*:1392-1399, 1993.
83. 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
84. Hibi, M. Lin, ^a, Smeal, T., Minden, ^a, Karin, M., Identification of an oncoprotein- and UV- responsive protein kinase that binds and potentiates the C-Jun activation domain. *Gene dev.*, 7:2135-48, 1993.
85. 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.
86. 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.
87. Homem de Bittencourt Jr., P.I., Curi, R., and Williams, J.F. Glutathione metabolism and glutathione S-conjugate export ATPase (MRP1/GS-X pump) activity in cancer. I. Differential

- expression in human cancer cell lines. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45, 1227-1241, 1998a.
88. Homem de Bittencourt Jr., P.I., Senna, S.M., Vidor, A.C., Miyasaka, C.K., Curi, R., and 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. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45, 1243-1254, 1998b.
 89. Homem de Bittencourt Jr., P.I., Miyasaka, C.K., Curi, R., and Williams, J.F. (1998c) Effects of the antiproliferative cyclopentenone prostaglandin A1 on glutathione metabolism in human cancer cells in culture. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45, 1255-1264, 1998c.
 90. 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.
 91. Homem de Bittencourt Jr., P.I. & R. Curi Antiproliferative prostaglandins and MRP/GS-X pump: role in cancer immunosuppression and insight into new strategies in cancer gene therapy. *Biochem. Pharmacol.*, 62:811-819, 2001.
 92. 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
 93. Homem de Bittencourt Jr., P.I., and Curi, R. Transfer of cholesterol from macrophages to lymphocytes in culture. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 44, 347-362, 1998.
 94. Homem de Bittencourt Jr., P.I., Peres, C. M., Yano, M. M., Hirata, M. H., and Curi, R. Pyruvate is a lipid precursor for rat lymphocytes in culture: evidence for a lipid exporting capacity. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30, 631-641, 1993.
 95. Homem de Bittencourt Jr., P.I., Pontieri, V., Curi, R., and Lopes, O.U. Effects of aspirin-like drugs on Walker 256 tumor growth and cachexia in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 1039-1042, 1989.
 96. Homem de Bittencourt Jr., P.I., Yano, M.M., Hirata, M.H., Williams, J.F., and 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, 463-475, 1994.

- 97.
98. 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
99. Honn, K.V., Bockman, R.S., Marnett, L.J. Prostaglandins and cancer: a review of tumor initiation through tumor metastasis. *Prostaglandins* 21, 833-864, 1981.
100. Huang, E.; Zhang, H.; Bae, S.W & Liu, A.Y.C. Thiol reducing reagents inhibit heat shock response. *Biological Chemistry*, 269:30718-30725, 1994.
101. Hunt, C. Morimoto, R. I. Conserved features of eukaryotic HSP70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human HSP70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6455-6459. 1995.
102. Huwyler, J. Gut, J. Single-step organic extraction of leukotrienes and related compounds and their simultaneous analysis by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 188 (2):374-82. 1990.
103. 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
104. Irvine, R. F. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.*, 204:3-16, 1982.
105. Ishikawa, T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci*, 17: 463-468, 1992
106. Ishikawa, T., Li, Z.-S., Lu, Y.-P., and Rea, P.A. The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function and gene expression. *Biosci. Reports* 17, 189-207, 1997.
107. Ishikawa, T., Wright, C.D., and Ishizuka, H. GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diaminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 269, 29085-29093, 1994.
108. 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 an inhibitor of the ATP-dependent glutathione S-conjugated export pump (GS-X pump). *Biochem. J.* 336: 569-576, 1998

109. 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.
110. 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
111. Ito, S.; Narumiya, S.; Hayaishi, O. Prostaglandin D2: a biochemical perspective. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids*, 37:219-34, 1989.
112. Jaeschke, H. Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia. *Am. J. Physiol.*, 258(4Pt1):G499-505, 1990.
113. Janssen-Heininger Y.M, Poynter M.E. e Bauerle P.A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappa B. *Free Radic Biol Med*, 28:1317-27, 2000.
114. Jedlitschky, G.; Leier, I.; Buchholz, U.; Center, M. & Keppler, D. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein *Cancer Research*, 54: 4833-4836, 1994.
115. Jin, S, e Scotto, J.W., Transcriptional regulation of the *MDR1* gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF- κ B. *Mol Cell Biol.*, 18:4377-84, 1998.
116. 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.
117. Kelley, W.L., The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends in Biochem, Sc* 23, 222-227, 1998.
118. Kelly, D.A., Tiidus, P.M., Houston, M.E. and Noble, E.G. Effect of vitamin E on HSP70 induction. *Can.J. Appl. Physiol.* 18:413P. 1993.
119. Kikawa, Y.; Narumiya, S.; Fukushima, M.; Wakatsuka, H. 9-deoxy- $\Delta^9,\Delta^{12-13,14}$ -dihydroprostaglandin D2, a metabolite of prostaglandin D2 formed in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1317-21, 1984.

120. Kim, S.H., Hur, W.Y., Lim, Y.S., Kang, C.D., Kim, C.M., Involvement of heat shock factor in regulating transcriptional activation of *MDR* gene in multidrug-resistant cells. *Cancer Let.*, 115:9-14, 1997.
121. Kim, S.H., Yeo, G.S., Lim, Y.S., Kang, C.D., Kim, C.M., Chung, B.S., Supression of *MDR* *via* inhibition of heat shock factir by quercetin in *MDR* cells. *Exp Mol. Med.*, 30:87-92, 1998.
122. Kim, S.H., Lee, S.H., Kwak, N.H., Kang, C.D., Chung, B.S., Effect of Raf protein kinase on the human multidrug resistance 1 (*MDR1*) gene promoter. *Cancer Lett.*, 98:199-205, 1996.
123. Kim, Y., Vera, M.E. de; Watkins, S.; Billiar, T.R. Nitric oxide protects culture rat hepatocytes fro tumor necroses factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *Biological Chemistry*, 272:1402-1411, 1997.
124. 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
125. Kolberg, A.; Rosa, T.G.; Puhl, M.T.; Scola, G., Janner, D.R., Maslinkiewicz, A.; Lagranhan, D.J. Curi, R.; Homen de Bittencourt Jr., P.I., Low expression of *MRP1*/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumor-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochem Funct.* 2005 Sep 19. (*Published on line DOI 10.1002/cbf. 1290*).
126. Kondo, T., Yoshida, K. Urata, Y., Goto, S. Gasa, S.; Tanigushi, N. γ -Glutamylcysteine Synthetase and active trasnport of glutathione-S-conjugate are responsive to heat shock in K562 eruthroid cells. *J. Biol Chem.*, 268:20366-20372, 1993.
127. 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
128. Krohne-Ehrich, G.; Schirmer, R. H.; Untucht-Grau, R. Glutathione reductase from human erythrocytes. Isolation of the enzyme and sequence analysis of the redox-active peptides. *Eur. J. Biochem.*, 80:65-71, 1971.
129. Kuo, M.T. Bao, J., Furuichi, M., Yamane, Y., Gomi, A., Savaraj, N., Masuzawa, T.; Ishikawa, T. Frequent coexpression of *MRP*/GS-X pump and γ -Glutamylcisteine synthetase mRNA in Drug-resistant

- cells, untreated tumour cells and normal mouse tissue. *Biochem Pharmacol*, 55: 605-615, 1998.
130. Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.^a, Ahmad, M.F., Avruch, J., Woodgett, J.R., The stress-activated protein kinases subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156-60, 1994.
 131. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
 132. Le Bras, M.; Clement, M.V.; Pervaiz, S. Brenner, C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol. Histochemol.* 20(1):205-19. 2005
 133. Lee, C.H., Bradley, G., Ling, V., Increased PGP mRNA stability in rat liver tumors *in vivo*. *J Cell Physiol*, 177:1-12, 1998.
 134. Lee, C.H., Bradley, G., Ling, V., Overexpression of the class II PGP gene in primary rat hepatocyte culture: evidence for increased mRNA stability, *Cell Growth Differ.*, 6:347-354, 1995.
 135. LEUNG, K. H. & MIHICH, E. Prostaglandin modulation of development of cell-mediated immunity in culture. *Nature*, 288:597-600, 1980.
 136. Li, G.C. & Werb, Z. Correlation between synthesis of heat shock protein and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 3218-3222.
 137. Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
 138. Lunn, G.; Dale, G. L.; Beutler, E.. Transport accounts for glutathione turnover in human erythrocytes. *Blood*, 54:238-4, 1979.
 139. McGiff, J.C. & Quilley, J. 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *Am J Physiol* 277 (3pt2):R607-23, 1999.
 140. Mannervik, B. & Gluthenberg, C. Glutathione transferase. *Methods Enzymol.*, 77:231-5, 1981.
 141. Mannervik, B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 113:490-5, 1985.
 142. Meister, A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220:472-7, 1983.

143. Meister, A. Glutathione synthetase from rat kidney. *Methods Enzymol.* 113:393-9. 1985a.
144. Meister, A. S Glutamate synthase from *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*;113:327-37. 1985b.
145. Meyer, T.N. e Da Silva, A.L. Resposta celular ao estresse. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 45(2): 181-188. 1999.
146. Miyazaki, M., Kohno, K., Uchiumi, T. Tanimura, H., Matsuo, K, Nasu, M, Kuwano, M., Activation of human MDR1 gene promoter in response to heat shock stress. *Biochem Bioph Res Co.*, 187:677-84, 1992.
147. Mickley, L.A., Bates, S.R., Richert, N.D., Currier, S., Tanaka, S., Foss, F. Rosen, N., Fojo, ^a, Modulation of the expression of a multidrug resistance gene (*mdr1-1/PGP*) by differentiating agents. *J Biol Chem.*, 264:18031-40, 1989.
148. Mihm, S.; Galter, D.; Dröge, W. (1995) Modulation of transcription factor NF- κ B activity by intracellular glutathione levels and by variations of the extracellular cysteine supply. *Faseb*, 9: 246-252.
149. 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.
150. 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.
151. Morrow, C.S., Nakagawa, M., Goldsmith, M.E., madden, M.J., Cowan, K.H., Reversible transcriptional activation of *mdr1* by sodium butyrate treatment of human colon cancer cells. *J Biol Chem*, 269: 10739-46, 1994.
152. 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.
153. Narumiya, S., Ohno, K., Fukushima, M., and Fujiwara, M. Site and mechanisms of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A₂ and Δ 12-

- prostaglandin J2 in nuclei. *Pharmacol. Exp. Ther.* 242, 306-311, 1987.
154. 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.
 155. Newsholme, E. A. & Leech, A.R. *Biochemistry for the Medical Science.* John Wiley & Sons. Toronto, 1995.
 156. Oda, Y., Saito, T., Tateishi, N. Ohishi, Y., Tamiya, S. Yamamoto, H., Yokoyama, R., Uchiumi, T., Iwamoto, Y., Kuwano, M. & Tsuneyoshi, M. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human soft tissue sarcomas. *Int. J. Cancer*, 114(6):854-62, 2005.
 157. Ohga, T., Koike, K., Ono, M., Makino, Y., Itakaki, Y., Tanimoto, M., Kuwano, M., Kohno, K., role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycinC, and ultraviolet light. *Cancer Res.* 56:4224-4228, 1996.
 158. 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.
 159. 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.
 160. Ohno, K.; Nakane, H.; Kato, T.; Fukushima, M. Suppressing 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.
 161. Oosthuizen, M.M.; Nel, M.J.; Greyling, D. Heat shock treated oesophageal cancer cells become thermosensitized against anticancer drugs. *Anticancer Res.*, 20:2697-703, 2000.
 162. Pace-Asciak, C.R. & Lee, W.S. Purification of hepoxilin epoxide hydrolase from rat liver. *J. Biol Chem*, 265: 9310-9313, 1989.

163. Parker, C. W. Leukotrienes and prostaglandins in the immune system. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.*, 16:113-33, 1986.
164. Perrenoud A. e Sauer, U. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 187(9):3171-9, 2005.
165. 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.
166. Petronini, P.G. Alfieri, C. Campanini, C. Borghetti, A.F. Effect of na alkaline shift on induction of the heat shock response in human fibroblast. *J. Cell Physiol.* 162: 322-329. 1995.
167. 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.
168. Phipps, R.P., Stein, S.H., Roper, R.L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol. Today.* 12, 349-352, 1991.
169. Phillips, M.S., Mantle T.J. Inactivation of mouse liver glutathione S-transferase YfYf (Pi class) by ethacrynic acid and 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). *Biochem J.* 294 (Pt 1):57-62. 1993.
170. Piomelli, D. e Greengard P. Lipoxigenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signaling. *Trends Pharmacol Sci*, 11(9): 367-73, 1990.
171. Pines, A., Bivi, N., Romanelo, M. Damante, G., Kelley, M.R., Adamson, E.D., D'Andrea, P., Quadrifoglio, F., Moro, L. e Tell, G. Cross-regulation between Egr-1 and APE/Ref-1 during early response to oxidative stress in the human osteoblastic HOBIT cell line: evidence for an autoregulatory loop. *Free Radic Res.* 39(3):269-81. 2005.
172. Potter, H. Electroporation in biology: methods, application and instrumentation. *Anal. Biochem.*, 174:361-373, 1988.
173. Potter, H., Weir, L., Leder, P. Enhancer-dependent expression of human κ immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B-lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:7161-7165, 1984.

174. Rahman, I. & MacNee, W. Regulation of redox Glutathion levels and gene trasncription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med*, 28:1405-20, 2000.
175. Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J., Pro-inflammatory cytokines and enviromental stress cause p38 mitogen-activated protein kinases activation by dual phsphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol chem.*, 270:7420-6, 1995.
176. Raymond, M. e Gros, P. Cell-specific activity of cis-acting regulatory elements in the promoter of the mouse MDR gene *mdr1*, *Mol Cell Biol*, 10:6036-40, 1990.
177. Reynolds P.E., Arias C.A., Courvalin P. Gene vanXYC encodes D,D - dipeptidase (VanX) and D,D-carboxypeptidase (VanY) activities in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol Microbiol*. 34(2):341-9. 1999.
178. Riabowol K. T., Mizzen, L. A.; Welch, W. J. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science*, 256:500-502, 1998.
179. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573. 1962.
180. Ritossa, F. New puffs induced by temperayture shock, DNP and salicilate in salivary chromossomes of *D. melanogaster* *Drosophila*. *InformationService* 37, 122-123, 1963.
181. 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
182. Rossi, A.; Kapahi, P.; Natoli, G.; Takahashi, T.; Chen, Y.; Karim, M.; Santoro, M. G. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of κ B kinase. *Nature* 403: 103-108, 2000
183. Ruetz, S. & Gros, P. A mechanism for P-glycoprotein action in multidrug resistance: are we yet there? *Trends Pharmacol. Sci.* 15:260-263, 1984
184. Samelman, T.R. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Exp Physiol*. 85(1): 92-102. 2000.

185. Santoro, M.G., Philpot, G.W. e Jaffe B.M. Inhibition of tumour growth *in vivo* and *in vitro* by prostaglandin E. *Nature*, 263:777-779, 1976.
186. Santoro, M.G., Benedetto, A. Carruba, G. Garaci, E. e Jaffe B.M. Prostaglandin A compound as antiviral agents. *Science*, 206 (4460): 1032-4, 1980.
187. Santoro, M.G., Carruba, G. Garaci, E, Jaffe, B.M. e Benedetto, A. Prostaglandins on the A series inhibit Sendai virus replication in cultured cells. *Gen. Virol.* 53(pt 1):75-83, 1981.
188. Santoro, M.G., Fukushima, M. Benedetto e A, Amici C. PGJ2, a new antiviral prostaglandin: inhibition of Sendai virus replication and alteration of virus protein synthesis. *J Gen Virol* 68 (Pt4): 1153-8, 1987.
189. Santoro, M.G., Garaci, E. 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.
190. 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. USA*, 86:8407-11, 1989a.
191. Santoro, M. G.; Amici, C.; Elia, G.; Benedetto, A.; Garaci, E. Inhibition of virus protein glycosylation as the mechanism of the antiviral action of prostaglandin A in Sendai virus-infected cells. *J. Gen. Virol.*, 70:789-800, 1989b.
192. Santoro, M.G., Garaci, E., e Amici, C. Induction of HSP70 by prostaglandins. in *Stress proteins, induction and function* . pp. 27-44, Springer-Verlag, Berlin, 1990.
193. Santoro, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, 59: 66-63, 2000.
194. Santoro, R e Lucia, F.D., Many players, one goal: how chromatin states are inherited during cell division. *Biochem Cell Biol*, 83(3):332-43, 2005.
195. 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.

196. Schwartz J., Shklar G., Trickler D. p53 in the anticancer mechanism of vitamin E. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 29B(4):313-8. 1993.
197. Schlesinger, M.J. Heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (21):12111 – 4, 1990.
198. 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.
199. Seelig, J. F. & Meister, A. Glutathione biosynthesis; gamma-glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Methods Enzymol.*, 113:379-90, 1985.
200. Sen, C.K. Cellular thiols and redox-regulated signal. *Curr Top Cell Regul.*, 36:1-30, 2000.
201. Serhan, C.N. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution (review). *Prostaglandin Other Lipid Mediat.*, 68-69:433-455, 2002.
202. 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.
203. Sharom, F.J., The PGP efflux pump: how does it transport drugs? *J. Memb. Biol.*, 160:161-75, 1997.
204. Siddiqui, R.A. & Williams, J.F. Interactions of vasopressin and prostaglandin E2 in the development of cancer cachexia, *Med. Sci. Res.* 15: 45-46, 1987.
205. Silber J.R, Gallick W., Wu J.M., Siperstein M.D. The effect of mevalonic acid deprivation on enzymes of DNA replication in cells emerging from quiescence. *Biochem J.* Dec 15;288 (Pt 3):883-9, 1992.
206. Sindhu, R.K., Ehdai, A. , Farmand, F., Dhaliwal, K.K., Nguyen, T. Zhan, C.D., Roberts, C.K., Vaziri, N.D. Expression of catalase and glutathione peroxidases in renal insufficiency, *Biochem Biophys Acta* 22; 174391-20;86-92, 2005.
207. Sukhai, M. e Piquette-Miller, M., Regulation of the Multidrug Resistance genes by stress signals. *J. Pharm Pharmacol.* 3(2):268-280, 2000.

208. Sukhai, M.; Pak, A.; Yong, A.; Piquette-Miller, M., IL-6 decreases PGP expression in cultured rat hepatocytes. *AAPS Pharm Sci.*, 1:S249, 1999.
209. Sukhai, M., Yong, A.; Piquette-Miller, M., Concentration-dependent effects of IL-1 and IL-6 on expression of PGP in cultured hepatocytes. *Clin Pharm Ther.*, 67:126, 2000.
210. Sukhai, M.; Yong, A.; Piquette-Miller, M., Decreased expression of PGP in cultured hepatocytes co-incubated with IL-1 and IL-6. *Clin Pharm Ther.*, 67:127, 2000.
211. Sullivan, G.F., Yang, J.L., Vasil, A., Yang, J., Bash-Babula, J., Hait, W.N., Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells. *J clin Invest.* 105: 1261-7, 2000.
212. Sultana, R.; Butterfield, D.A. Oxidatively GST and MRP1 in Alzheimer's disease brain: implications for accumulation of reactive lipid peroxidation products. *Neurochem Res.* Dec;29(12):2215-2, 2004.
213. Sundseth, R., MacDonald, G., Ting, J, King, A.C., DNA elements recognizing NF- κ B and Sp-1 regulate the human MDR promoter. *Mol Pharmacol*, 51: 963-971, 1997.
214. Tapan K. Bera, Carlo Iavarone, Vasantha Kumar, Sanghyuk Lee, Byungkook Lee, e Ira Pastan. MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:6997–7002, 2002.
215. Tavaría M.; Gabriele, T.; Kola, I.; Anderson, R.L., A hitchhiker's guide to HSP70 family. *Cell Stress & Chaperones* 1(1) 23-28, 1996.
216. Taylor, R.P., Harris, M.B., Starnes, J.W. Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am. J. Physiol.* 276(3 Pt 2): H1098-102. 1999.
217. 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.
218. Tisdale, M.J. & Dhesi, J.K. Inhibition of weight loss by ω -3 fatty acids in an experimental cachexia model. *Cancer Res.* 50, 5022-5026, 1990.

219. Tissières, A. Mitchell, H. K. Tracy, U.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosomal puffs. *J. Mol. Biol.*, 84: 389-398.
220. Tortora, G. *Corpo Humano - Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*. 4ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.
221. Toyokuni, S.; Okamoto, K.; Yodoi, J.; Hiai, H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*, 358: 1-3, 1995.
222. Tusnády, G.E., Bakos, E., Váradi, A., and Sarkadi, B. Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett.* 402, 1-3, 1997.
223. Urade, Y., Kaneko, T., Fujimoto, N., Watanabe, Y., Mizuno, N., and Hayaishi, O. Purification, characterization, and immunohistochemistry of rat brain prostaglandin D synthase. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 15, 549-551, 1985.
224. Urade, Y., Ujihara, M., Horiguchi, Y., Ikai, K., and Hayaishi, O. The major source of endogenous prostaglandin D₂ production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthase in histiocytes, dendritic, and Kupfer cells in various rat tissues. *J. Immunol.* 143, 2982-2989, 1989.
225. 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 Kupfer cells in various rat tissues. *J. Immunol.*, 143:2982-9, 1989.
226. Vane J.R., Botting R.M. Regulatory mechanisms of the vascular endothelium: an update. *Pol J Pharmacol.* 46(6):499-21. 1994.
227. Veseley MJ; Exon DJ; Clark JE; Foresti R; Green CJ; Motterlini R Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells; hemin and sodium nitroprusside are regulators in vitro. *Am J Physiol*; 275(4 Pt1): C1087-94, 1998.
228. 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.
229. Vigh, L., Maresca, B., and Harwood, J.L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem. Sci.* 23:369-374. 1998.

230. Vincenzini, M. T.; Favilli, F.; Stio, M.; Iantomasi, T. Intestinal glutathione transport system: a possible detoxification role. *Biochim. Biophys. Acta*, 1073:571-9, 1991.
231. Zhang K, Das N.P. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochem. Pharmacol.*, **47**:2063-8, 1994.
232. Wang C., Lee M.R. High-level expression of soluble rat hsc70 in *Escherichia coli*: purification and characterization of the cloned enzyme. *Biochem J.* Aug 15;294 (Pt 1):69-77. 1993.
233. Wang, Q e Beck, W.T., Transcriptional supression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild p53. *Cancer Res.* 58:5762-9, 1998.
234. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:13371-13373, 2002.
235. Welch, W.J. the mammalian heat shcok (or stress) response: a cellular defense mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 225: 287-304, 1987.
236. Welch, W.J. Garrels, J.I. Thomas, G.P. Lin, J.J. Feramisco, J.R. Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose- and Ca²⁺ - ionophore-regulated proteins. *J. Biol. Chem.* 258: 7102-7111. 1983.
237. Welch, W.J. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72: 1063-1081. 1992.
238. Wendel, A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 77:325-33, 1981.
239. Wickremasinghe, R.G. The role of prostaglandins in the regulation of cell proliferation. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 31, 171-179, 1988.
240. Williams, B.D. Chinkes, D.L. Wolfe, R.R. Alanine and glutamine kinetics at rest and during exercise in humans. *Med. Sci. Sports Exerc*, 30: 1053-1058. 1998.
241. 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.

242. Williams, J.F. & Matthaei, K.I. Cancer-induced body wasting: a review of cancer cachexia and a hypothesis concerning the molecular basis of the condition. *Asean J. Clin. Sci.* 2, 158-167, 1981.
243. Williams, J.F., and Siddiqui, R.A. Biochemistry of cancer cachexia: review of results, a new hypothesis and proposal for treatment. *Med. Sci. Res.* 18, 3-10, 1990.
244. Wolach B. Eliakim, A. Gavrieli, R. Kodesh, E. Yarom, Y. Schesinger, M. Falk, B. Aspects of leukocyte function and the complement system following aerobic exercise in young female gymnasts. *Scand J Med Sci Sports*, 8: 91-97. 1998.
245. Yan, M., Daí, T., Deak, J.C, Kyriakis, J.M, Zon, L.I, Woodget, J.R., Templeton, D.J., Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 372:798-800, 1994.
246. 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.