

Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

Faculdade de Ciências Médicas

Pós-Graduação em Farmacologia

Dissertação de mestrado

**Estudo da interação entre o Óxido Nítrico e
RAS em linhagens leucêmicas mielóides**

Marcelo Mendes Brandão

Orientadora: Profa. Dra. Sara T.O. Saad

Campinas, Maio de 1999

B733e

37736/BC

Foto da capa: estrutura tridimensional da proteína p21^{ras} por ressonância magnética nuclear. Fonte: Banco de dados de proteínas do Laboratório Nacional de Brookhaven, Nova Iorque – EUA

<http://www.pdb.ufmg.br>



Universidade Estadual de Campinas

**Estudo da interação entre Óxido Nítrico e gene RAS em
linhagens leucêmicas mielóides**

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do título de **Mestre** em Ciências na área de Farmacologia.

Aluno: Marcelo Mendes Brandão

Orientadora: Profa. Dra. Sara T.O. Saad

Campinas, Maio de 1999.

UNIDADE:	BC
N.º CHAMADA:	
V.:	Ex
TOMADA:	80/37736
PREÇO:	229/99
C:	<input type="checkbox"/>
D:	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO:	R\$ 11,00
DATA:	02/06/99
N.º OPD:	

CM-00123806-B

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

B733e Brandão, Marcelo Mendes
Estudo da interação entre o Óxido Nítrico e RAS em linhagens leucêmicas mielóides / Marcelo Mendes Brandão. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador: Sara Terezinha Olalla Saad
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Óxido Nítrico. 2. Leucemia. I. Sara Terezinha Olalla Saad . II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dra. Sara T. O. Saad

Membros:

1. Prof. Dra. Sara T. O. Saad

2. Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro

3. Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 03/05/99

Agradecimentos

À minha Mãe pelo apoio, ajuda e amor imensos.

À Dra. Sara Saad pelo apoio e incentivo e por me orientar na tese.

À Teresa pela amizade e todo o suporte para a realização da tese.

À Elizabeth pelas aulas de Imunocitoquímica.

Ao pessoal do Laboratório do Doutor Mário Saad pelo auxílio no Western blotting.

À Mônica por me auxiliar no estudo do RAS.

À Natasha, Adriana, Tatiana, Carol, Silvana Bordin, Roberta, Carlos, Lena, Alexandra, Fernando Lopes, Marcos Damião, Katinha e Arno pelo bate papo e todas as horas de descontração que passamos juntos.

À Dilmara pela ajuda com os géis.

À Simone pela organização das festas.

À Elisangela e Fernanda no auxílio com o Citômetro de Fluxo.

À Maristela por me ajudar a tirar as fotos das células.

À Raquel e Silvana pelo apoio logístico, tradução, envio de mails, cartas, resumos para congressos...

À Rosana e Sandrinha pela ajuda na confecção dos Slides.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	VI
Resumo	VIII
Introdução	
Oncogene RAS e p21.....	2
Óxido Nítrico e Óxido Nítrico Sintase.....	7
Objetivos.....	10
Metodologia	
Casuística.....	12
Cultura de células.....	12
Coleta de sangue periférico dos pacientes e controles.....	14
Indução da iNOS por Lipopolissacarídeo e Interferon γ	14
Montagem do experimento.....	16
Utilização de L-NAME e D-NAME como inibidores da produção de NO	17
Utilização de aminoguanidina como inibidor da produção de NO.....	18
Utilização de Nitroprussiato de sódio como doador de NO.....	19
Dosagem indireta de NO através de Nitrito dissolvido no meio.....	19
Análise imunológica de RAS, iNOS e MAPK	20
- Imunocitoquímica indireta (APAAP).....	21
- Immunoblotting ou Western Blotting	24
- Citometria de Fluxo	29
Resultados	
Análise imunológica da expressão da iNOS em células leucêmicas	
- Pacientes.....	36
- Linhagens Leucêmicas	39
Indução da iNOS em linhagens leucêmicas.....	42
Dosagem indireta de Óxido Nítrico	46
Inibição da liberação de NO	47

Papel do Óxido Nítrico na expressão e ativação do RAS	
- Análise imunológica da expressão do RAS	49
- Ativação da p21 ^{ras}	51
- Utilização do NPNA como doador de Óxido Nítrico	52
Discussão	56
Conclusões	66
Bibliografia	70
Apêndices	80
Anotações	93

Sumário de Figuras

- Estrutura tridimensional da proteína p21 ^{ras} ligada ao GDP	
Figura 1	3
- Esquema de ativação do RAS	
Figura 2	4
- Esquema da Cascata de ativação do RAS	
Figura 3	6
- Esquema da biossíntese do Óxido Nítrico	
Figura 4	9
- Estrutura química da L-arginina, L-NAME, Hidroxiarginina e L-citrulina	
Figura 5	17
- Estrutura química da aminoguanidina	
Figura 6	18
- Esquema de utilização de anticorpos secundários para evidenciação de antígenos	
Figura 7	21
- Padrão de cruzes para imunocitoquímica	
Figura 8	23
- Espectro de emissão de luz para fluocromos mais comuns	
Figura 9	30
- Gráficos de pontos mostrando tamanho celular vs granulosidade	
Figura 10	32
Figura 11	33
- Histogramas de correção de "background"	
Figura 12	34
- Evidenciação de iNOS em pacientes	
Figura 13	38
Figura 14	39

- Análise imunológica de iNOS nas linhagens leucêmicas	
Figura 15	40
Figura 16	41
Figura 17	42
Figura 18	43
- Citometria de fluxo para evidenciação de iNOS nas linhagens	
Figura 19	44
Figura 20	45
Figura 21	46
- Análise imunológica de RAS nas Linhagens	
Figura 22	49
Figuras 23 e 24.....	50
Figura 25	51
- Western Blotting para análise da fosforilação da MAPK	
Figura 26	51
- Alterações morfológicas após tratamento com NPNA	
Figura 27	54
- Localização diferenciada de RAS e iNOS no interior celular	
Figura 28	54
- Esquema de ativação do RAS e iNOS	
Figura 29	56

Sumário de tabelas

- Descrição dos dados Clínicos e laboratoriais dos indivíduos utilizados neste estudo.

Tabela 1..... 13

- Relação dos tempos de incubação e concentração dos reagentes

Tabela 2..... 15

- Sumário dos dados clínicos e expressão da iNOS por citometria de fluxo e imunocitoquímica dos pacientes com LLC, LMA e Linfoma

Tabela 3..... 37

Sumário de Gráficos

- Médias das dosagens de NO_2^- nos experimentos de indução

Gráfico 1 47

- Dosagem de NO_2^- após a utilização de aminoguanidina

Gráficos 2 e 3 48

- Dosagem indireta de NO após tratamento com NPNA

Gráficos 4 e 5 53

ABREVIATURAS

AGD	Aminoguanidina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CGMP	Guanina monofosfato cíclica
D-name	N ^G -nitro-D-Arginina metil éster
ERK	Quinase com regulação externa (external regulated kinase)
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GAP	Proteína de ativação de GTPase (GTPase activating protein)
I ¹²⁵	Isótopo radioativo de Iodo
IFN	Interferon
iNOS	Óxido nítrico sintase isoforma induzível
IRF	Fator regulador de Interferon
KDa	Kilo Dalton – Unidade de medida para pesos de proteínas
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
L-name	N ^G -nitro-L-Arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase mitógeno ativada (Mitogem activated protein kinase)
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NPNa	Nitroprussiato
O ₂ ⁻	Superóxido
ONOO ⁻	Peroxidonitrito
p21 ^{ras}	Proteína do gene RAS
PE	Ficoeritrina
PerCP	Complexo peridina – clorofila
Pi	Fósforo inorgânico
RNA _m	RNA mensageiro

RESUMO

Oncogenes são genes que afetam o crescimento e desenvolvimento celular normal. A maioria dos oncogenes se constitui de formas modificadas de genes normais, denominados de protooncogenes.

O protooncogene RAS, encontrado em diversos organismos, codifica uma proteína com atividade de ligação à Guanina trifosfato (GTP) normal, sem atividade de GTPase. O gene RAS mutante é encontrado em muitos seres humanos com cânceres do pulmão, cólon e pâncreas; o produto deste gene mutante é responsável pela divisão incontrolada de células cancerosas.

O óxido nítrico é uma importante molécula sinalizadora sintetizada em diversos tecidos humanos, por proteínas codificadas em uma família de genes da NO sintase . A produção de NOS pode ser induzida por diversas substâncias tais como, endotoxinas, citocinas, lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e por 1α -interleucina.

O NO ativa a $p21^{ras}$ em células T humanas, como pode ser observado pelo aumento da ligação GTP- $p21^{ras}$. Recentemente, um grupo de pesquisadores identificou o sítio de interação entre NO e $p21^{ras}$ que é responsável pela iniciação da transmissão do sinal.

O presente trabalho teve como objetivo analisar a interação do NO com a proteína $p21^{RAS}$ em células de linhagens leucêmicas mielóide (U937, HL60 e K562) e estudar a expressão do RAS e da iNOS em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda.

Linhagens leucêmicas foram incubadas com o lipopolissacarídeo (LPS) e interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) indutores da NO sintase. A expressão da iNOS e do RAS foi analisada através de imunocitoquímica, western blotting e citometria de fluxo. Para se confirmar o aumento da atividade do RAS foi analisada a fosforilação das MAPK p42/44. A dosagem de NO dissolvido no meio foi feita utilizando-se o reagente de Griess.

Analisando os resultados obtidos foi possível chegar às seguintes conclusões:

1. Células de leucemia mielóide aguda apresentam superexpressão de iNOS.
2. O aumento da expressão da iNOS, em pacientes com LMA, é independente da p21 RAS.
3. Em linhagens leucêmicas com mutação no N-RAS houve maior expressão da iNOS em condições basais e redução do NO após estímulo com LPS.
4. As linhagens leucêmicas K562, U937 e HL60 apresentam uma iNOS insensível à estimulação por LPS e $\text{IFN}\gamma$, nos tempos e concentrações apresentadas.
5. A linhagem K562 possui RAS susceptível a aumento da sua expressão por estímulos de LPS e LPS + $\text{IFN}\gamma$ nos tempos e concentrações apresentadas.

Palavras chaves: óxido nítrico, p21^{ras}, óxido nítrico sintase, leucemia, linhagens leucêmicas.

INTRODUÇÃO

Oncogene RAS e p21

Oncogenes são genes que afetam o crescimento e desenvolvimento celular normal. A maioria dos oncogenes se constitui de formas modificadas de genes normais, denominados de protooncogenes, que estão envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular (Thompson et al., 1991).

O protooncogene RAS, encontrado em diversos organismos, codifica uma proteína monomérica de 21 kDA chamada p21^{ras}, com atividade de ligação a Guanina Trifosfato (GTP) normal (Lehninger et al. et al., 1995).

A proteína normal, p21^{ras}, e um número de proteínas ligantes de GTP relacionadas, são conhecidas por atuarem na transmissão de sinais liberados por neurotransmissores, hormônios, fatores de crescimento e outros sinais extracelulares (Lehninger, 1995). O RAS possui duas formas: uma ativa ligada ao GTP (Guanina tri-fosfato) e outra inativa, ligada ao GDP (Guanina di-fosfato) (Figura 1). A ativação do RAS é estimulada pelo Fator de Liberação do Nucleotídeo Guanina (GNRP) e a inativação se dá pela proteína ativadora de GTPase (GAP) (Lowy et al., 1993; Lewin, 1997) (Figura 2).

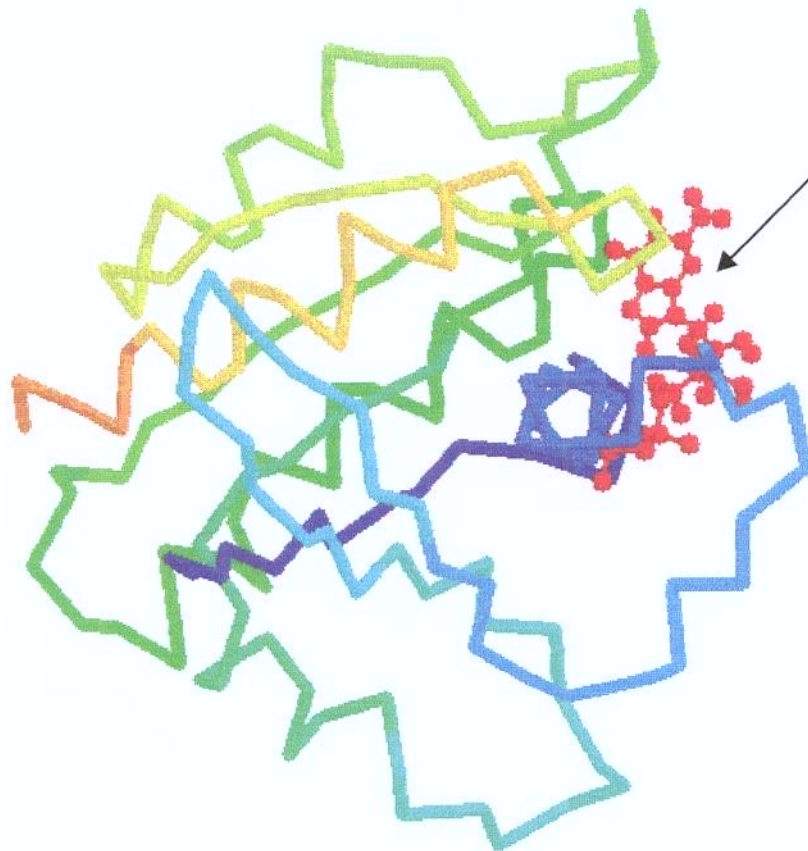


Figura 1 – Cristalografia da proteína p21^{ras} mostrando o sítio de ligação de GDP e GTP. A seta mostra a molécula de GDP. Fonte PDB.

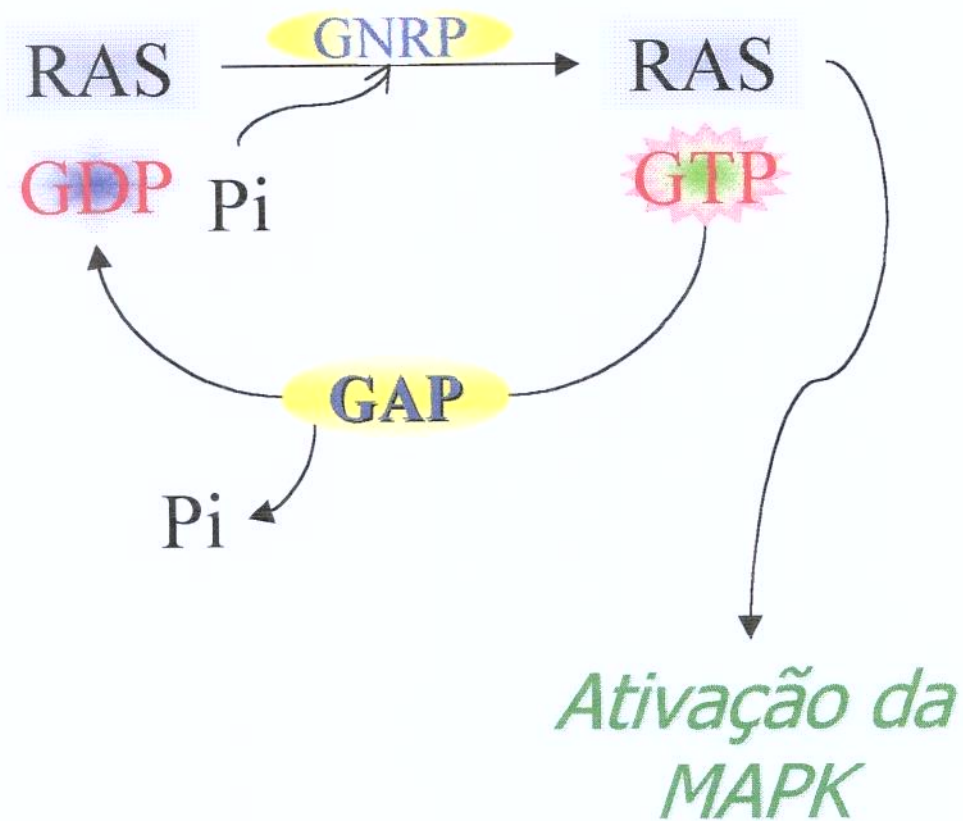


Figura 2 – Esquema da ativação do RAS, por fosforilação do GDP pelo GNRP, e desativação, por desfosforilação do GTP pela GAP, e ativação da MAP Quinase (MAPK) pelo RAS-GTP.

A cascata de ativação do RAS se inicia quando, no lado externo da membrana plasmática, fatores de crescimento se ligam a receptores de tirosina quinase (TK). Uma vez ativados, desencadeiam uma cascata de fosforilação da tirosina que resulta na formação de uma complexa conexão do receptor ao RAS, via adaptadores moleculares (Grb2 e Sos). O resultado dessa ligação é a ativação do RAS após a ligação do GTP. O RAS ativado se liga ao fator ativador do RAS (RAF) o qual fosforila o MEK (conhecida como MAPKK, ou seja, é a quinase que irá fosforilar e depois ativar a MAPK). Esta cascata de reações culmina na ativação de fatores de transcrição nucleares. Outras quinases são ativadas pelo RAS mas não pelo RAF (Indolfi et al. 1996)

Por outro lado, hormônios de crescimento se ligam a receptores na membrana que ativam as G-proteínas as quais se ligaram ao GTP e ativaram a adenilato ciclase (ac), aumentando assim a produção de cAMP. Este se liga à proteína quinase (PKC) resultando no lançamento de uma subunidade catalítica, que fosforilará o RAF impedindo assim que este se ligue corretamente ao RAS, e ainda agirá na inibição ou estimulação de fatores de crescimento intracelular (Indolfi et al., 1996) (Figura 3).

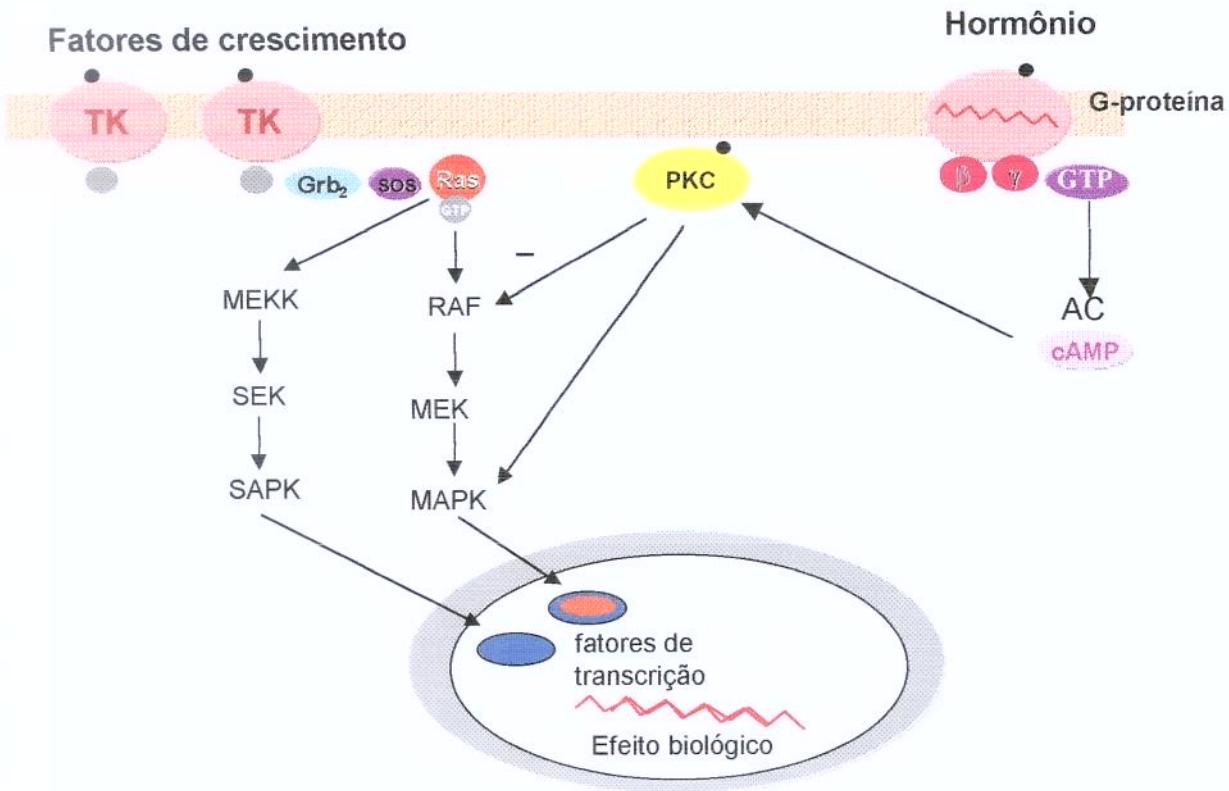


Figura 3 – Esquema da cascata de ativação do RAS, modificado de Indolfi e Cols. 1996

A ativação constitutiva do RAS pode ser causada por mutações que permitem que as formas ligadas ao GDP se tornem ativas ou que previnam a hidrólise do GTP. Muitas mutações que conferem esta transformação na atividade inibem a ação da GTPase. No proto-RAS isso não tem efeito nas proteínas que já tenham sido ativadas por mutações oncogênicas. A inabilidade de hidrolisar GTP pode causar ao RAS uma permanente ativação (Lewin, 1997), estando este processo envolvido com o desenvolvimento do tumor (Iritani et al., 1997). O gene RAS mutante é encontrado em muitos seres humanos com cânceres do pulmão, cólon e

pâncreas; o produto deste gene é responsável pela divisão incontrolada de células cancerosas (Hall et al. 1993 e Barbacid 1987).

Estudos prévios em nosso laboratório detectaram 20% de mutações no gene N-RAS em 40 pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (Melo, 1996). Por técnicas imunológicas (imunocitoquímica, imunohistoquímica e western blotting), observa-se que pode ocorrer superexpressão do RAS em muitos destes casos com mutação. Por outro lado, existe a descrição de superexpressão do RAS na ausência de mutações no N-RAS (Códon 61), K-RAS (Códon 12) e H-RAS (códon 13). Recentemente, foi observado em nosso laboratório superexpressão do RAS em pacientes com LMA e Mielodisplasias (Silva et al., 1997). Sabe-se também que algumas linhagens leucêmicas, tais como K562, HL60 e U937, expressam de maneira variada a p21^{RAS} (White^a et al., 1996; White^b et al., 1996).

Óxido Nítrico e Óxido Nítrico Sintase

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula sinalizadora sintetizada em diversos tecidos humanos por proteínas codificadas em uma família de três NO sintases (NOS) (Xie et al., 1992 e Robinson et al., 1994): endotelial constitutiva (ecNOS), neuronal (nNOS) e induzida (iNOS) (Michel et al., 1997). A ecNOS e nNOS são cálcio dependentes e permanentemente expressas em células endoteliais, grânulos, células bastão do cerebelo e neurônios do sistema nervoso central. Em contraste, a

iNOS, também chamada de NOS2, é cálcio independente, podendo produzir altas concentrações de NO após ser induzida por citocinas, Interferon γ (IFN) e Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Michel et al., 1997; Nathan et al., 1997).

A Óxido Nítrico Sintase (NOS) produz NO pela oxidação de um dos nitrogênios do grupo guanidino da arginina (ou por outros substratos guanidinos). Este processo envolve a oxidação do NADPH e a redução de Oxigênio Molecular (O_2). A transformação ocorre no sítio catalítico adjacente ao sítio de ligação para a L-arginina da molécula da NOS. Este sítio catalítico possui um grupamento heme com átomo férrico (Fe^{+3}). O ferro é reduzido por transferência de elétrons do NADPH, e se liga ao oxigênio molecular, o qual é depois cindido, liberando um átomo de oxigênio como água e o outro incorporado ao terminal guanidino da L-arginina, transformando-a em Hidroxarginina. Outras moléculas de oxigênio facilitam a oxidação da Hidroxarginina para a produção de água, óxido nítrico e L-citrulina (Southan et al., 1996) (Figura 4).

O NO é extremamente lábil sendo rapidamente convertido para nitrito e nitrato, através da ligação com água e oxigênio livre (Amano et al., 1995), e reage com o superóxido (O_2^-) para a produção de peroxidonitrito ($ONOO^-$) (Beckman et al., 1996 e Wize mann et al., 1994) . Após sua produção difunde-se a partir da sua célula de origem para as vizinhas onde se liga ao grupo heme da guanilato ciclase e ativa a enzima que produz a guanina monofosfato cíclico (cGMP) a partir da guanina Trifosfato (GTP). Esta

ligação age como um ativador intracelular da divisão celular (Ignarro et al., 1995) (Figura 4).

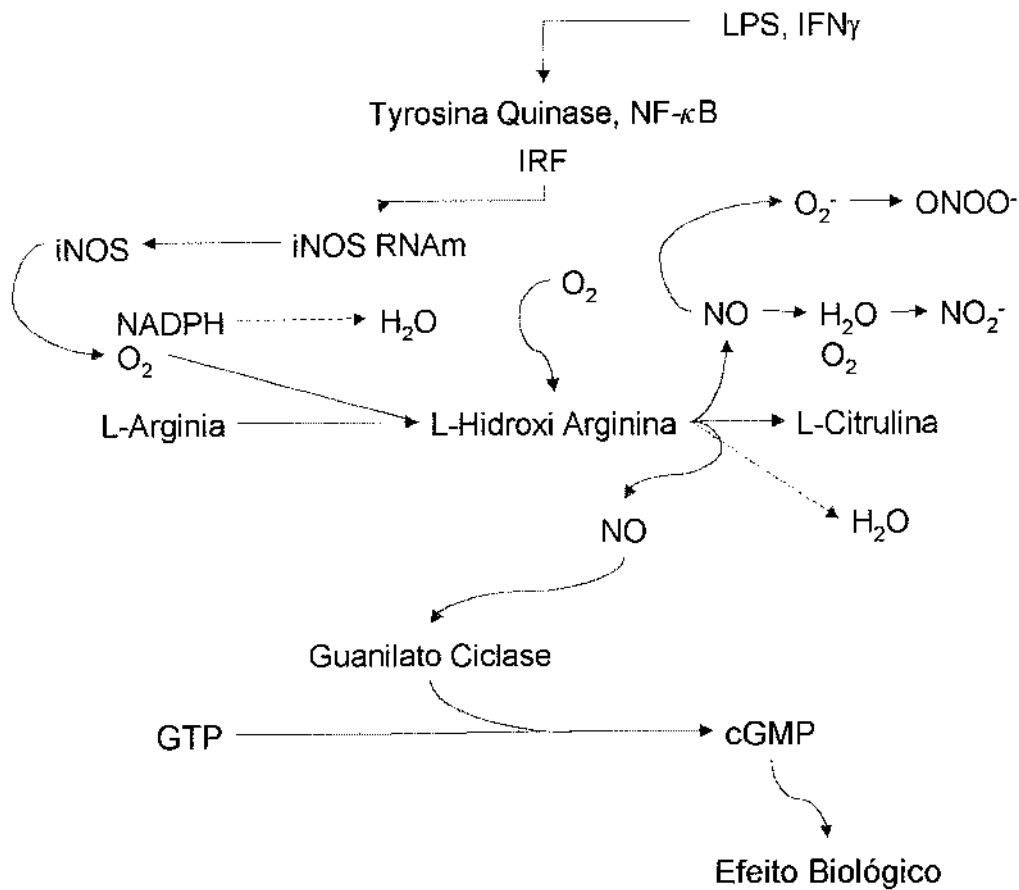


Figura 4 – Esquema da Biossíntese do Óxido Nítrico, através da indução por Lipolissacarídeo (LPS) e Interferon γ (IFN).

O NO ativa a p21^{ras} em células T humanas, como pode ser observado pelo aumento da ligação GTP-p21^{ras} (Lander et al., 1995). O efeito ativador do NO pode ser mediado por interação direta com p21^{ras} ou indiretamente através de fatores adicionais. Recentemente, foi identificado o sítio de interação entre NO e p21^{ras} que é responsável pela iniciação da transmissão do sinal, este está localizado no fragmento Cisteína 118 da molécula da p21 (Lander et al., 1996). Esta região está implicada na ligação

do nucleotídeo Guanina e é homóloga a outras proteínas G. Algumas das mutações que ativam o potencial oncogênico do RAS estão nesta região (Lewin, 1997).

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo analisar, por métodos imunológicos, a expressão da iNOS e o papel do óxido nítrico na expressão e ativação da p21^{ras} em:

- a) Linhagens celulares leucêmicas, HL60, U937 e K562.
- b) Células blásticas de pacientes com leucemia mielóide aguda.

METODOLOGIA

Casuística

Participaram deste estudo 15 pacientes portadores de Leucemia Mielóide Aguda (LMA), um paciente com Linfoma de células do manto e quatro pacientes com Leucemia Linfóide Crônica (LLC), atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da UNICAMP, e sete controles normais (estudantes do Laboratório de Biologia Molecular e Celular). Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes encontram-se representados na Tabela 1.

Cultura de células

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares leucêmicas:

- a) K 562 (Eritroleucemia)
- b) HL60 (Promielocítica)
- c) U937 (Monoblástica)

Estas foram cultivadas em suspensão com a utilização do meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), a 37°C com 0% de umidade e 5% de CO₂. Para os experimentos onde a dosagem de NO foi necessária, foi utilizado meio RPMI sem o marcador de pH vermelho de fenol.

Tabela 1 – Descrição dos dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos utilizados neste estudo

Caso	Sexo	Doença	FAB	WBC (X10³/l)	Blastos %	Hb (g/dl)
1	M	LMA	M2	13	64	7,3
2	M	LMA	M3	27,6	58	6,9
3	F	LMA	M3	29	63	6,5
4	F	LMA	M2	24,9	95	5,4
5	M	LMA	M2			
6	M	LMA	M2			
7	M	LMA	M3	16	41	7,8
8	F	LMA	M3	15	68	9,3
9	F	LLC		36	55	12,9
10	F	LLC		34	92	12,7
11	M	Linfoma		32	84	11,5
12	M	LMA	M2	26	60	10,3
13	F	LMA	M1	29	89	8,8
14	F	LMA	M3	19,8	67	10,1
15	M	LMA	M2	28	85	11,9
16	F	LMA	M4	29	95	12,3
17	M	LMA	M1	27,8	81	4,9
18	M	LMA	M5	32	80	12
19	M	LLC	L2		94	9,4
20	F	LLC	L2		78	9
21	M	Controle		6		14.8
22	M	Controle		6.5		14.7
23	M	Controle		7		13
24	F	Controle		6.5		13
25	M	Controle		7.5		14
26	F	Controle		6		13.7
27	M	Controle		6.5		13.5

Coleta de sangue periférico dos pacientes e controles

Foram coletados 10 ml de sangue periférico dos pacientes em frascos contendo heparina sódica. As células mononucleares foram separadas por Ficoll-Hipaque e montadas em lâminas para microscopia por citocentrifugação. As lâminas permaneceram congeladas a -20°C até sua utilização.

Indução da iNOS por Lipopolissacarídeo e Interferon γ

Para a padronização da indução da iNOS foram utilizados dois estimulantes: o Lipopolissacarídeo (LPS) e o Interferon γ (IFN).

A padronização de tempo de incubação e dosagem dos estimulantes foi feita incubando-se as células com diferentes concentrações dos reagentes, combinados e não combinados, em diferentes tempos (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação dos tempos de incubação e concentração dos reagentes.

Tempo	LPS	IFN
16, 24 e 48 hs	1,0 μ g/ml 10 μ g/ml 100 μ g/ml 200 μ g/ml 300 μ g/ml	-
16, 24 e 48 hs	-	100U/ml 200U/ml 300U/ml 500U/ml
16 e 48 hs	10 μ g/ml 100 μ g/ml 200 μ g/ml 300 μ g/ml	100U/ml 200U/ml 300U/ml 500U/ml
16 horas	300 μ g/ml	500U/ml

Optou-se então pelo tempo de 16 horas com incubação conjunta de LPS e IFN numa concentração de 300 μ g/ml e 500U/ml, respectivamente. Esta concentração foi escolhida por ser a maior concentração estudada e, devido ao fato de que nenhuma das linhagens apresentou aumento da expressão da iNOS em todos os testes de padronização. Outro fato que contribuiu para esta escolha foi a resposta do RAS na linhagem K562 apresentando aumento da expressão neste tempo e concentração. Os experimentos foram montados sempre na tarde do dia anterior por volta das 17:00 hs e recolhidos pela manhã seguinte por volta das 9:00 hs.

Montagem do experimento

As células foram cultivadas até atingirem confluência (aproximadamente $5,0 \times 10^5$ /ml). Após, foram centrifugadas e ajustadas para uma concentração de aproximadamente 2×10^5 células por ml de meio de cultura. O experimento foi montado em garrafas de cultura de 10 cm^3 . Nestas, foram colocados as células diluídas em 10 ml de meio de cultura acrescidos de 1,0 ml de soro bovino fetal e rotuladas como “controle”. Nas garrafas de experimento foram colocados 8,5 ml solução de meio de cultura e células, 1,0 ml de solução de LPS, $500 \mu\text{l}$ de solução de IFN (concentração final $300 \mu\text{g/ml}$ de LPS e 500U/ml de IFN $_{\gamma}$) e 1,0 ml de soro bovino fetal. As garrafas foram então colocadas em estufa de cultura com 5,0% de gás carbônico (CO_2) a 37°C por um período de 16 horas.

Após este período, os materiais foram centrifugados e seus sobrenadantes separados e congelados a -20°C para futuras dosagens da concentração de NO dissolvido. As células foram fixadas em lâminas de microscopia através de citocentrifugação para realização de imunocitoquímica ou suas proteínas totais foram extraídas para o uso em Western Blotting.

Utilização de L-NAME e D-NAME como inibidores da produção de NO

Os experimentos de inibição do NO foram realizados nos mesmos moldes da indução por LPS e IFN γ , acrescidos de 1 μ M de L- ou D-NAME (N^G-nitro-L-Arginina metil ester). O L-NAME inibi a produção de NO por ser análogo a L-Arginina (Figura 5).

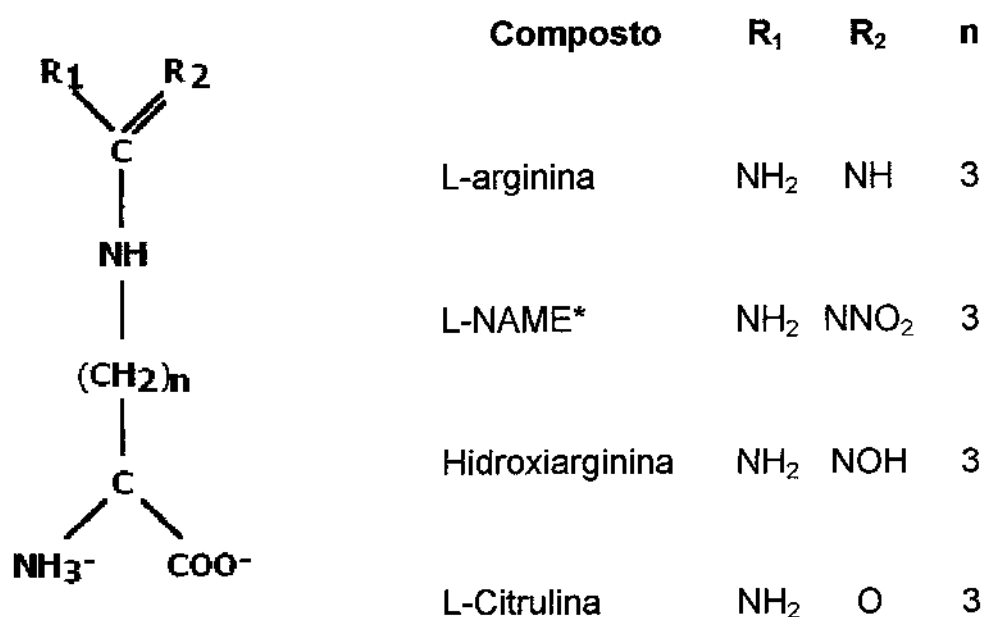


Figura 5 – Estrutura química da L-arginina, L-NAME, Hidroxiarginina e L-citrulina. * substituição da porção ácida do L-NAME (-COO⁻) por (-CO-O CH₃). Modificado de Southan, 1996.

Utilização de Aminoguanidina como inibidor da produção de iNOS

A Aminoguanidina é um análogo ao grupo guanidina da L-arginina (Figura 6), apresenta uma inibição mais específica à iNOS quando comparada ao L-NAME (Ruetten et al., 1996; Southan et al., 1996 e Wu et al., 1995)

Os experimentos com Aminoguanidina foram montados de duas maneiras:

1. 10ml de células na concentração de 2×10^5 /ml, acrescida de $250 \mu\text{M}$ de Aminoguanidina, incubação por 16 horas em estufa.
2. 10ml de células na concentração de 2×10^5 /ml acrescidas de LPS+IFN γ , montagem padrão do experimento, e $250 \mu\text{M}$ de Aminoguanidina. Incubação como descrito no item acima.

Em ambos os experimentos, foi utilizado um controle de células não acrescidas de LPS, IFN γ ou aminoguanidina.

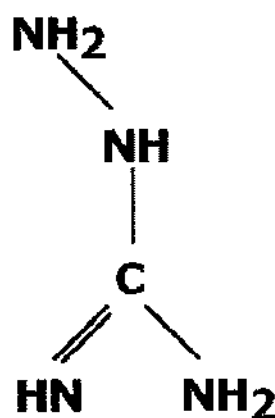


Figura 6 – Estrutura química da Aminoguanidina

Utilização de Nitroprussiato de Sódio (NPNa) como doador de NO.

Para a padronização do uso do NPNa foram primeiramente incubados em meio RPMI, sem Vermelho de Fenol, diferentes concentrações do doador numa faixa de 0,1 a 10 mM nos tempos 30 minutos e 24 horas. O NPNa era pesado, e diluído em 1 ml de meio de cultura logo antes da sua adição ao experimento.

Em uma segunda fase de experimentos, foi utilizada uma concentração de 2 mM por 5, 15 e 30 minutos. Foi escolhido o tempo de 30 minutos por ter sido neste tempo encontrada a maior concentração de NO dissolvido no meio e por ser este o tempo limite antes das células mostrarem alterações.

Dosagem indireta de NO através de Nitrito dissolvido no meio

A dosagem indireta do Óxido Nítrico foi realizada medindo-se o produto estável da reação de produção de NO, o Nitrito (NO_2) (Stuehr et al., 1987) dos sobrenadantes de células em cultura.

A medida foi feita através do reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% Naphthylethylene Diamine dihydrochloride, 2,5% H_3PO_4) (Lu et al., 1996). Para a leitura da concentração de nitrito adicionou-se uma parte do reagente de Griess e uma parte do sobrenadante. Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura em

espectrofotômetro em 570nm. Como padrão, foi utilizado o Nitrito de Sódio (NaNO_2) numa concentração que variava de 0,45 a 65 μM . Ver apêndice item 2.

Análise imunológica de RAS, iNOS e MAPK

Para a análise da expressão das proteínas foram utilizadas três técnicas distintas: Imunocitoquímica, Imunoblotting ou Western Blotting e Citometria de fluxo. Todas essas técnicas são baseadas no reconhecimento de um antígeno por um anticorpo marcado com um corante para facilitar sua visualização, chamada de técnica direta. Assim, quanto maior for a intensidade do corante visualizado maior quantidade de proteína expressa. Outro tipo de análise utilizada foi a técnica indireta, que consiste na utilização de um ou mais anticorpos que reconheçam o anticorpo primário e que possibilitem sua visualização e análise.

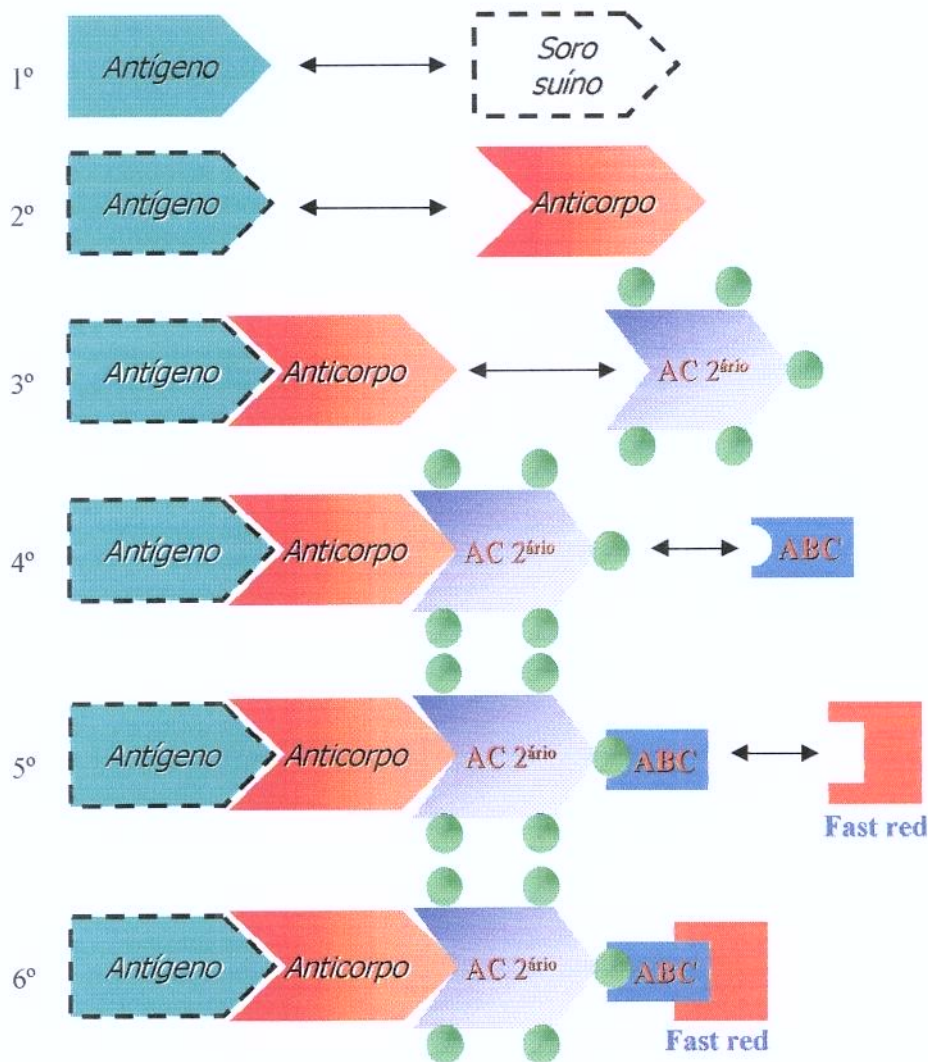


Figura 7 – Esquema mostrando a utilização de anticorpo secundário para evidenciação do antígeno. Técnica imunocitoquímica indireta, Ver apêndice 2 para técnica detalhada.

Imunocitoquímica indireta (Técnica APAAP)

A imunocitoquímica é uma técnica de identificação intracelular de proteínas específicas. Permite localizar um determinado tipo de molécula protéica, excluindo-se as outras proteínas existentes na célula. Diferencia-se da técnica direta por utilizar dois anticorpos, um primário que vai reconhecer o antígeno dentro da célula e um secundário que reconhece o

primário e facilita sua visualização permitindo assim a evidenciação de quantidades mínimas de antígenos. Na técnica APAAP o anticorpo secundário é reconhecido por um complexo biotinilado (complexo ABC), e este complexo é corado com um substrato cromógeno (Fast Red), aumentando mais a especificidade da visualização da reação (Figura 7, Apêndice item 3).

A vantagem deste tipo de metodologia é, como já citado, o reconhecimento de pequenas concentrações de antígenos no interior celular e não utiliza isótopos neste reconhecimento. Como desvantagem, esta técnica não tem resolução para indicar pequenas variações na expressão das proteínas.

Procedimento

1. Descongelar as lâminas por pelo menos 2 horas;
2. Emergir as lâminas em formalina 2% por 1 minuto;
3. Deixar secar por 15 - 20 minutos;
4. emergir em solução contendo TBS 0,05M pH7.6, TWEEN 20, SBF (Solução 1). 2 lavadas de 6 minutos;
5. Incubar em Soro Suíno Fetal 1:5 na solução 1 por 30 minutos;
6. Incubar por 3 horas com anticorpo primário V-H-RAS na diluição de 1:20 ou iNOS 1:500 TBS, 1% SBF;
7. Lavar 2 vezes com TBS por 5 min.;

8. Incubar 30 min. com anticorpo secundário multilink 1:150 PBS;
9. Lavar com TBS 2 vezes por 5 min.;
10. Incubar com complexo streptavidina-Biotina por 30 min.;
11. Lavar com TBS 2 vezes por 5 min.;
12. Incubar com solução reveladora por 30 Min.;
13. Lavar com TBS 2 vezes por 5 min.;
14. Contra corar com Hematoxilina de Meyer por 8 min.;
15. Emergir em água amoniacal 0,2% por 2 min.;
16. Secar e montar as lâminas com glicerol gelatina (Glicergel, Dako ou Glicerol-Gelatin, Sigma).

A presença e a expressão das proteínas são analisadas observando-se o aparecimento da coloração vermelha no interior celular. Dependendo da intensidade da coloração é atribuído um valor relativo expresso por cruzes “+” onde uma cruz representa uma discreta coloração avermelhada em pontos dispersos na célula, o padrão máximo era de quatro cruzes onde toda a célula estava corada homogeneamente (Figura 8).

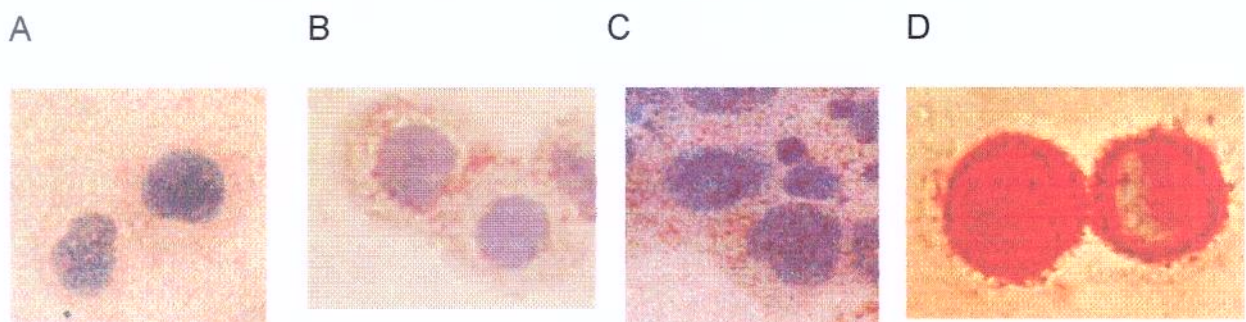


Figura 8 – Padrão de cruzes para imunocitoquímica. A – Padrão “+” – B – “++” – C – “+++” – D – “++++”.

Imunoblotting ou Western Blotting

É um imunoenensaio para a determinação de pequenas quantidades de uma proteína específica em lisados celulares. Após a extração de proteínas com um tampão próprio estas são submetidas a eletroforese em gel SDS-poliacrilamida para separação das proteínas constituintes. As bandas resultantes são transferidas para uma membrana de polímeros onde serão incubadas com anticorpos específicos. Estes anticorpos são então marcados com proteína A ligada ao I^{125} , e expostos à radioautografia para a visualização das bandas.

Ao contrário da imunocitoquímica o Western Blotting identifica pequenas variações de expressão das proteínas estudadas, e as bandas marcadas das proteínas podem ser quantificadas quanto sua densidade (Apêndice 4). Como desvantagem temos a utilização de isótopos para evidenciação das bandas. A utilização dos isótopos pode ser excluída com o uso de imunofluorescência, que é a utilização de um corante que emita luz ao ser estimulado. A grande desvantagem deste método é o custo dos Kits para imunofluorescência.

Procedimentos

Para extração das proteínas totais, 5×10^6 células foram colocadas em 200 μ l de tampão RIPA e homogeneizadas de cinco a dez vezes. Estas células foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C a 14000 rpm. O sobrenadante foi separado, e as proteínas quantificadas através do método Bradford (Kit Bio-Rad). Para a estocagem das proteínas foram separados 400 μ l de sobrenadante e acrescentados 100 μ l de tampão Laemmli + DTT. Esta solução foi fervida por 5 minutos em banho maria e congelada em freezer - 80°C.

Preparação do Gel

Para a corrida das proteínas MAPK p42/44 e RAS foram utilizados géis SDS-poliacrilamida a 15% e para iNOS a 10%.

Procedimentos para montagem do gel

- Colocar primeiramente o Gel Resolving, deixar um pouco de gel no frasco para servir de controle (Saber quando está polimerizado), completar na placa até 0,5 cm abaixo do pente;
- Após a polimerização do Resolving colocar o Gel Stacking, e em seguida encaixar o pente
- O gel pode ser preparado no dia anterior ao experimento, desde que fique em geladeira até a hora da aplicação.

Corrida e Transferência

Montar a cuba de corrida

- Colocar 800 ml de Tampão de corrida (200 ml de tampão 4x e 600 ml de água)
- Na cuba central colocar 50 μ l de β -Mercaptoetanol

Corrida

- Correr o Stacking a 40 V, quando o marcador alinhar e o azul entrar no Resolving aumentar a potência para 80 – 120 V
- A corrida no Stacking e no Resolving dura em média de 3 a 3,5 Horas.
- Parar a corrida quando o azul chegar a 1 ou 0,5 cm do final do gel.

Transferência para membrana

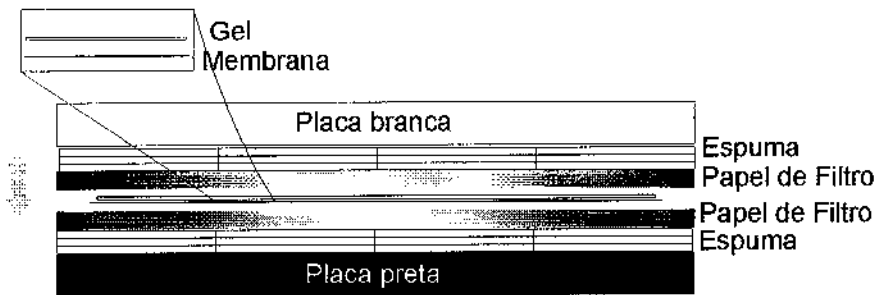
Montagem do aparato para transferência

- A partir da placa preta:

Colocar 2 espumas, logo em cima 3 papéis de filtro, a membrana de nitrocelulose (não colocar a mão na membrana) e o gel.

- A montagem deve ser feita em uma cuba contendo tampão de transferência, de modo que a membrana fique sempre molhada
- Não esquecer de colocar o gelo e trocar de 30 em 30 Min.

- Correr por 2 horas a 120 V



Esquema para montagem da cuba de transferência da Bio-Rad.

Bloqueio

- Retirar a membrana com cuidado do aparato
- Colocá-la, com a face transferida para cima, em um banho com 10 ml de solução de bloqueio por, no mínimo, 2 horas.
- Lavar 3x por 5 min. com solução basal

Incubação com anticorpo

- Acrescentar 50 μ l de anticorpo na solução para anticorpo e incubar “over night” em câmara fria com agitação constante.
- O volume de anticorpo pode variar com o tipo e fabricante
- Se houver necessidade do uso de “Bridge”, esta deve ser colocada após a incubação do anticorpo, no próprio banho em que está o anticorpo. A

incubação deve durar no mínimo 2 horas

Exposição ao lodo

- Lavar 3x por 5 min. com solução basal
- Colocar a solução de lodo e incubar por no mínimo 2 horas.
- O volume do lodo depende da sua qualidade e tempo. (por volta de 15 a 20 μ l)
- Lavar 3x por 5 min. com solução basal

Exposição em autorradiografia

- Após seca, a membrana deve ser fixada em cartolina e embrulhada em papel PVC.
- Colocar a membrana em um cassete de exposição, com filme para radiografia (A colocação deve ser feita em câmara escura, para não velar o filme)
- Expor em média por 48 horas, a -80°C .

Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo consiste no reconhecimento de proteínas *in situ*, com um anticorpo marcado com um fluocromo, comumente ficoeritrina (PE) ou fluoresceína isotiocianato (FITC). Este fluocromo ao ser estimulado por um feixe de laser emite um fóton que é captado por sensores no aparelho. O citômetro de fluxo faz análises tanto qualitativas (quanto de certo produto é expresso por célula) como quantitativas (quantas células expressam este produto), da mesma amostra (Owens et al., 1995). Neste trabalho a Citometria de fluxo foi utilizada para corroborar os resultados obtidos por Western Blotting e Imunocitoquímica.

Técnica resumida

Para a análise das células em cultura foi primordial que estas fossem cultivadas em meio sem Vermelho de fenol por um período não menor que duas semanas. Este marcador de pH emite fótons próximos ao comprimento de ondas do FITC utilizado nos anticorpos (Figura 9).

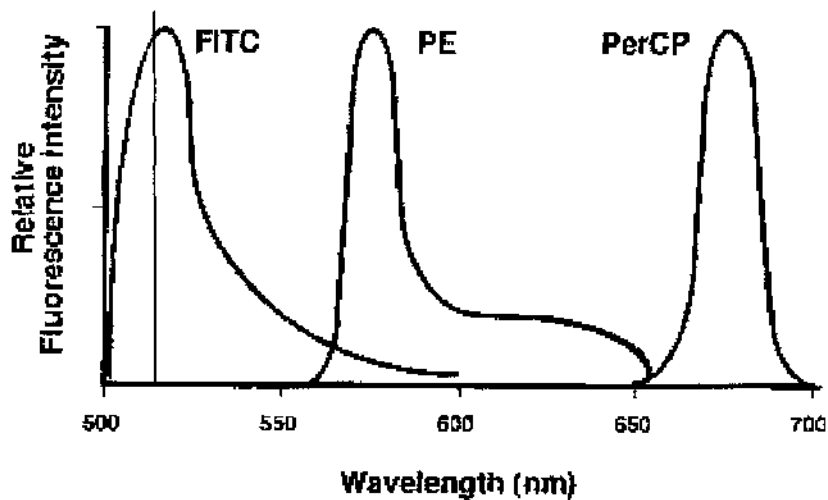


Figura 9– Espectro de emissão para três fluorocromos mais comuns, FITC, PE e PerCP. O Traço indica a emissão do vermelho de fenol (530nm).

Procedimentos

Método Direto para marcação intracitoplasmática.

1. Foram adicionados a um tubo FACS 12x75 100 μ l de sangue periférico contendo $1,0 \times 10^6$ de leucócitos, a contagem celular foi feita em hemocitômetro automático, e a diluição feita com PBS.
2. Em cada tubo foi adicionado 2ml de Solução lisante BD diluída 1:10, Vortex por 20 sec.
3. As células foram fixadas adicionando-se 2ml de solução de paraformaldeído a 4% 1:1 e vortex por 10 segundos;
4. As células foram então deixadas em repouso por 10 minutos;

5. As células foram centrifugadas por cinco minutos a 1300 RPMs em temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado;
6. O pellet foi então ressuscitado em 2ml de PBS com 0,5% de Tween 20, deixado em repouso por 2 minutos, e foi centrifugado 2 vezes por 2 min. a 1300 RPMs;
7. O pellet foi ressuscitado em 50 μ l de PBS com 0,5% de Tween 20;
8. Neste ponto foi adicionado o anticorpo monoclonal (iNOS:FITC) e incubado por 40 minutos;
9. Foi centrifugado duas vezes por 2 min. Com PBS + Tween 20;
10. Ressuscitado em 1 ml de PBS e foi feita a leitura em Citômetro de Fluxo

Método Indireto para reconhecimento de RAS

1. Foi seguida a metodologia direta até o tópico 9 da descrição anterior, e acrescentaram-se os seguintes passos
2. O pellet foi ressuscitado em 50 μ l de PBS com 0,5% de Tween 20;
3. Adicionado 10 μ l de anticorpo secundário Goat-Anti-mouse:FITC e incubou se por 20 min. à temperatura ambiente.
4. A solução então foi lavada por 3 vezes, para evitar que ficassem restos de FITC aderidos inespecificamente às células, com PBS + 0,5% de Tween 20

5. As células foram ressuspensas em 1ml de PBS e lidas no Citômetro de Fluxo.

Aquisição dos dados no Citômetro

A calibração do aparelho foi feita seguindo-se o padrão utilizado pelo laboratório de Marcadores Citoplasmáticos do Hemocentro da Unicamp.

Para a análise dos dados dos pacientes com leucemia, primeiramente foi plotado um gráfico de pontos Tamanho vs Granulosidade (FSC vs SSC). A partir deste gráfico, foram desenhadas as “gates” (Seleção dos dados) para análise. Os dados selecionados foram então plotados em um gráfico de pontos para fluorescência dos marcadores de membrana CD14PE e o CD45FITC. Assim, foi possível a análise dos dados pertinentes somente dos leucócitos, excluindo-se os monócitos (Figuras 10 A e B).

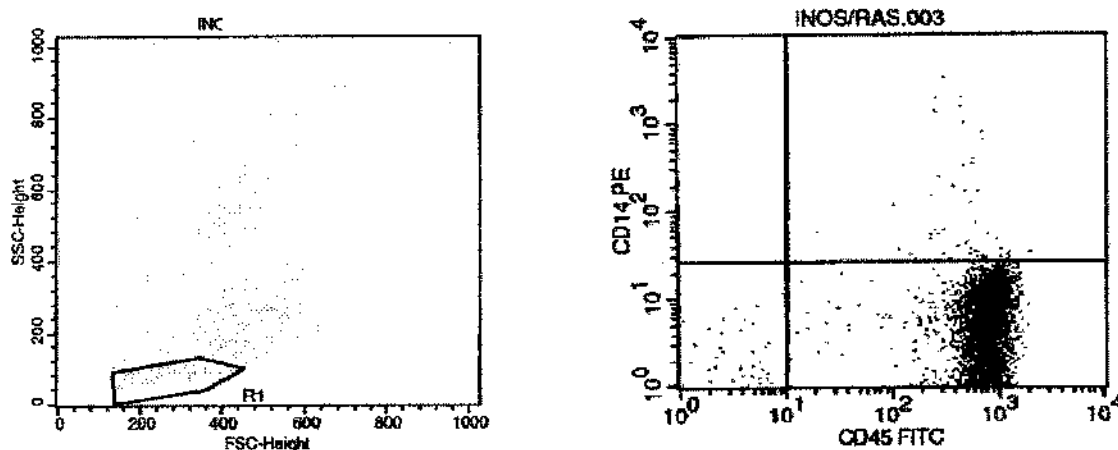


Figura 10 – A – Gráfico de pontos mostrando tamanho celular (FSC) por granulosidade (SSC); R1: área de seleção dos dados (Gate); -B: Gráfico de pontos para Fluorescência dos marcadores de membrana dos dados selecionados no Gráfico A.

Não houve a necessidade de se fazer marcadores de membrana nas linhagens pois estas eram apenas de um tipo celular. Nas linhagens foi plotado apenas um gráfico tamanho celular por granulosidade (FSC X SSC), deste gráfico eram apenas desprezadas as células que tivessem fora da população predominante (Figura 11).

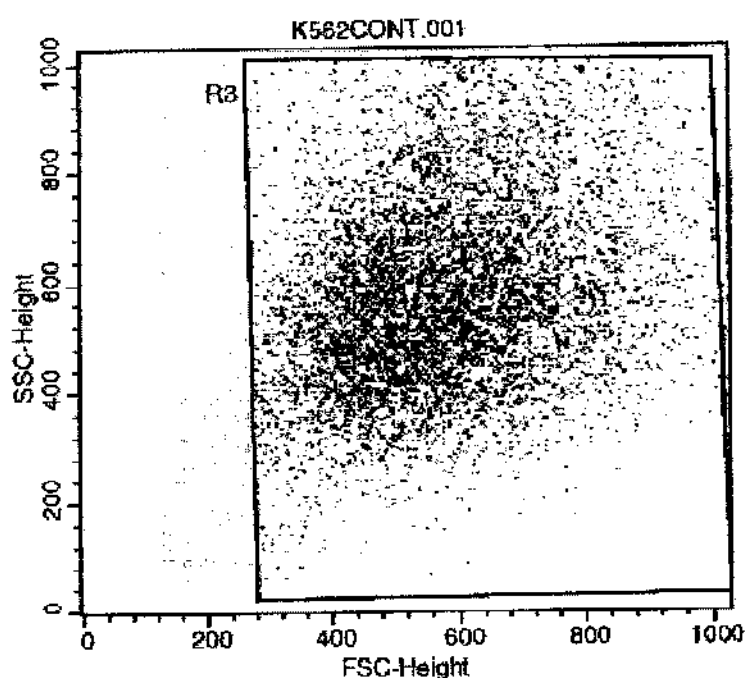


Figura 11 – Gráfico tamanho vs granulosidade mostrando a área de seleção (R3) dos dados em linhagens celulares.

Antes de se procederem às análises dos dados foi necessário um controle de isotipos, também chamada de exclusão do "Background". Para isto foi feita uma reação com o isotipo específico de cada anticorpo (IgG2A para a iNOS). Esta reação foi idêntica a descrita para os anticorpos, alterando se apenas o tipo de anticorpo utilizado.

As análises procederam primeiramente plotando-se os dados referentes ao controle de isotipos em um histograma fluorescência vs nº de células (Figura 12A). Após, os dados referentes ao anticorpos eram plotados em um outro histograma. Para sabermos qual foi a expressão das proteínas nas linhagens foi descontada a fluorescência lida no histograma de controle de isotipos da fluorescência lida nas proteínas (Figura 12B).

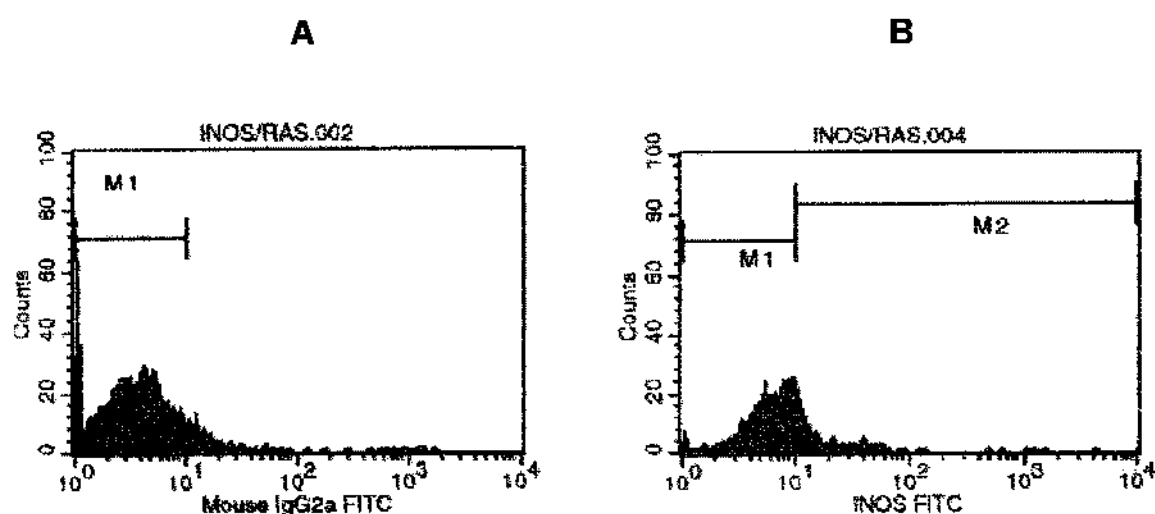


Figura 12 – Histograma do dados do anticorpo a ser estudado, a área M1, em B, representa o desconto do isotipo marcado no gráfico A; M2 representa a positividade real do anticorpo.

RESULTADOS

A. Análise imunológica da expressão da iNOS em células leucêmicas

1. PACIENTES

Foram utilizadas duas metodologias para a análise, imunocitoquímica e citometria de fluxo. Em ambas os resultados obtidos foram os mesmos. Os pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA) apresentaram um aumento acentuado na expressão da iNOS (Tabela 3 e Figura 13 e 14), enquanto que nos pacientes com Leucemia Linfóide Crônica (LLC) e Linfoma houve aumento discreto (Tabela 3)

Tabela 3 - Sumário dos dados clínicos e expressão da iNOS por citometria de fluxo e imunocitoquímica dos pacientes com LLC, LMA e linfoma

Paciente	Sexo	Doença	FAB	Blastos %	WBC (x10 ⁹ /l)	Hb (g/dl)	Expressão da iNOS	
							Citometria de fluxo	Imunocito química
1	M	LMA	M2	13	64	7,3	92%	++++
2	M	LMA	M3	27,6	58	6,9	71%	++++
3	F	LMA	M3	29	63	6,5	32%	++
4	F	LMA	M2	24,9	95	5,4	70%	++++
5	M	LMA	M2					+++
6	M	LMA	M2					++
7	M	LMA	M3	16	41	7,8	73%	++++
8	F	LMA	M3	15	68	9,3		+++
9	F	LLC		36	55	12,9		+++
10	F	LLC		34	92	12,7	31%	+ / ++
11	M	Linfoma		32	84	11,5	33%	++
12	M	LMA	M2	26	60	10,3	39%	+++
13	F	LMA	M1	29	89	8,8		++
14	F	LMA	M3	19,8	67	10,1		+++
15	M	LMA	M2	28	85	11,9		+++
16	F	LMA	M4	29	95	12,3		+++
17	M	LMA	M1	27,8	81	4,9		++
18	M	LMA	M5	32	80	12		+++
19	M	LLC	L2		94	9,4		+++
20	F	LLC	L2		78	9		++
21	M	Controle		6		14,8	26,5%	+
22	M	Controle		6,5		14,7	25%	+
23	M	Controle		7		13	32%	++
24	F	Controle		6,5		13		+
25	M	Controle		7,5		14		+
26	F	Controle		6		13,7		+
27	M	Controle		6,5		13,5		+

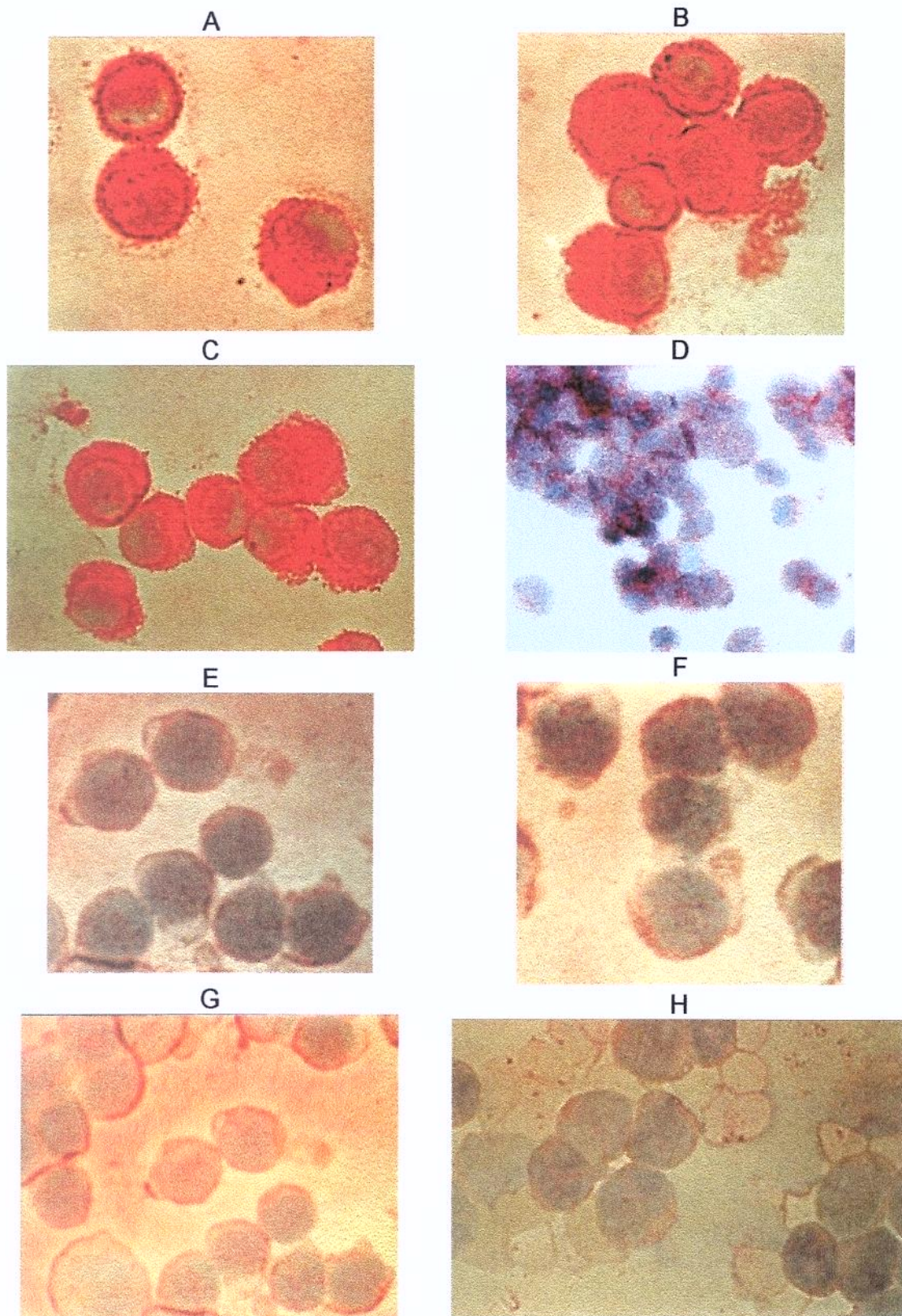


Figura 13 – Imunocitoquímica indireta mostrando a expressão da iNOS em células mononucleares de pacientes com LMA (A,B,C,D); LLC (E,F,G) e controle normal (H)

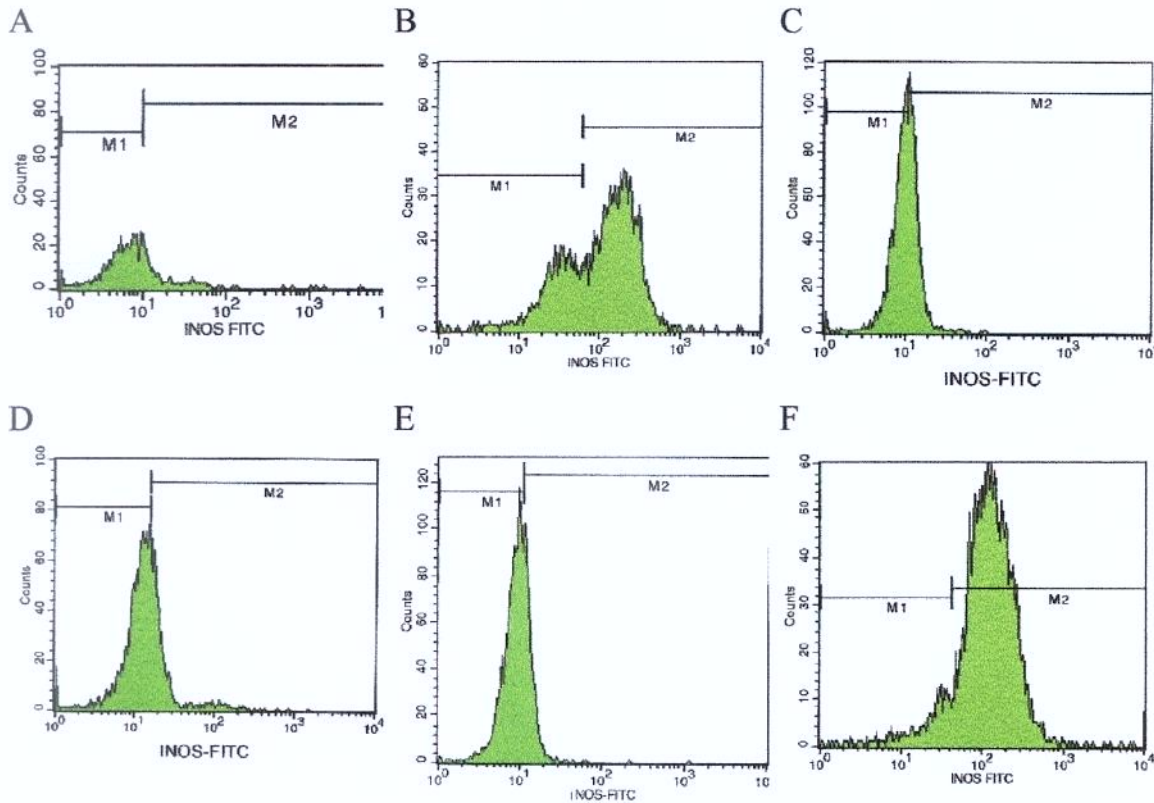


Figura 14 – Histogramas de fluorescência mostrando “background” (M1) e positividade (M2) da Citometria de Fluxo utilizando anti – iNOS:FITC em Sangue Periférico de pacientes – A – Controle – B – portador de LMA – C – portador de LLC – D – com linfoma de células do manto – E – Portador LLC – F – com LMA. Gráficos representativos de pelo menos três experimentos independentes.

2. LINHAGENS LEUCEMICAS

Na linhagem K562, a expressão da iNOS foi discreta, antes ou após a indução com LPS e/ou IFN (figura 15). Nas linhagens HL60 e U937, observamos expressão acentuada da iNOS, em condições basais ou após indução com IFN e/ou LPS (figuras 16 e 17).

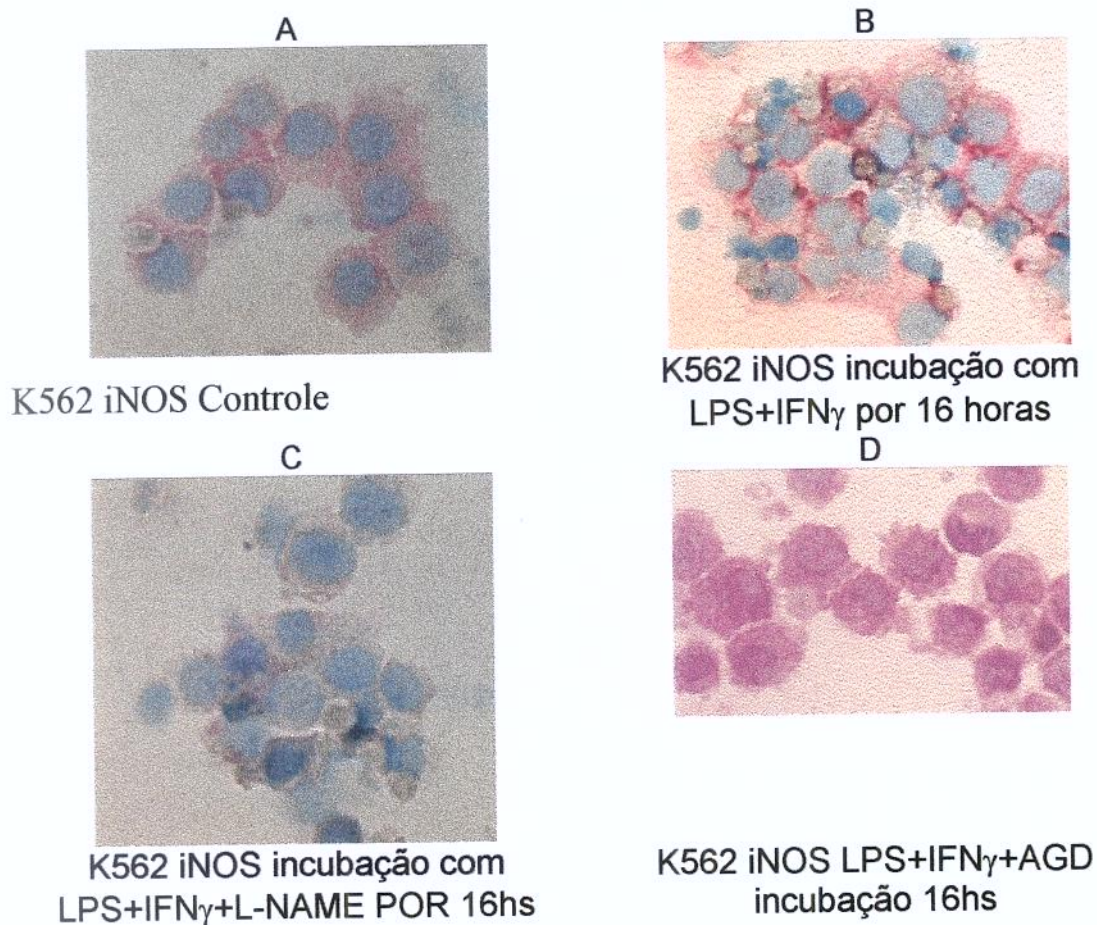
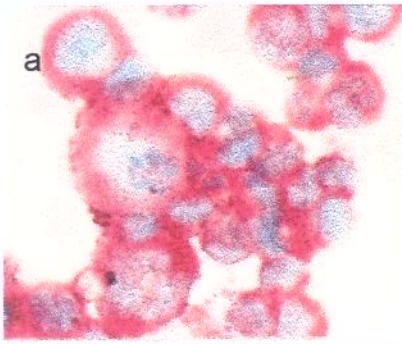
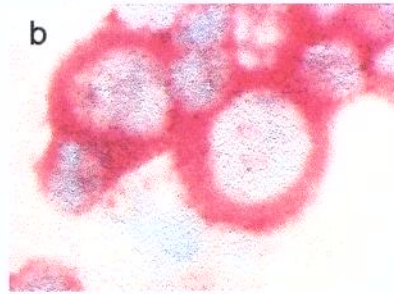


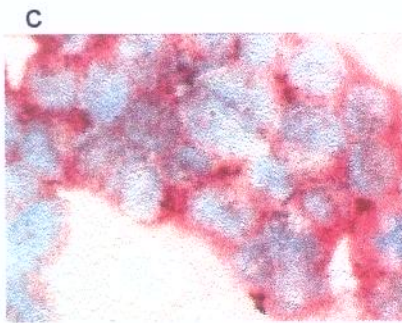
Figura 15 – Identificação por imunocitoquímica da iNOS na linhagem K562.



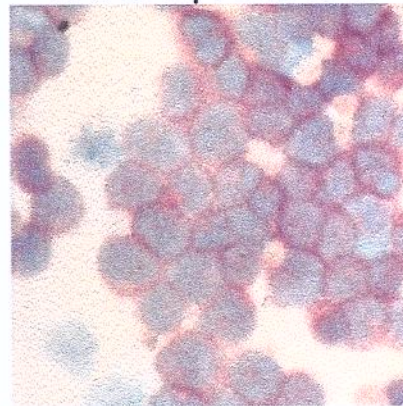
U937 iNOS controle



U937 iNOS incubação com
LPS+IFN γ POR 16hs



U937 iNOS incubação com
LPS+IFN γ +L-NAME POR 16hs



U937 iNOS incubação com
LPS+IFN γ +L-NAME POR 16hs

Figura 16 – Identificação por imunocitoquímica da iNOS na linhagem U937.

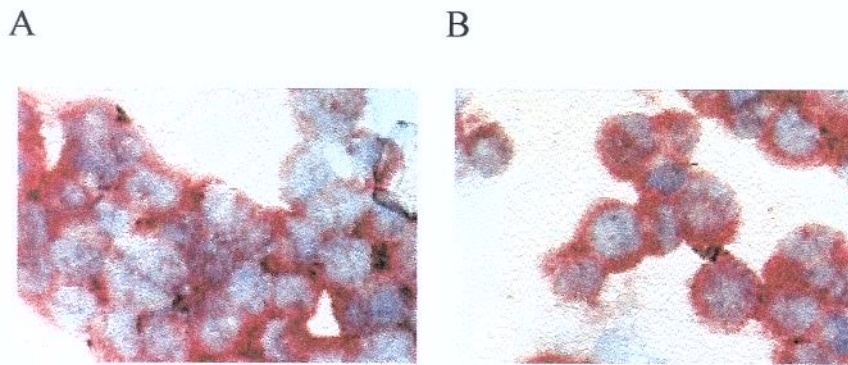


Figura 17 – Identificação por imunocitoquímica da iNOS na linhagem HL60, – A – Controle – B – após tratamento com LPS e IFN.

A. Indução da iNOS em linhagens leucêmicas com LPS e IFN

Western Blotting

Não houve aumento da expressão da iNOS após a utilização de diferentes concentrações de LPS e/ou IFN em nenhuma das linhagens estudadas (Figura 18).

Citometria de Fluxo

Como em Western Blotting não foi identificado nenhum aumento da expressão da iNOS após tratamento com LPS e IFN. A figura 19 mostra um gráfico representativo da área onde os dados foram selecionados para análises.

Na citometria de fluxo, viu-se em todos os experimentos o aparecimento de uma segunda população bastante característica (Figura 20A, marca R1). Este tipo de população é descrita como efeito de ligações

não específicas do anticorpo (Owens et al., 1995). Pelo gráfico da figura 21 pode se ver que estas células são da mesma granulosidade das células realmente positivas (vermelho), mas emitem maior fluorescência (Verde).

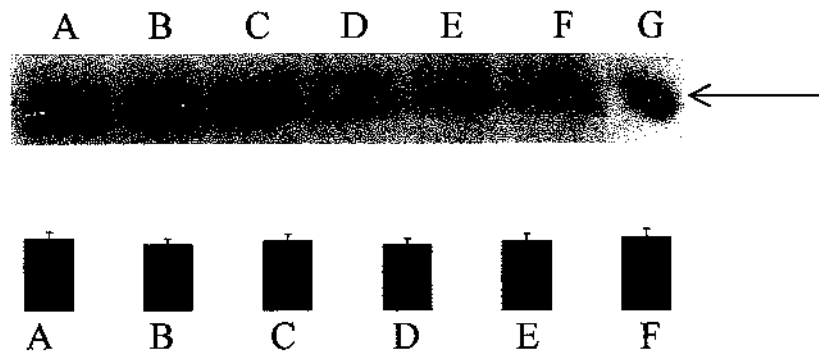


Figura 18 - WESTERN BLOTTING mostrando a expressão da iNOS em linhagem HI60, após incubação por 48 horas com A- controle (sem adição de LPS), B - 10 μ g/ml de LPS, C - 50 μ g/ml de LPS, D - 100 μ g/ml de LPS, E - 300 μ g/ml de LPS, F - 500 μ g/ml de LPS e G - Controle iNOS purificada de Macrófago de Rato (Acompanha o anticorpo anti - iNOS da Transduction Laboratories). A seta mostra a proteína iNOS com peso molecular de 130 kD. As outras linhagens repetiram o mesmo padrão de bandas. O gráfico indica a densidade relativa de cada banda.

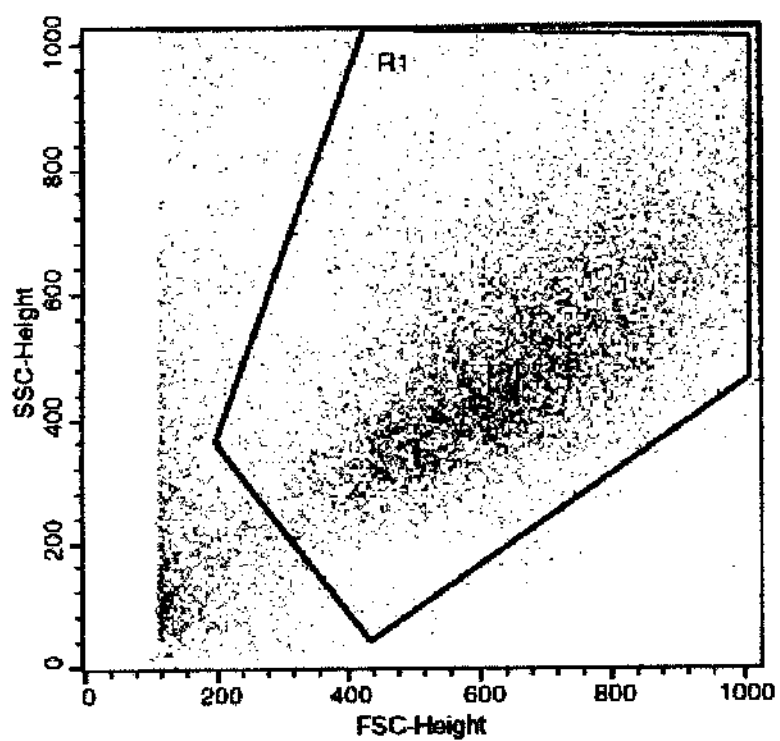


Figura 19 – Histograma tamanho vs Granulosidade para seleção dos dados em cultura de células. Todas as linhagens apresentavam padrão semelhante a este.

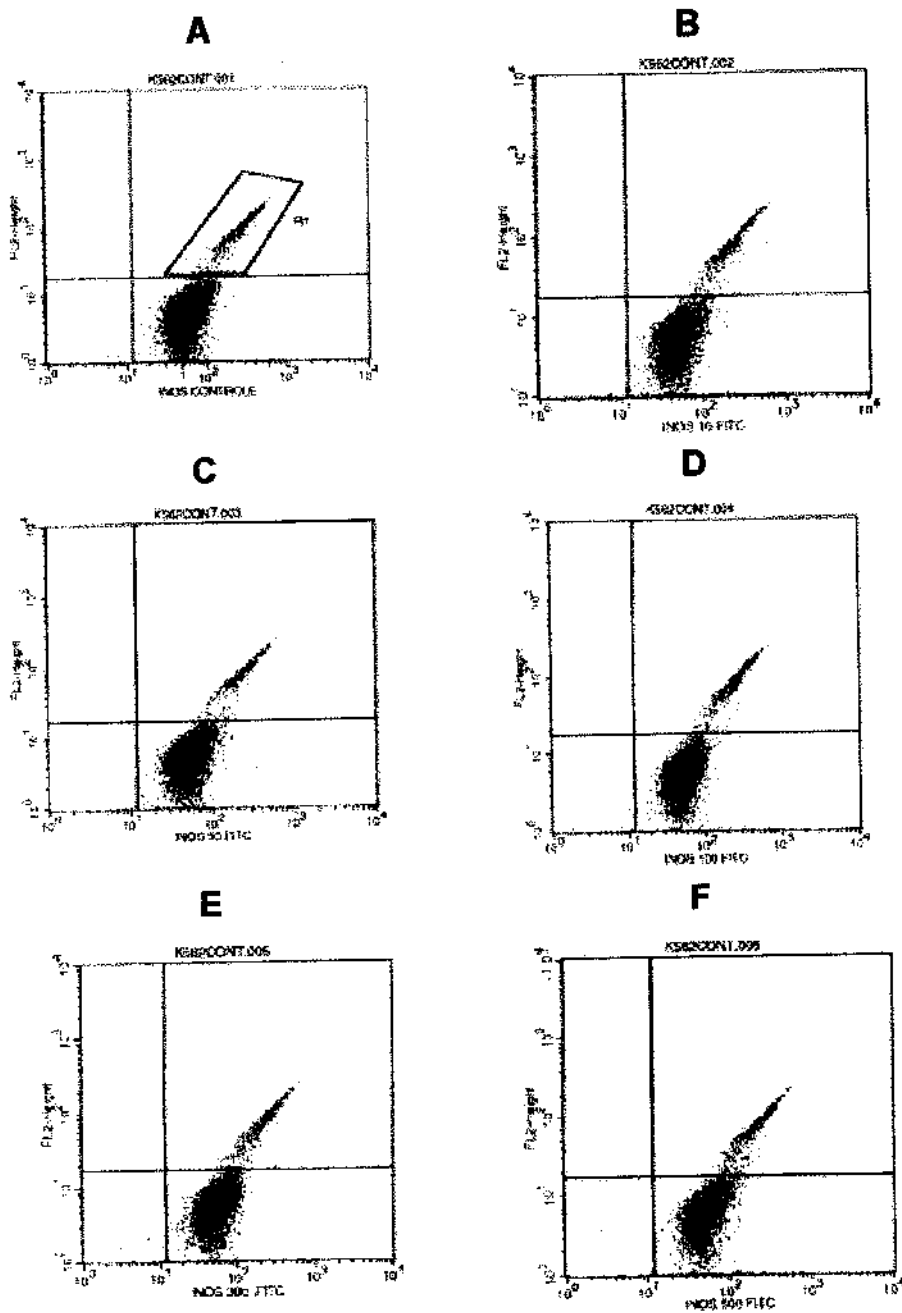


Figura 20 – Dados de Citometria de fluxo plotados em Gráfico de pontos mostrando positividade da iNOS (quadrante inferior direito) e Background (quadrante inferior esquerdo) na linhagem K562 sendo – A – Controle – B – Adição de $10\mu\text{g/ml}$ de LPS – C – $50\mu\text{g/ml}$ – D – $100\mu\text{g/ml}$ – E – $300\mu\text{g/ml}$ – F – $500\mu\text{g/ml}$. A incubação foi de 16 horas. Gráficos representativos de quatro experimentos independentes.

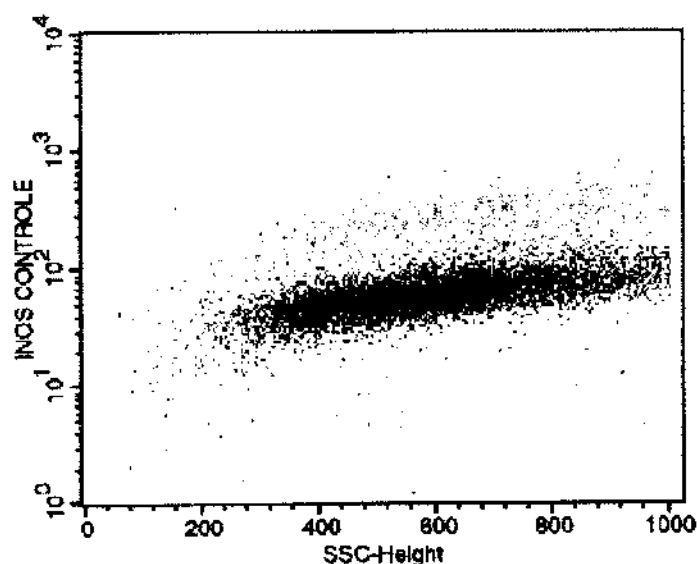


Figura 21 – Gráfico de pontos mostrando SSC (granulosidade) vs fluorescência da iNOS, da área selecionada R1 da figura 20A.

Todas as figuras de citometria de fluxo apresentadas são da linhagem K562, todas as outras linhagens apresentaram o mesmo resultado.

B. Dosagem indireta de Óxido Nítrico

A dosagem de NO_2^- mostrou aumento na produção de NO após indução, apenas na linhagem K562. As outras linhagens apresentaram um decréscimo de NO no meio (Gráfico 1).

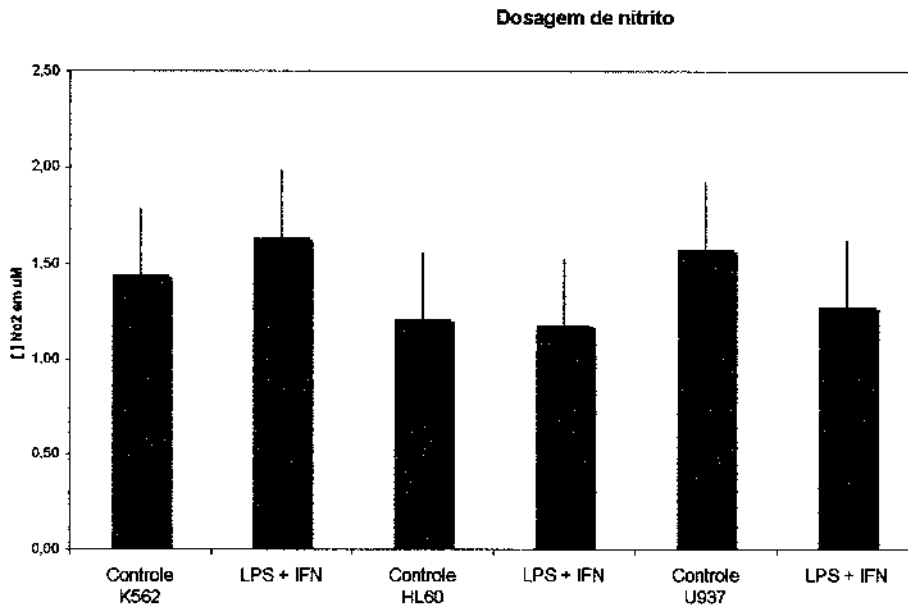


Gráfico 1 – Médias das dosagens de NO_2^- nos experimentos de indução da iNOS com LPS e IFN por 16 horas. N=10 experimentos independentes

C. Inibição da Liberação de NO:

1. L-name e D-name: Os experimentos com L-name e D-name mostraram que ambos diminuem a expressão da iNOS sugerindo um fenômeno inespecífico, não ligado a uma reação do NAME.

2. Aminoguanidina: A utilização de aminoguanidina (AGD), inibidor específico da iNOS (Wu et al., 1995), demonstrou que as linhagens tratadas com $250\mu\text{M}$ de aminoguanidina por 16 horas apresentaram uma queda da quantidade de NO_2^- medido no meio (Gráfico 2). As células cultivadas com LPS, $\text{IFN}\gamma$ e aminoguanidina ($300\mu\text{g/ml}$, 500U/ml e $250\mu\text{M}$ respectivamente) não apresentaram alterações na dosagem de NO_2^- após tratamento (Gráfico 3). A expressão da iNOS se manteve inalterada em todos os experimentos (figuras 15, 16 e 17).

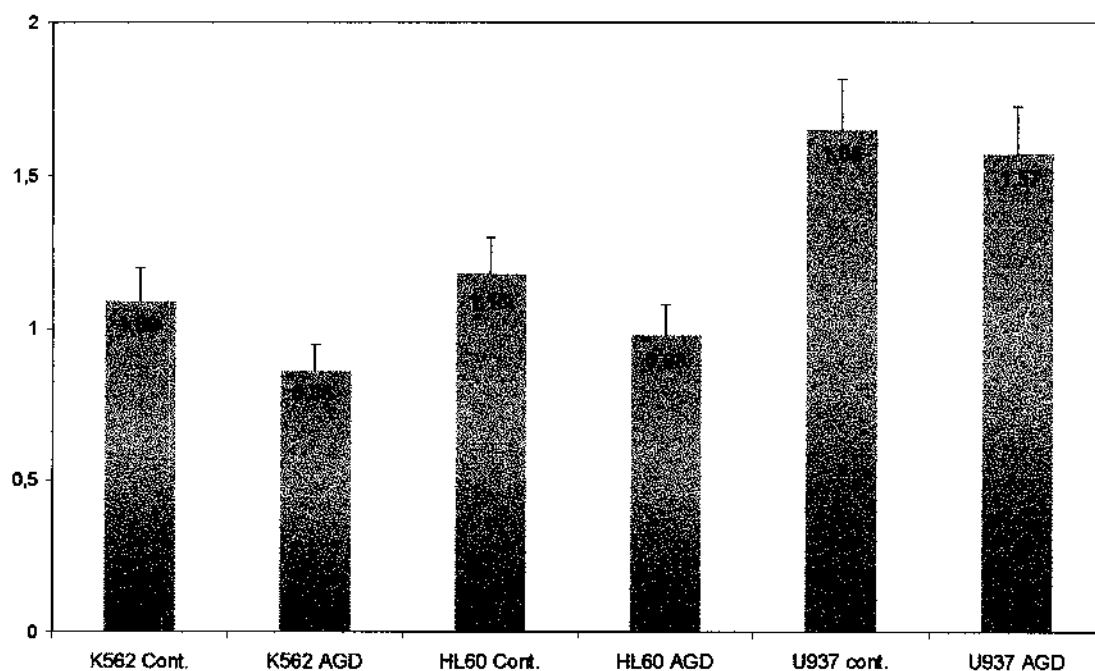


Gráfico 2 – Dosagem de NO₂⁻ medido em suspensão de meio de cultura após 16 horas de incubação com 250μM de AGD. O Gráfico representa a média e desvio padrão de oito experimentos independentes.

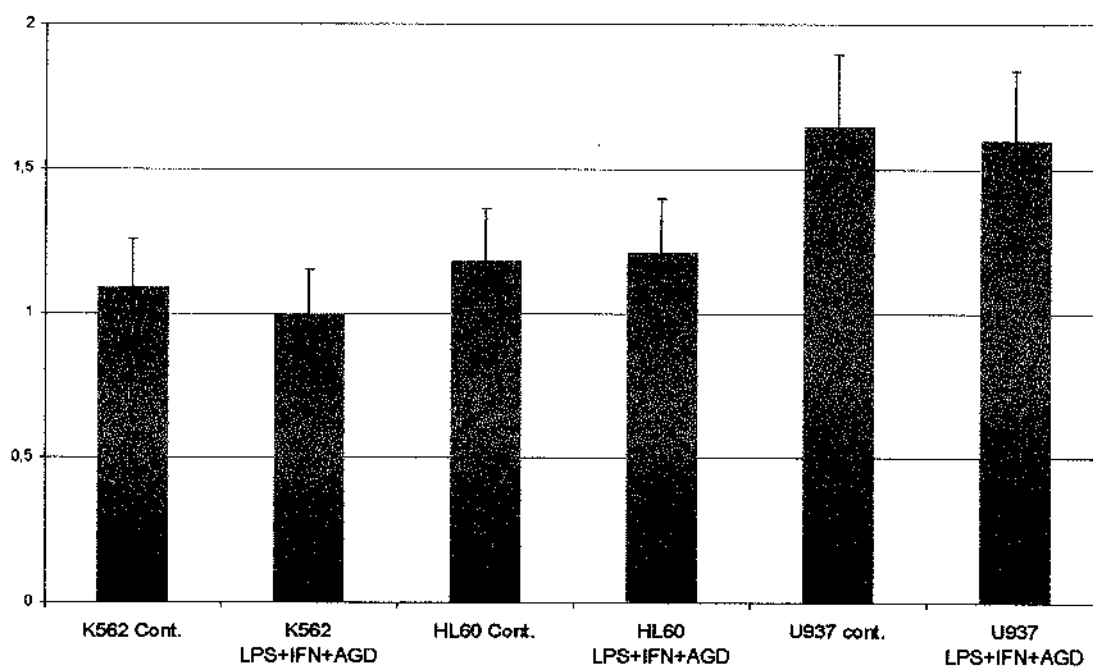


Gráfico 3 - Dosagem de NO₂⁻ medido em suspensão de meio de cultura após 16 horas de incubação com 300μg de LPS e 500U de IFN_γ por ml de meio de cultura e 250μM de AGD. O Gráfico representa a média e desvio padrão de oito experimentos independentes.

D. Papel do Oxido Nítrico na expressão e ativação de RAS

1. Análise imunológica da expressão do RAS

Após incubação da linhagem HL60 com 1,0 μ g/ml de LPS por 24 horas, observamos aumento na expressão do RAS (figura 22). Nos demais tempos e concentrações este aumento não se repetiu. A linhagem U937 não apresentou aumento do RAS em momento algum (figura 23). Já a linhagem K562 apresentou um aumento da expressão de RAS em todos os experimentos com LPS, com expressão máxima em 300 μ g LPS/ml em 16 horas (Figuras 24 e 25). A utilização da aminoguanidina não alterou a expressão da p21 RAS. O uso de L-name e D-name diminuiu a expressão da p21RAS , sugerindo ser este um fenômeno inespecífico.

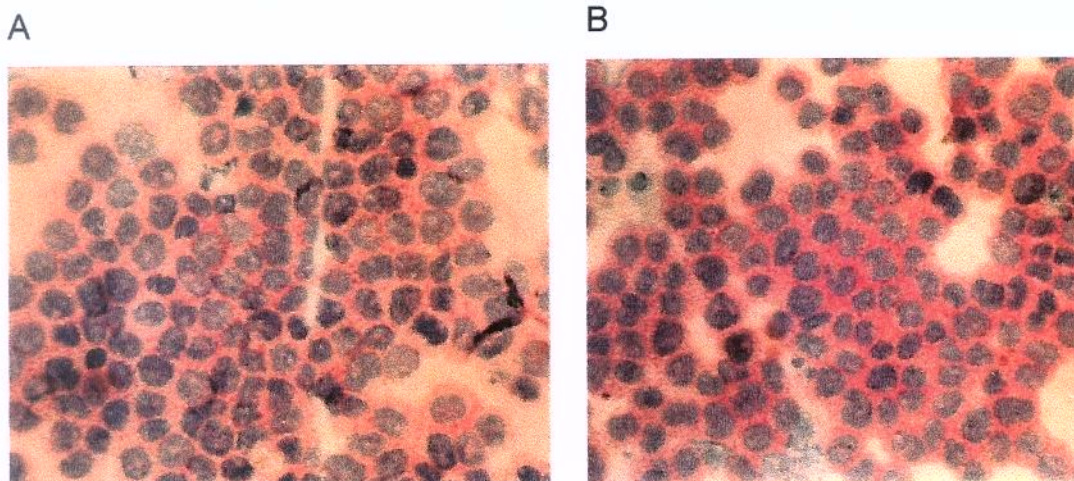
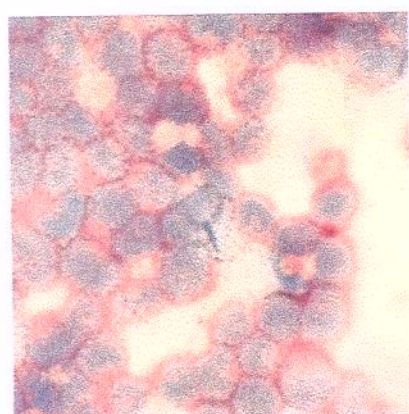


Figura 22 – Identificação imunológica de RAS em HL60 –A– Controle –B– estimulada com LPS 1,0 μ g/ml por 16 horas.



U937 RAS controle

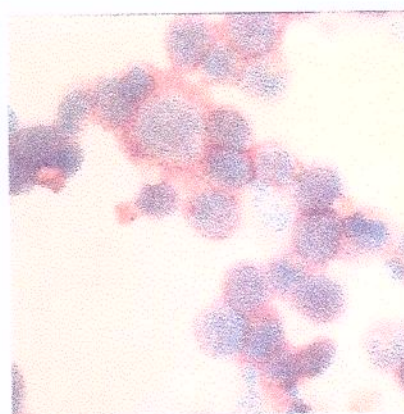
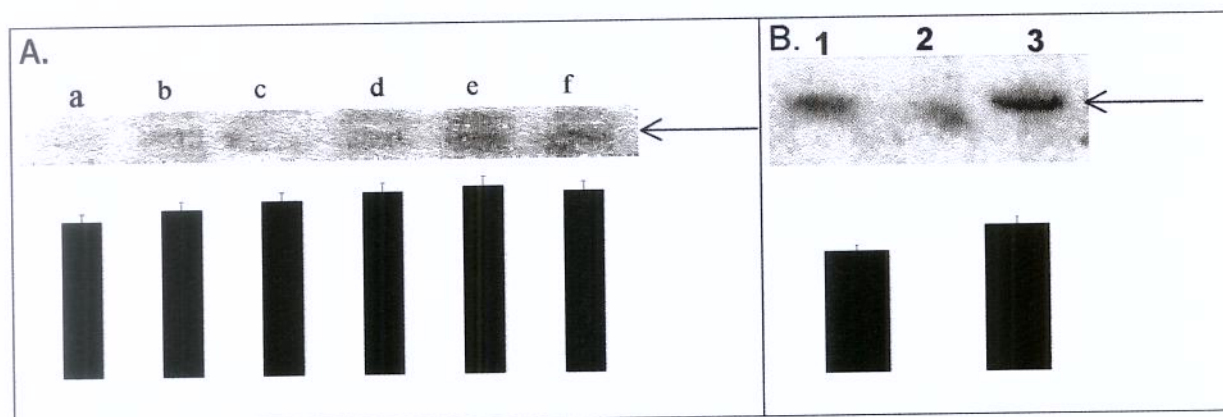
U937 RAS incubação com
LPS+IFN γ POR 16hs**Figura 23** – Identificação imunológica de RAS na linhagem U937

Figura 24 - WESTERN BLOTTING mostrando a expressão de p21RAS em K562, A – após incubação por 16 horas com 500 U/ml de IFN γ a - controle (sem adição de LPS e IFN), b – 10 μ g/ml de LPS, c - 50 μ g/ml de LPS, d - 100 μ g/ml de LPS, e - 300 μ g/ml de LPS e f - 500 μ g/ml de LPS. A seta mostra a proteína p21. O gráfico representa as densidades relativas das bandas. Desvio apresentado é de 5% (erro padrão do medidor). B – 1. Controle, 2. Marcador de peso molecular 22Kda, 3. Incubação com LPS 300 μ g/ml + IFN γ 500U/ml por 16 horas. O gráfico representa as densidades relativas das bandas. (erro padrão de 5% do medidor). Figuras representativas de 3 experimentos independentes.

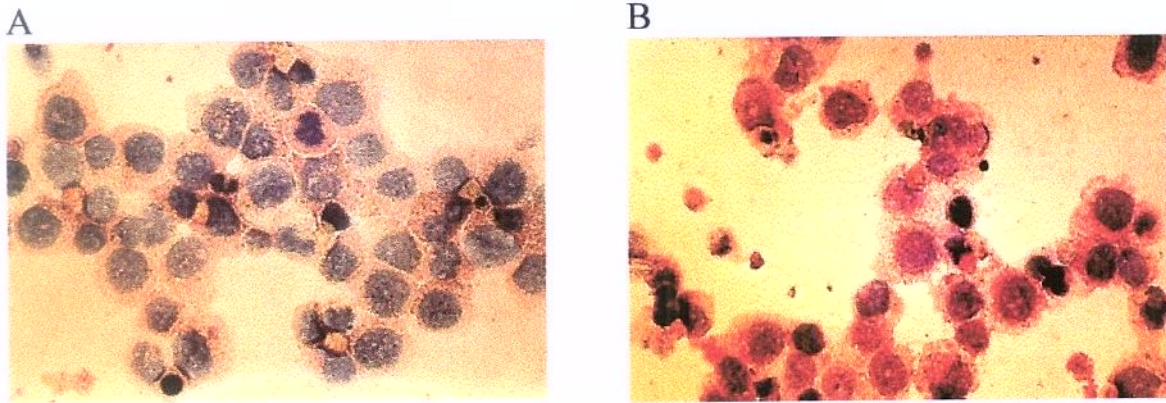


Figura 25 – Imunocitoquímica de K562, para identificação da p21 RAS, sem a adição de LPS. B Imunocitoquímica de K562, para identificação da p21 RAS, após incubação de 16 horas com LPS.

2. Ativação da p21RAS:

A p42/44MAPK esteve constitutivamente fosforilada nas linhagens. Após a indução com LPS e $IFN\gamma$ houve aumento da fosforilação somente em K562 (Figura 26.1). Não houve alteração da expressão da proteína em nenhum experimento (Figura 26.2).

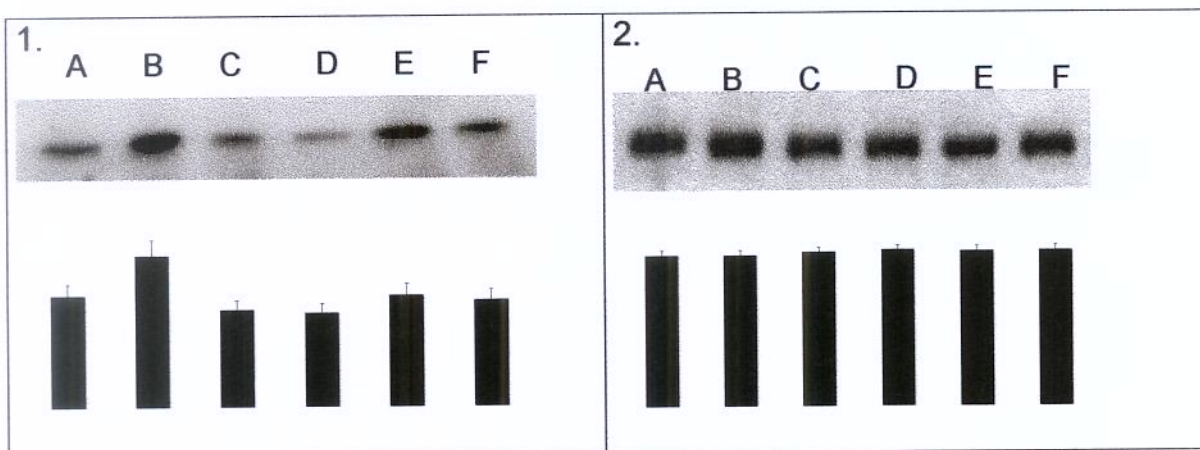


Figura 26 – Western Blotting para a identificação de p42/44 utilizando se anticorpo 1.)phospho-p42/44 (evidencia apenas proteína fosforilada) e 2.) anti-p42/44 (evidencia apenas a proteína MAPK p42/44) em – A – K562 controle – B – K562 estimulada com LPS + $IFN\gamma$ – C – U937 controle – D – U937 estimulada com LPS + $IFN\gamma$ – E – HL60 controle – F – HL60 estimulada com LPS + $IFN\gamma$. O gráfico representa as densidades relativas das bandas. Figuras representativas de três experimentos independentes.

6. Utilização de Nitroprussiato de Sódio como doador de Óxido Nítrico

Foi observado que o aumento da concentração de NO era dose dependente (Gráfico 4) e que havia um consumo ou perda deste NO com o tempo, fato já descrito na indução com LPS e IFN γ (Gráfico 5).

Entretanto, o uso de NPNa se mostrou tóxico para as células. Após 30 min de incubação com 5 mM de NPNa observaram-se alterações morfológicas significativas nas linhagens leucêmicas (Figura 27) e após 1 hora de incubação, todas as células estavam mortas

Foi observado que uma hora após adição do NPNa todas células estavam mortas, efeito já mostrado por Jun, 1997. Os experimentos com doação de NO seguiram com uma diminuição no tempo de exposição e na dose, 2,0 mM de NPNa por 30 minutos.

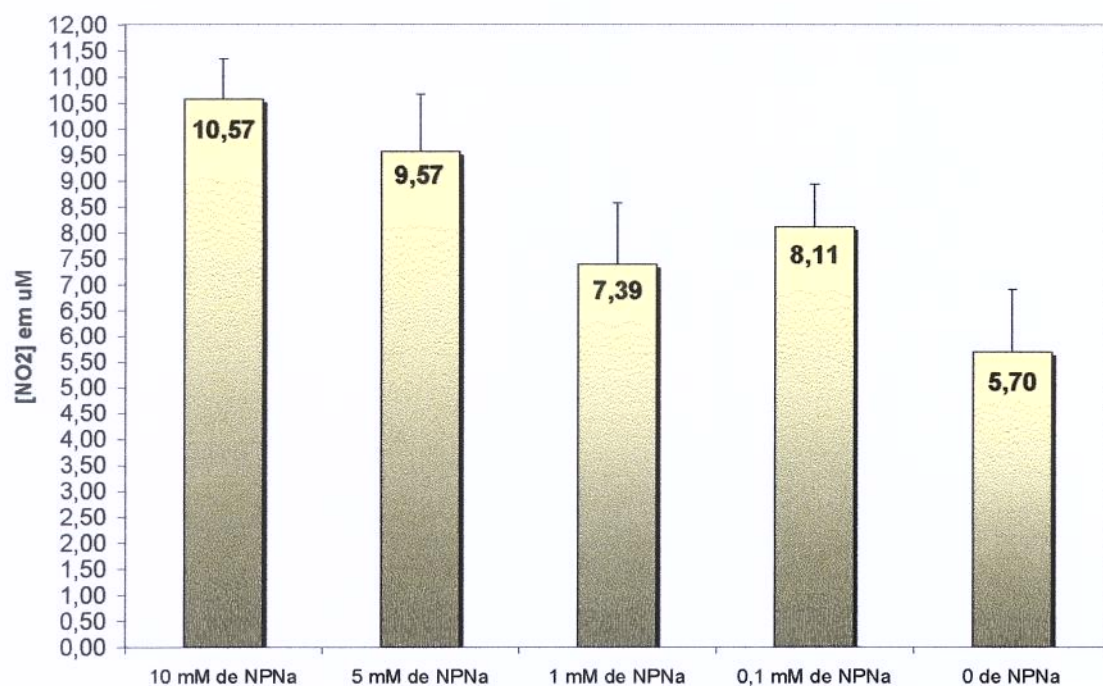


Gráfico 4 – Concentração de NO_2 medida após 30 minutos de incubação com NPNa. Liberação medida apenas com meio de cultura. N=10

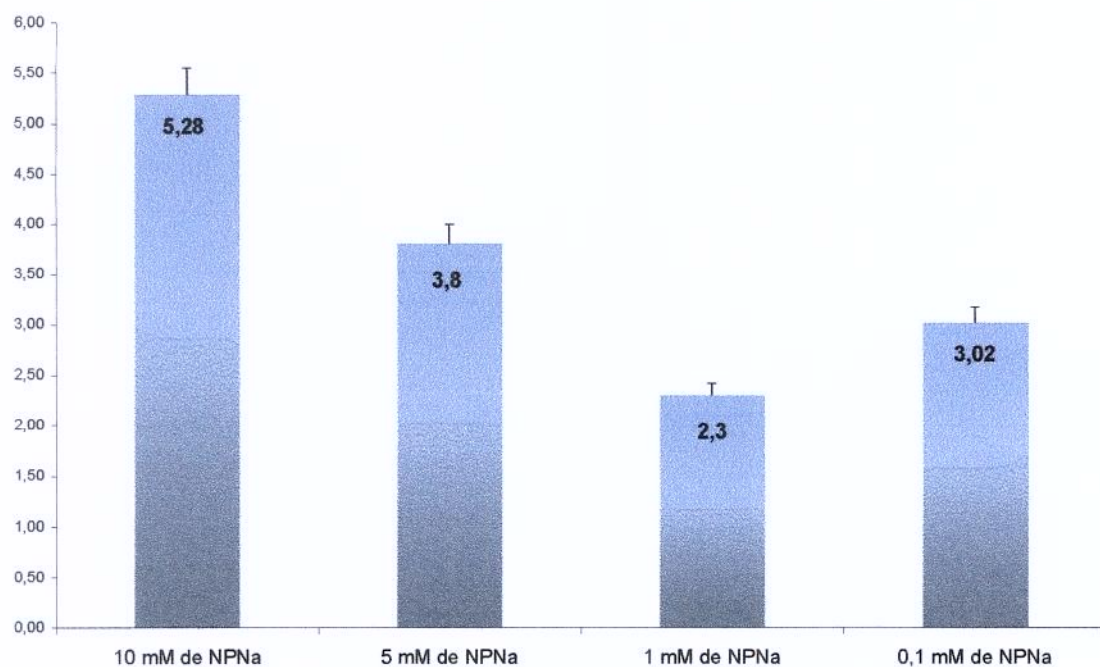


Gráfico 5 – Queda da concentração de NO após 24 horas da adição de NPNa. N=10.

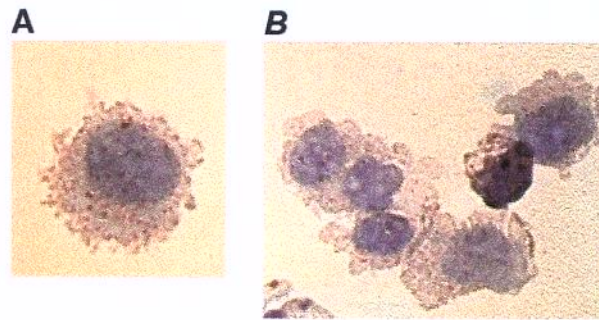


Figura 27 – Alterações morfológicas após tratamento por 30 minutos com 5mM de NPNa A – K562; B – U937.

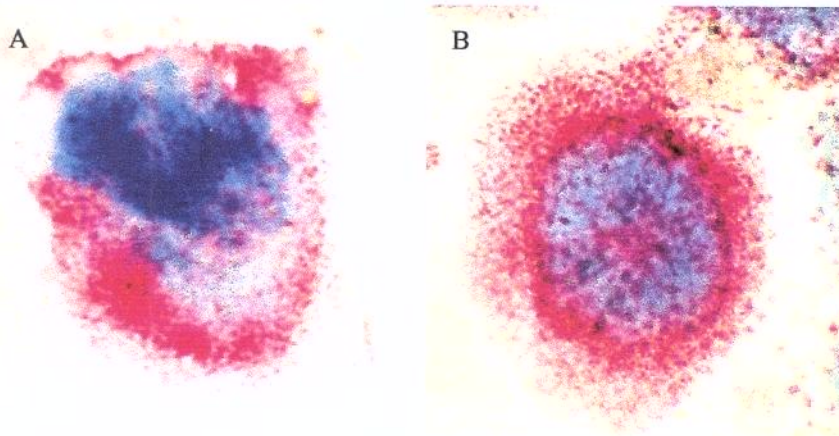


Figura 28 – imunocitoquímica demonstrando localização diferenciada de RAS e iNOS no citoplasma celular – Linhagem U937; 1- p21RAS , 2- iNOS. Note que há maior expressão do RAS ligado à membrana nuclear. Em contraposição, a iNOS está mais expressa junto à face interna da membrana citoplasmática.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que há superexpressão da iNOS em células mononucleares de pacientes com LMA, LLC e Linfoma quando comparados aos controles, assim como em linhagens HL60 e U937. Uma das possíveis causas deste achado seria a desregulação da expressão de fatores de transcrição, comumente expressos em leucemias (Nichols et al., 1992), os quais estariam atuando diretamente na transcrição da iNOS ou indiretamente, estimulando possíveis ativadores desta transcrição.

Em leucemias, diversos genes tem expressão aberrante (Papavassiliou et al., 1995). O aumento ou a ausência do produto gênico, pode resultar de deleção ou mutação que altera a quantidade, atividade ou localização de determinada proteína. Outra alteração freqüente nas anormalidades hematopoiéticas, em especial nas leucemias, é a expressão imprópria de fatores de transcrição (Nichols et al., 1992), tais como RARs (Receptores de ácido retinóico), o qual pode induzir a diferenciação da HL60, AML1 (expressos em U937) e GATA (Tenen et al., 1997 ; Orkin et al., 1992). Outro fator de transcrição importante expresso nas leucemias é o NF κ B (Baeuerle et al., 1996). Segundo Lin et al (1996) o NF κ B é o componente regulador da expressão da iNOS. Peng et al. (1995) descrevem que o NO endógeno pode inibir a ativação do NF κ B, quando em concentrações altas. A figura 29 esquematiza a possível via de ativação do RAS e iNOS dentro das leucemias estudadas.

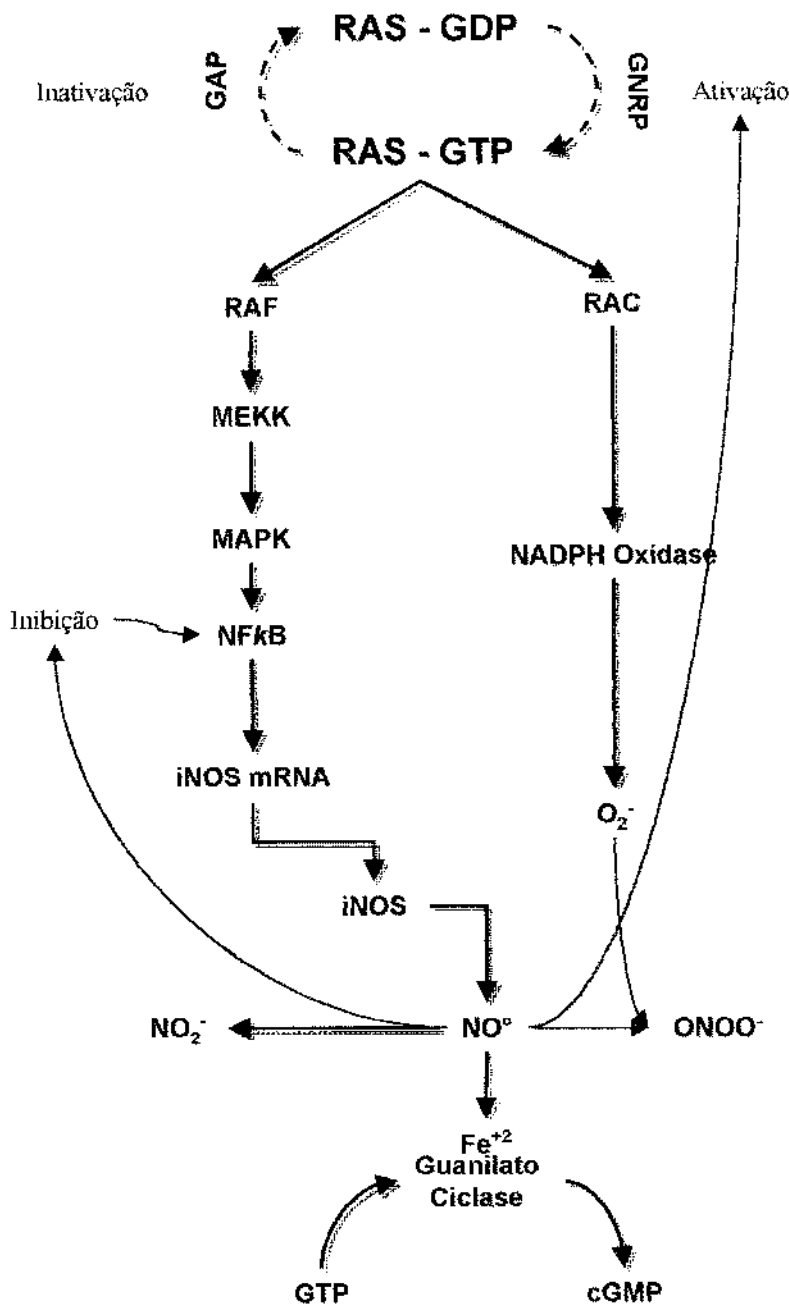


Figura 29 – Esquema de ativação do RAS e iNOS, e possível causa da queda dos níveis de NO apresentados.

Todos estes fatores estão direta ou indiretamente ligados a proteínas quinases, especialmente tirosina quinases (Lewin, 1997). A fosforilação de proteínas tirosina quinase tem um papel importante nos

processos celulares de proliferação e diferenciação. Quando ativadas e autofosforiladas, os receptores de tirosina quinase recrutam os adaptadores protéicos, os quais vão mediar as interações de troca do nucleotídeo guanina com proteínas G. Deste modo, podem levar à ativação do RAS por ligação do GTP e liberação do GDP. A ativação, influenciada por fatores de transcrição e não por mutações, do RAS e conseqüente ativação das MAPK, especialmente as ERKs, tem início na formação do Complexo SHC-Grb2-SOS (adaptadores moleculares) (Rao et al., 1996).

Proteínas RAS ativadas por mutações, muitas vezes estão associadas com alterações de aminoácidos importantes para a troca de nucleotídeo guanina, assim a ativação do RAS pode ser estimulada ou inibida. Dependendo da localização da mutação, pode ocorrer um aumento da ligação de GTP devido a uma diminuição da atividade de GTPase (Lowy et al., 1993). Os oncogenes RAS mais comuns são aqueles com uma simples mutação de ponto nos códons 12, 13 ou 61 (Barbacid et al., 1987).

As linhagens leucêmicas utilizadas neste estudo possuem características e mutações próprias. A linhagem HL60 é derivada de leucemia mieloblástica aguda (FAB-M2) com maturação (Dalton et al., 1988), e possui uma mutação no segundo nucleotídeo do códon 61 do N-RAS, ocorrendo a substituição de uma glutamina por histidina (Chen et al, 1994; Bos et al, 1984; Clutterbuck et al, 1998). Por sua vez, a

linhagem U937, derivada de leucemia monoblástica, apresenta mutações no K- e N-RAS (Gly12Asp e Glu61Lys respectivamente), além de translocação do gene MLL (11q23) (Mahgoub et al,1998) . É possível que estas mutações, com conseqüente ativação da sinalização via p21-RAS, colaborem para a alteração da expressão de iNOS (Figura 29).

Por outro lado, a linhagem K562, derivada de leucemia mielóide crônica (Lozzio et al., 1975), apresenta a translocação dos cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11)] . Esta translocação gera um oncogene híbrido conhecido como BCR-ABL e duas proteínas BCR-ABL estão presentes nesta linhagem, a p210 e p185 (Goga et al., 1995); Estas proteínas, aparentemente ativam RAS, através dos adaptadores Grb2 e Shc (Lewin, 1997). Lewin (1997) descreve a existência de mutações no H- e K-RAS em leucemias mielóides crônicas, embora não existam dados na literatura que indiquem estas mutações na linhagem K562.

Nas linhagens estudadas, as proteínas p42/44 MAPK estiveram constitutivamente fosforiladas. Estas fazem parte da família das ERKs, e são diretamente ativadas pelo RAS, via RAF (Figura 29) (Raingeaud et al., 1995). A ativação da proteína p21^{ras} por NO (Lander et al., 1995), por mutação no RAS ou pela proteína de fusão BCR/ABL, poderiam justificar a fosforilação constitutiva da p42/44 (Lewin, 1997; Cobb et al, 1995).

Após indução das linhagens leucêmicas com LPS e IFN, não houve aumento da expressão da iNOS, possivelmente por esta proteína já estar superexpressa em condições basais. O IFN γ , na presença de

RAS e MEK1 (proteína quinase), ativa ERK1/ERK2 (p42/p44) (Nishiya et al., 1997). Por outro lado, esta ativação é necessária para indução da iNOS por IL-1 β e IFN γ (Singh et al., 1996). Assim, estando estas proteínas constitutivamente ativadas, não haveria possibilidade de alteração em sua fosforilação e conseqüentemente não haveria aumento da expressão da iNOS.

Ressalta-se ainda que, após a indução, a medida indireta de Óxido Nítrico demonstrou pequena diminuição da produção de NO nas linhagens U937 e HL60. Uma possível explicação, seria a formação de peroxidonitrito (ONOO $^-$), a partir da reação do Oxido Nítrico com Superóxido (Figura 29) (Beckman et al., 1996 ; Wizemann et al., 1994). Esta ligação é facilitada pela presença de dois elétrons não emparelhados, um presente no Superóxido e um no NO (Beckman et al., 1996). A produção de Superóxido, por sua vez, pode ter sido aumentada pelo LPS, através da ativação da NADPH-oxidase (DeLeo et al., 1998). Corroborando ainda esta hipótese o fato de células peritoniais de rato, tratadas com L-arginina, precursor de NO, apresentarem uma queda na produção de Superóxido, enquanto que os níveis de O $_2^-$ voltam a crescer quando estas células são tratadas com inibidores da produção do NO (Jun et al., 1994). Assim, ao estimularmos a produção de NO através da indução da iNOS com LPS e IFN γ , estimulamos indiretamente a formação de ONOO $^-$, um produto mais estável que o NO (Beckman et al., 1996) e não detectável pela reação de Griess (Marzinzig et al., 1997).

Outra possibilidade para a formação de Superóxido nas linhagens estudadas seria através do RAS. Sabe-se que o Superóxido é produzido a partir da ativação do RAC pelo RAS (Pennisi et al., 1997), e este auxilia o RAS na transmissão de sinais para o crescimento celular (Irani et al., 1997). Estudos anteriores demonstram que fibroblastos com a isoforma H-RAS, a qual é constitutivamente ativa, produzem grandes quantidades de Superóxido (O_2^-) e que esta produção é suprimida com a expressão da isoforma negativa dominante do RAS (Irani et al., 1997). Assim, é possível que nas linhagens estudadas, os baixos níveis de NO observados decorram também da ativação do RAS, conforme já discutido, e conseqüente aumento da produção de O_2^- , somado ainda, nas linhagens U937 e HL60, à presença de RAS mutado. Assim, com mais O_2^- disponível no meio, mais NO é convertido para ONOO $^-$.

Como mostrado em todos os experimentos com K562 e HL60 na concentração de $1,0\mu\text{g/ml}$ de LPS por 24 hs houve aumento da expressão do RAS sem alterar a expressividade da iNOS. Assim, possivelmente o aumento do RAS não está ligado a um estímulo da iNOS e sim a outro mecanismo, como por exemplo a ativação de fatores de transcrição tais como o NF κ B (Pennisi et al., 1997) como discutido anteriormente. Beaty et al. (1994) mostraram que o LPS induz a fosforilação de diversas proteínas tirosina quinase, tais como Lyn e Hck. Geppert et al. (1994) mostraram que a principal via de ativação responsável pela transdução de sinais do LPS ao nível de RNAm é a via

RAS/RAF/MAPK. Uma possível explicação para o aumento do RAS seria a estimulação das proteínas tirosina após tratamento com LPS. As linhagens HL60 e U937 possivelmente já possuíam RAS ativo e por isso não apresentaram diferença na sua expressão ou simplesmente não responderam ao tratamento. Geng et al. (1994) mostraram que, em monócitos, o LPS aumenta a ativação do RAS. Buscher et al. (1995), estudando macrófagos, e Willis e Nisen (1996) estudando monócitos, demonstraram que o LPS aumenta a fosforilação das MAPK, em especial as ERKs.

Os experimentos com L-name e D-name mostraram que ambos diminuem a expressão da iNOS e do RAS, sugerindo que a queda da expressão do RAS seja um fenômeno inespecífico, não ligado a uma reação do L-NAME. A ação do L-NAME é mais expressiva sobre o isômero constitutivo da NOS (Southan et al., 1996). A aminoguanidina, inibidor mais específico da iNOS (Wu et al., 1995), não alterou a expressão da enzima. Estes resultados sugerem que os inibidores das sintases de NO atuam de forma diferenciada em linhagens leucêmicas, em contraposição ao que se observa em macrófagos ou células não-neoplásicas (Wu et al., 1995; Southan et al., 1996).

Na tentativa de minimizar esta ativação de fatores foi proposta a utilização de Doador de NO, ou seja uma substância que ao invés de estimular a formação de NO no interior celular transmite-o via extra celular. Foi escolhido o Nitroprussiato de Sódio, por ser um potente

doador de NO (Magrinat et al., 1991; Lander^a et al., 1996; Jun et al., 1997 e Camels et al., 1997), e de relativa facilidade de aquisição no mercado nacional. Este experimento mostrou-se altamente tóxico para as células, provavelmente porque o NPNa possui um grupamento ferricianeto tóxico ou devido à presença do NO em altas concentrações levando as células a um processo de apoptose (Jun et al., 1997)

No nosso estudo observamos aumento da expressão da iNOS em todos os casos de LMA, quando comparados aos controles. Comparando-se estes resultados com outros estudos realizados em nosso laboratório nestes mesmos pacientes, não foi observado correlação entre a expressão de iNOS com mutações ou expressão do p53 e da p21^{ras}, sugerindo que, na LMA, a superexpressão da iNOS é um fator independente e universal. Entretanto, Forrester et al., (1996) descreveu que o tipo selvagem de p53 regula a ativação do promotor da iNOS.

Ambas et al. (1998) observaram que há um aumento na expressão da iNOS em células de câncer de pulmão. A expressão da iNOS (NOS2) se mostrou também significativa em alguns monócitos infiltrando o carcinoma de pulmão. Como em nosso estudo, Ambas et al. não encontraram correlação da expressão da iNOS com mutações no p53 ou com o desenvolvimento de carcinomas e cânceres no pulmão.

Recentemente, vários autores tem demonstrado o envolvimento da iNOS em células tumorais. Jenkins et al. (1995) mostraram que o

aumento da iNOS e NO podem ter uma ação anti-tumoral em adenocarcinoma de cólon, pois o aumento da iNOS e da concentração do NO retardam o crescimento do tumor. A utilização de um inibidor da iNOS suprime este efeito. Entretanto, Thomsen et al. (1995) mostraram que em cânceres de mama e outros cânceres ginecológicos há uma expressão elevada de iNOS, que se correlaciona à progressão do tumor, sugerindo que o NO tem papel na biologia destes tumores. Sherman et al. (1993) isolaram e sequenciaram o cDNA da iNOS de células de adenocarcinoma, comparado-o com cDNAs de iNOS isolados do fígado, baço, musculatura lisa e macrófagos de humanos. Os autores demonstraram que, geneticamente, só há uma isoforma de iNOS humana.

Resultados da atividade da iNOS em células leucêmicas foram recentemente mostrados por Zhao et al. (1998), descrevendo a existência de uma iNOS funcional em células de B-LLC, espontaneamente ativada, com atividade antiapoptótica. Magrinat et al. (1992) mostraram que células tratadas com NO se diferenciam, e há alteração da expressão de genes, podendo ocorrer interrupção da divisão de alguns tipos celulares. Demonstraram também que quando estimulada a expressão da iNOS na medula óssea, com conseqüente aumento do NO, pode ocorrer diferenciação de células hematopoiéticas normais e malignas. Estes resultados foram confirmados por Shami et al. 1996 que observaram um aumento de até 94% do número de CFU-GM

(Unidade formadora de colônias de macrófagos granulócitos) após estímulo da iNOS.

Em conclusão, este é o primeiro estudo que demonstra a superexpressão da iNOS em células de leucemia mielóide aguda. O aumento da expressão da iNOS, observada nos pacientes com LMA, é independente da p21 RAS. Entretanto, em linhagens leucêmicas com mutação no N-RAS, houve maior expressão da iNOS em condições basais e redução do NO após estímulo com LPS. É possível que, nestas linhagens, o RAS tenha um papel modulador na expressão da iNOS. Mais estudos serão necessários para esclarecer o papel da iNOS e do NO no desenvolvimento e progressão da LMA.

Conclusões

1. Células de leucemia mielóide aguda apresentam superexpressão de iNOS.
2. O aumento da expressão da iNOS, em pacientes com LMA, é independente da p21 RAS.
3. Em linhagens leucêmicas com mutação no N-RAS houve maior expressão da iNOS em condições basais e redução do NO após estímulo com LPS.
4. As linhagens leucêmicas K562, U937 e HL60 apresentam uma iNOS insensível à estimulação por LPS e IFN γ , nos tempos e concentrações apresentadas.
5. A linhagem K562 possui RAS susceptível a aumento da sua expressão por estímulos de LPS e LPS + IFN γ nos tempos e concentrações apresentadas.

SUMMARY

Oncogenes are genes which affect the normal cellular growth and development. Most oncogenes are derived from normal genes, called protooncogenes.

The protooncogene RAS, found in various organisms, codify a guanine triphosphate linkage protein, without GTPase activity. The RAS mutant is found in some cancers as lung, breast and colon cancer.

Nitric Oxide is an important signaling molecule synthesized, in many different human tissues, by a family of three Nitric Oxide Synthases. The NOS can be induced by addition of Human recombinant Interferon (IFN γ), endotoxins, cytokins and bacterial Lipopolissacharide (LPS).

Nitric Oxide can activate the RAS in Human T cells, by increasing GTP-p21^{ras} ratio. Recently, the interaction site was found on CYS 118 on the p21 molecule.

The aim of the present study was to analyze the interaction between p21 and nitric oxide in myeloid leukemia cell lines (K562, HL60, and U937 and the expression of RAS and iNOS in human acute myeloid leukemia (AML).

The main conclusions reached by this study were that AML cells overexpress iNOS, and this is independent of p21^{ras}. Cultured cells with N-RAS mutation express higher iNOS amounts, and decrease the NO amount when stimulated with LPS plus IFN. At all incubation times and all LPS and IFN concentrations, iNOS was insensible in culture cells. The K562 RAS are

liable to increase its expression by stimulation with LPS and LPS+IFN γ treatment at all times and concentrations shown.

Keywords: Nitric Oxide, p21^{ras}, Nitric Oxide Synthase, leukemia, leukemia cell lines.

BIBLIOGRAFIA

- Amano, F. and Noda, T.: Improved detection of nitric oxide radical (NO°) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO, and Griess reagent.. *FEBS Letters*, 368: 425-428 (1995).
- Ambs, S., Bennet, W. P., Merriam, W. G, Ogunfusika, M. O., Khan, M. A., and Jones, R. T.: Vascular endothelial growth factor and Nitric Oxide Synthase expression in human lung cancer and the relation to p53. *British Journal of Cancer*, 78(2): 233-239 (1998).
- Baeuerle, P. and Baltimore, D.: NF- kB: Ten years after. *Cell*, 87: 13-20 (1996).
- Barbacid, M.: ras GENES. *Annual Review of Biochemistry*, 56: 779-827 (1987).
- Beaty, C. D., Franklin, T. L., Uehara, Y., and Wilson, C. B. : Lipopolysaccharide - induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur J Immunol*, 24: 1278-1284 (1994).
- Beckman, J. S. and Koppenol, W. H.: Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *American Journal of Physiology*, 271: c1424-c1437 (1996).
- Bos, J.L.; Verlaan-de-Vries, M.: Three different mutations in codon 61 of the Human N-RAS gene detected by synthetic oligonucleotide hybridization. *Nucleic Acids. Res.* 12(23): 9155-9163 (1984)
- Buscher, D., Hipskind, R. A., Krautwald, S., Reimann, T., and Baccari, M.: RAS-dependent and -independent pathways target the mitogen-activated protein kinase network in macrophages. *Mol Cell Biol*, 15: 466-475 (1995).
- Camels S, Hainaut P, Oshima H: Nitric Oxide induces conformational and functional modifications of wild -type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 57:3365, (1997)

- Chen, Q., Lin, T. H., Der, C. J., and Juliano, R. L.: Integrin-mediated activation of mitogen-activated protein (MAP) or extracellular signal-related kinase (MEK) and kinase is independent of RAS. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(30): 18122-18127 (1996).
- Clutterbuck, R. D., Millar, B. C., Pwoles, R. L., and Newman, A.: Inhibitory effect of simvastatin on the proliferation of human myeloid leukaemia cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Br J Haematol*, 102: 522-527 (1998).
- Cobb, M. and Goldsmith, E. J.: How MAP Kinases are regulated. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 14843-14846 (1995).
- Dalton, W. T., Ahearn, M. J., McCreddie, K. B., Freireich, E. J., Stass, S. A., and Trujillo, J. M.: HL60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood*, 71: 242-247 (1988).
- DeLeo, F. R., Rennie, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., and Weiss, J. P.: Neutrophils exposed to Bacterial Lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 455-463 (1998).
- Forrester, K.; : Nitric Oxide – Induced p53 Accumulation and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Wild Type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: 2442-2447 (1996)
- Geng, Y., Gulbins, E., Altman, A., and Lotz, M.: Monocyte deactivation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and RAS signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 8602-8606 (1994).
- Geppert, T. D., Whitehurst, C. E., Thompson, P., and Beutler, B.: Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the RAS/RAF/MEK/MAPK pathway. *Mol Med*, 1: 93-103 (1994).

- Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D. E. H., Saffran, D. C., and Witte, O. N.: Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell*, 82: 981-988 (1995).
- Hall, A.: RAS-related proteins. *Current Biology*, 5: 265-268 (1993).
- Ignarro, L.; Murad, F.: Advances in pharmacology. Nova Iorque – EUA : Academic Press, 1995 V.34: Nitric Oxide: Biochemistry, molecular biology, and therapeutic implication.
- Indolfi, C.; Chiariello, M.; Avvedimento, E. V.: Selective gene therapy for proliferative disorders: Sense and antisense. *Nature medicine*, 6 (2): 634-635 (1996).
- Irani, K, Xia, Y., Zweier, J. L., Ilot, S. J., Der, C. J., Fearon, E. R., Sundaresan, M, Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P. J.: Mitogenic Signaling Mediated by oxidants in RAS-transformed fibroblasts. *Science*, 275: 1649-1652 (1997).
- Iritani, B. M., Forbush, K. A., Farrar, M. A., and Perlmutter, R. M.: Control of B-Cell development by Ras-mediated activation of RAF. *The EMBO journal*, 16: 7019-7031 (1997).
- Jenkins, D. C., Charles, I. G., Thomsen, L. L., Moss, D. W., Holmes, L. S., Baylis, S. A., Rhodes, P., Westmore, K., Emson, P. C., and Moncada, S.: Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 4392-4396 (1995).
- Jun, C. D. Potentiation of the activity of Nitric Oxide by the protein Kinase C activator Phobol Ester in Human Myeloid Leukemic HL60 Cells: Association with enhanced fragmentation of mature genomic DNA. *Cellular Immunology* 176, 41-49. (1997).
- Jun, C. D., Lee, J. Y., Lee, B. S., Choi, B. M, Um, J. Y., Kwak, H. J., and Ji, K. Y.: Generation of nitric Oxide inhibits formation of superoxide in Macrophages during activation. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 34 (01): 1-8 (1994).

- Laemmli, U.K.: Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacterifage T4. *Nature*, 227: 680-686 (1970).
- Lander H.M.^a, Jacovina, A. T., Davis, R. J., and Tauras, J. M. Differential Activation of Mitogen – Activated Protein Kinases by Nitric Oxide – related Species. *J. Biol Chem* 271 (33), 19705-19709. (1996).
- Lander, H.M.; Ogiste, J.S.; Pearce, S.F.A.; Levi, R.; Novogrosdsky, A.: Nitric Oxide-stimulated Guanine Nucleotide Exchange on p21^{ras}. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (13): 7017-7020 (1995).
- Lander, H.M.^b :Redox Regulation of Cell Signalling. *Nature*, (381) 380-381 (1996)
- Leak, L.V.; Cadet, J.L.; Griffin, C.P.; Richardson, K.: Nitric Oxide Production by Lymphatic Endothelial Cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 217 (1): 96-105 (1995).
- Lehninger, A. L.; Nelson, B. L.; Cox, M. M.: Princípios de Bioquímica, 2^a ed. São Paulo - SP: Sarvier, 1995. 839p.
- Lewin, B.: Genes VI. New York – USA: Oxford University Press, 1997. 1260p
- Lin, A. W., Chang, C. C., and McCormick, C. C.: molecular cloning and expression of an avian macrophage nitric oxide synthase cDNA and analysis of the genomic 5' flanking region. *J.B.C*, 271 (20): 11911-11919 (1996).
- Lowy, D.R.; Willumsen, B.M.: Function and regulation of RAS. *Ann. Review Biochem.*, 62: 851 – 891 (1993)
- Lozzio, C. B. and Lozzio, B. B.: Human chronic myelogenous leukemia cell - line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45: 321-334 (1975).

- Lu, L.; Bonham, A.; Chambers, F.G.; Watkins, S.C.; Hoffamn, R.A.; Simmons, R.L.: Induction of Nitric Oxide Synthase en Mouse Dendritic Cells by Interferon γ , Endotoxin, and interaction with Allogenic T Cells. *The Journal of Immunology*, 157: 3577 – 3586 (1996).
- Lyons, C.R.; Orloff, G.J.; Cunnigham, J.M.: Molecular Cloning and Functional Expression of na Inducible Nitric Oxide Synthase from a Murine Macrophage Cell Line. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (9): 6370-6374 (1992).
- Magrinat G, Mason SN, Shami PJ, Weinberg B: Nitric Oxide Modulation of Human leukemia cell differentiation and gene expression. *Blood* 80:1880, (1992)
- Mahgoub N, Parker, R. I., Hosler, M. R., Close, P., Winick, N. J., Masterson, M., Shannon, K. M., and Felix, C. A.: RAS mutations in pediatric leukemias with MLL gene rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer*, 21: 270-275 (1997).
- Marzinzig, M., Nussler, A. K., Stadler, J, Marzinzig, E., Barthlen, W., and Nussler, N. C.: Improved methods to measure end products of Nitric Oxide in biological fluids: nitrite,nitrate, and S-nitrosothiol. *Nitric Oxide: Biology and chemistry*, 1: 177-189 (1997).
- Melo, M.B.; Lorant-Metze, I.; Lima, C.S.P.; Saad, S.T.O.; Costa, F.F.: N-RAS gene point mutations in Brazilian Acute Myelogenous Leukemia patients correlate with a poor prognosis. *Leuk. Lymph.*, 24: 309 – 317 (1996)
- Michel, T. and Feron, O.: Nitric Oxide Synthases: Wich, Where, How and Why? *Journal of Clinical investigation*, 100 (9): 2146-2152 (1997).

- Nathan, C.: inducible Nitric Oxide Synthase: What difference It make?
Journal of Clinical investigation, 100 (10): 2417-2423 (1997).
- Nichols, J. and Nimer, S. D.: Transcriptions factors, translocations and leukemia. *Blood*, 80 (12): 2953-2963 (1992).
- Nishiya, T., Uehara, T., Edamatsu, H., Kaziro, Y., Itoh, H., and Nomura, Y.: Activation of Stat1 and subsequent transcription of Inducible nitric oxide synthase gene in C6 glioma cells is independent of interferon-g-induced MAPK activation that is mediated by p21^{ras}.
FEBS Lettres, 408: 33-38 (1997).
- Orkin, S. H.: Gata - binding transcription factors in hematopoietic cells.
Blood, 80 (3): 575-581 (1992).
- Owens, M. A.; Loken, M.R.: Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. Nova Iorque – EUA. Ed. Wiley Liss. (1995) 224p.
- Papavassilou, A. G.: Transcriptions Factors. *The new england journal of Medicine*, 332 (1): 45-47 (1995).
- Peng, H. B., Libby, P., and Liao, J. K: Induction and stabilization of I κ B α by nitric oxide mediates inhibition of NF- κ B. *J.B.C*, 270 (23): 14214-14219 (1995).
- Pennisi, E.: Superoxides relay ras proteins oncogenic message.
Science, 275: 1567-1568 (1997).
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J.: Pro-inflammatory Cytokines and Environmental Stress Cause p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation by Dual Phosphorylation on Tyrosine and Threonine . *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 7420-7426 (3-31-1995).
- Rao, G. N.: Hydrogen peroxide induce complex formation SHC-GRB2-SOS with receptor tyrosine kinase and activate RAS and extracellular signal - regulated protein kinases group of mitogen - activated protein kinases. *Oncogene*, 13: 713-719 (1996).

- Robinson, L.J.; Weremowicz, S.; Morton, C.C.; Michel, T.: Isolation and Chromosomal location of the human endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS3) gene. *Genomics*, 19: 350-357 (1994).
- Ruetten, H.; Thiemermann, C.: Prevention of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase by Aminoguanidine or Aminoethyl-Isothiourea in Macrophages and in the Rat. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 225 (2): 525-530 (1996).*
- Shami, P. J. and Weinberg, B.: Differential effects of Nitric Oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cells. *Blood*, 87(3): 977-982 (1996).
- Sherman, P. A., Laubach, V. E., Reep, B. R., and Wood, E. R.: Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry*, 32: 11600-11605 (1993).
- Silva, E.S.; Lorant-Metze, I.; Bancoletto, C.; Saad, S.T.O. : Patterns of expression of RAS, p53 and MDM2 proteins in Myelodysplastic Syndromes. *Leuk. Res.*, 21(1):143 (1997)
- Singh, K., Balligand, J. L., Fischer, T. A., Smith, T. W., and Kelly, R. A.: Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells - Role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and stat1 alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 1111-1117 (2-10-1996).
- Southan GJ, Szabó C: Selective pharmacological inhibition of distinct Nitric Oxide Synthase Isoform. *Bioch.Pharmacol.* 51:383, (1996)
- Stuehr, D.J.; Cho, H.J.; Kwon, N.S.; Weise, M.F.; Nathan, C.F.: Purification and characterization of the Cytokine - induced Macrophage Nitric Oxide Synthase: AnFAD- and FMN- containing Flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 7773 - 7777 (1991)

- Tenen, D. G., Hromas, R., Licht, J. D., and Zhang, D.: Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*, 90: 489-519 (1997).
- Thompson, M. W.; McInnes, R. R.; Willard, H. F.: *Genética Médica*, 5^a ed., Rio de Janeiro - R.J.: Guanabara Koogan, 1991. 339p.
- Thomsen, L. L., Miles, D. W., Happerfield, L., Bobrow, L. G., Knowles, R. G., and Moncada, S.: Nitric Oxide Synthase activity in Human breast cancer. *British Journal of Cancer*, 72: 41- 44 (1995).
- Towbin, H.; Staehelin, J.; Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76: 4350 – 4354 (1979).
- White^a, J.R.; Gordon-Smith, E.C.; Rutherford, T.R.: Phosphothioate – capped antisense Oligonucleotides to RAS GAP inhibit cell proliferation and trigger apoptosis but fail to downregulate GAP gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 227: 118 – 124 (1996)
- White^b, J.R.; Gordon-Smith, E.C.; Rutherford, T.R.: Downregulation of RAS GAP expression in K562 cells correlates with increased differentiation to Macrophages but does not affect cell proliferation or survival. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 229: 504 – 510 (1996)
- Willis, S. A. and Nisen, P. D.: Differential induction of the mitogen-activated protein kinase pathway by bacterial lipopolysaccharide in cultured monocytes and astrocytes. *Biochem J*, 313: 519-524 (1996).
- Wizeman, T. M., Gardner, C. R., Laskin, J. D, Quinones, S., Durham, S. K., Goller, N. L., Ohnishi, T., and Laskin, D. L.: Production of Nitric Oxide and Peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. *Journal of Leukocyte Biology*, 56: 759-768 (12-1994).

- Wu CC, Chen SJ, Szabó C, Thiemeermann C, Vane JR: Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of endotoxic shock. *Br.J.Pharmacol.* 114 (8):1666, (1995)
- Xie, Q.W.; : Cloning and Characterization of inducible Nitric Oxide Synthase from Mouse Macrophage. *Science*, 256:225-228 (1992).
- Zhao, H., Dugas, N., Mathiot, C., Delmer, A., Dugas, B., Sigaux, F., and Kolb, J. P.: B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional Inducible Nitric Oxide Synthase displaying anti-apoptotic activity. *Blood*, 92(3): 1031-1043 (1998).

APÊNDICES

1. Soluções para montagem da indução da iNOS

Solução de LPS

LPS	3,0mg
Meio de cultura	1,0 ml

Esta solução pode ser armazenada à -20°C por 4 meses.

Solução de IFN

Após o acondicionamento da alíquota de IFN este foi congelado em alíquotas menores contendo 1500 unidades. Esta alíquota foi diluída em 1500 μl de meio de cultura no momento de sua utilização.

2. Preparação do reagente de Griess

Sulfanilamida	0,5g
Naphthylethylene Diamine dihydrochloride	0,05g
H_3PO_4	1,25ml
Água (completar)*	50,0 ml

*A água deve ser livre de nitrito e nitrato.

Padrão de Nitrito

Utilizar como padrão uma solução de Nitrito de Sódio (NaNO_2) nas concentrações de $0,45 \mu\text{M}$ a $65 \mu\text{M}$ dissolvido em meio de cultura sem vermelho de fenol.

3. Técnica de Imunocitoquímica indireta

3.1. Soluções

Formalina 10 %

- Formaldeído 37% - 40% ----- 100,0 ML
- Água destilada ----- 900,0 ml
- Fosfato de Sódio Monobásico ----- 4,0 mg
- Fosfato de Sódio Dibásico ----- 6,5 mg

PBS

- Água destilada ----- 1,0 L
- Cloreto de Sódio (NaCl) ----- 8,0 g
- Fosfato de Sódio Monobásico ----- 4,0 g
- Fosfato de Sódio Dibásico ----- 1,3 g
- AJUSTAR O pH PARA 7.4

SOLUÇÃO 1

- TBS 0,05 M pH 7,6 ----- 250 ml
- TWEEN 20 ----- 0,125 ml
- Soro Bovino Fetal ----- 2,5 ml

HEMATOXILINA DE MAYER

- Hematoxilina----- 1g
- Etanol absoluto ou 90%----- 10 ml
- Água destilada ----- 1000 ml
- Iodato de Sódio ----- 0,2 g
- Alúmem Amônio ou Potássio----- 50 g
- Ácido Cítrico ----- 1 g
- Hidrato de Cloral----- 50 g

Adicionar o Alúmem de amônio com agitador magnético até dissolver (+/- 1 hora). Acrescentar a Hematoxilina, depois de completamente dissolvido adicionar o Iodato de Sódio (10 min.). Adicionar o ácido Cítrico e depois o Hidrato de Cloral.

TRIS-HCL 0,5 M (SOLUÇÃO ESTOQUE)

- Trishidroximetilaminometano----- 30,3 g
- Água destilada ----- 450 ml
- Ajustar p/ pH 7,6 com HCL concentrado
- Ajustar volume, em balão volumétrico, para 500 ml

Conservar à 4°C.

TBS 0,05M COM 1% DE SORO BOVINO FETAL (Solução de Trabalho)

- Tris-HCl 0,5M----- 50 ml
- Soro Fisiológico (Cloreto de Sódio 0,9%)----- 450 ml
- Soro Bovino Fetal ----- 5 ml
- Ajustar o pH para 7,6.

IMPORTANTE ⇒ CHECAR ANTES DE USAR SE O pH ESTÁ EM 7,6

TAMPÃO TRIS 0,1M pH 8,2

- Trishidroximetilaminometano----- 1,21 g
- Água destilada ----- 80 ml

Ajustar o pH para 8,2 com HCL 1 N (+/- 4,8 ML). Completar para 100 ML com água destilada.

* PODE SER ESTOCADA POR 1 MÉS À 4°C.

TAMPÃO NAFTOL-TRIS

- Naftol AS MX Fosfato ----- 2 mg
- N-N dimetilformamida ----- 0,2 ml
- Tampão TRIS-HCl 0,1M pH 8,2 ----- 9,8 ml

SUBSTRATO FAST RED (SOLUÇÃO REVELADORA)

- Fast Red ----- 10 mg
- Levamisole ----- 2,4 mg
- Tampão naftol-tris ----- 10 ml

GELÉIA DE GLICEROL OU GLICEROL GELATINA

- Gelatina ----- 5 g
- Água destilada ----- 65 ml
- Glicerol ----- 35 ml
- Cresol ----- 0,25 ml ou
- Timerosal-merthiolate ----- 10 mg

Dissolver a gelatina em 25 ml de água destilada por 1 hora em T.A.. Cobrir e colocar em estufa à 59°C, agitando ocasionalmente e até que a gelatina esteja dissolvida. Misturar o glicerol com 40 ML de água destilada e cresol. COLOCAR EM ESTUFA 59°C.

Quando toda a gelatina estiver dissolvida, misturar os dois líquidos. Se necessário filtrar com musselina na estufa e colocar em frascos de tamanhos convenientes (5ML com tampa) que permitam o aquecimento de 55° a 60°C antes do uso.

Também foi utilizado gelatina-glicerol comercial.

4. Técnica de Western Blotting

Soluções

TAMPÃO RIPA

Deoxicolato de Sódio	1,0 g
NaCl 5M.....	3,0 ml
EDTA 0,5M	200 µl
Triton x-100	1,0 ml
Tris 1M.....	5,0 ml
SDS 10%.....	1,0 ml
Água deionizada (Completar).....	100 ml
Aprotinina*	1,0 %
PMSF*	1mM
Ortovanadato de Sódio*	1mM

*Acrescentar na hora do uso

TAMPÃO LAEMMLI

Azul de Bromofenol	2,0 ml
Fosfato de Sódio	1,0 ml
Glicerol	10 ml
SDS	2,0 g
Água deionizada(completar)	20 ml
DTT*(para cada 100µl).....	0,015g

*Acrescentar somente na hora do uso

GEIS DE POLIACRILAMIDA

Tampão para gel de resolução

EDTA 200mM.....	40 ml
SDS 10%.....	40 ml
Trisma base.....	181,6 g
Água deionizada (completar)	2000ml
Ajustar o pH para 8,9 com HCl	

Tampão para gel de Stacking

EDTA 200mM.....	20 ml
SDS 10%.....	20 ml
Trisma base.....	12,1 g
Água deionizada (Completar).....	1000ml
Ajustar o pH para 6,7 com H ₃ PO ₄	

Imunoblotting para evidênciação do RAS e MAPK

Gel 10% (2 geis de 2,0 mm)

	Resolving	Stacking
Água deionizada	1,87 ml	4,2 ml
Glicerol	1,8 ml	Xxxxx
Tampão	9,0 ml	5,6 ml
Acrilamida 40%	4,25 ml	1,0 ml
Temed	13,2 µl	8,5 µl
APS 10%	213 µl	200µl

Imunoblotting para evidênciação da iNOS

Gel 15% (1 gel de 2,0 mm)

	Resolving	Stacking
Água deionizada	Xxxxx	4,2 ml
Glicerol	1,8ml	Xxxxx
Tampão	9,0 ml	5,6 ml
Acrilamida 40%	6,3 ml	1,0 ml
Temed	20 µl	8,5 µl
APS 10%	300 µl	200µl

TAMPÃO DE CORRIDA 4X CONCENTRADO

Trisma base.....	48,45 g
Glicina.....	228 g
EDTA.....	5,35 g
SDS.....	8,0 g
Água deionizada (completar).....	2000ml

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA

Trisma base.....	6,05 g
Glicina.....	28,82 g
SDS.....	0,4 g
Metanol.....	400 ml
Água deionizada (completar).....	2000ml

SOLUÇÃO BASAL

Trisma base 1M.....	10 ml
NaCl 5M.....	30 ml
Tween 20.....	500 µl
Água deionizada (completar).....	1000ml

PBS

NaCl.....	8,0 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ PO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Água deionizada (completar)	1000ml
Ajustar pH para 7,2	

SOLUÇÕES PARA MEMBRANA**SOLUÇÃO BLOQUEADORA (POR MEMBRANA)**

Solução Basal.....	10 ml
Molico	0,5 g
Azida Sódica.....	0,002 g
(opcional)	

SOLUÇÃO PARA ANTICORPO (POR MEMBRANA)

Solução Basal.....	10 ml
Molico	0,3 g
Azida Sódica.....	0,002 g
(opcional)	

SOLUÇÃO PARA IODO (POR MEMBRANA)

Solução Basal.....	10 ml
Molico	0,1 g
IODO	10 μ l

SOLUÇÃO DE ACRILAMIDA 40%

Acrilamida.....	750 g
Bis.....	20 g
Água deionizada (completar)	2000ml

Filtrar em funil com papel de filtro. Manter em geladeira

ANOTAÇÕES
