

FERNANDA KYLE CEZAR

PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA A
MÚLTIPLAS DROGAS E OS
PROGENITORES HEMATOPOÉTICOS



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDA KYLE CEZAR

PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA A
MÚLTIPLAS DROGAS E OS
PROGENITORES HEMATOPOÉTICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Fisiologia)

Orientador: Vivian M Rumjanek

Rio de Janeiro
Fevereiro, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Cezar, Fernanda Kyle

Proteínas de resistência a múltiplas drogas e os progenitores
hematopoéticos / Fernanda Kyle Cezar. – Rio de Janeiro: UFRJ /
IBCCF, 2007.

xviii, 91 f. : il. ; 31 cm

Orientadora: Vivian Mary Barral Dood Rumjanek

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, IBCCF, Programa de Pós-graduação
em Ciências Biológicas, 2007.

Referências bibliográficas: f. 73-82

1. Células da medula óssea. 2. Células-tronco hematopoéticas. 3.
Glicoproteína P. 4. Proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas . 5.

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunologia Tumoral do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Vivian M. Rumjanek, na vigência de auxílio coincido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico esta tese aos meus
Pais e ao Marcinho,
por serem pessoas
preciosas na minha vida.

Agradecimentos

Chegou o momento de agradecer formalmente a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desta tese, de forma direta ou indireta. É um momento alegre por lembrar fatos e passagens, mas ao mesmo tempo difícil por ter de selecionar as pessoas e/ou os momentos a serem citados. Todos foram e são importantes.

Agradeço primeiramente aos meus Pais, por me ensinarem os conceitos mais importantes da vida, muitas vezes sem uma só palavra, apenas com exemplos. Por me oferecerem uma base sólida que possibilitou meu crescimento em vários aspectos, a conclusão desta tese é apenas um deles. Por me darem uma família maravilhosa. E por confiarem em mim e sempre apoiarem as minhas escolhas.

Ao Marcinho, por ser muito mais que namorado, meu amigo e companheiro de todas as horas. Por tudo que passamos juntos, por me proporcionar uma vida leve e alegre. Pela companhia em algumas idas ao laboratório em finais de semana, pela paciência e entendimento em algumas fases mais atribuladas. Pelo interesse nos meus assuntos. Pelas risadas. Por aceitar e apoiar as minhas escolhas. Aqui está o resultado de mais uma etapa com você ao meu lado. Obrigada por todos os momentos de felicidade, e também pela ajuda prática na elaboração desta tese, como a formatação das referências e do índice, entre outros favores. É isso aí!

Às minhas irmãs por todos esses anos juntas, que me deram a oportunidade de aprender no dia-a-dia a entender e aceitar as diferenças. Admiro muito vocês.

À minha querida sobrinha Giovanna, por toda a alegria que sempre traz, e que não se conforma por, ultimamente, eu ficar tanto tempo no computador. E a mais recém chegada na família, a anjinha Gabriela, pela paz que exala e transmite.

A toda minha família, meus afilhados e amigos, por entenderem meus sumiços.

À Vivian por confiar em mim e ter paciência com minhas teimosias e afobações. Pelas ricas conversas científicas ou triviais. Por fazer questão de ver e discutir cada experimento e acompanhar de perto os que deram certo, e também os que deram errado, e principalmente não me deixar desanimar nesses momentos desanimadores. Muito obrigada por ser muito mais que uma orientadora.

À Dr^a Otília pela sua presença sempre positiva e animadora. Por suas palavras de incentivo nos momentos oportunos. Por ser um exemplo a ser seguido.

À Juliana, não sei se uma amiga que se tornou orientadora ou se orientadora que se tornou amiga, ou se a amizade e a orientação cresceram juntas e contribuíram com o crescimento uma da outra. O fato é que nos longos mega-experimentos sempre tinha tempo para conversas pessoais, e durante as saídas descontraídas sempre aparecia um “c-kit/Sca” (não é Cla?). Obrigada por estar ao meu lado nos experimentos, na discussão deles e também por não me deixar desanimar. Por me incentivar e acreditar em mim, e por não se aborrecer com meus telefonemas desesperados. Pelas dicas de inclinar a plaquinha e como ser mais prática no -70. Ju, muito obrigada por tudo.

À Clarissa pela amizade que cresceu nesses anos, minha vizinha de mesa e companheira de congressos, pessoa maravilhosa e sensível que acerta com precisão meus pensamentos e minha veia, além do compartilhamento de muitas teorias, e das promessas de crepes. Obrigada pelos incentivos, pelos momentos alegres, e pela ajuda, carinho e atenção na preparação das apresentações.

À Andréa, pelo seu exemplo de força e determinação, pela companhia em algumas idas ao laboratório em finais de semana e na volta para casa.

À Nathalia, minha dupla de limpeza, por todos os momentos descontraídos, pelos dias em Búzios e o mergulhão! Estamos numa fase parecida, seleção, tese e monografia, que se resumem naquela “rodadinha”!

À Clarice por toda a boa vontade em ajudar sempre, e pela ajuda nas discussões estatísticas. Sentirei saudades.

Ao Raphael, parceiro da lambada, pelas várias dicas computacionais, por tornar o dia-a-dia mais descontraído, apesar de ser a pessoa que mais implica comigo. “O meu nome é trabalho”.

Ao Flávio, pessoa mais calma e esquecida do laboratório, por trazer tranqüilidade e alegria mesmo nos dias mais difíceis.

Ao André, Jaqueline e Tião, por possibilitarem o funcionamento das coisas.

A Alcira, Virgínia, Daniela, Renata, Karen, amigas do laboratório, mas devido aos caminhos tomados pela vida não estamos mais juntas diariamente, mas sempre me lembro de vocês com muito carinho e alegria.

A todos do laboratório de imunologia tumoral: Claudia, Eduardo, Flavia, Jairo, Mabel, Maria, Marina, Paula, Renata, Sandra e Thiago, pelo convívio diário.

Ao Bob e seus amigos, pelos momentos de alegria e descontração tão importantes na vida, e por ouvir atentamente os treinos para as apresentações.

A Deus, por tudo.

Há quem fale que a vida da gente

É um nada no mundo

É uma gota, é um tempo

Que nem dá segundo,

Há quem fale que é um divino

Mistério profundo

É o sopro do Criador

Numa atitude repleta de amor

(...)

Somos nós que fazemos a vida

Como der ou puder ou quiser

(...)

Viver e não ter a vergonha de ser feliz

Cantar... A beleza de ser um eterno aprendiz

(Gonzaguinha, O que é o que é?)

Resumo

A glicoproteína P (Pgp) e a proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas 1 (MRP1) são membros da superfamília de transportadores ABC. Ambas são proteínas transmembranares, e transportam os seus substratos de forma ativa. Tanto a Pgp quanto a MRP foram descritas primeiramente em tumores, mas atualmente já se sabe que elas são expressas fisiologicamente em diversos tecidos. Neste trabalho nós investigamos a presença e a atividade destas proteínas nas células mononucleares (CMMO) de camundongos em diferentes idades, e as relacionamos com a expressão das proteínas c-kit e Sca-1, que identificam os progenitores hematopoéticos. As células mononucleares da medula óssea foram separadas por gradiente de densidade. A atividade das proteínas foi medida baseada na extrusão dos substratos fluorescentes Rodamina 123 (para Pgp) e Fluo-3 (para MRP). As subpopulações de progenitores foram identificadas com o uso dos anticorpos anti-c-kit e anti-Sca1, e as fluorescências medidas por citometria de fluxo. A Pgp estava ativa em 5% enquanto cerca de 50% das CMMO expressaram e apresentaram atividade MRP. Cerca de 14% das CMMO foram positivas para c-kit e/ou Sca-1 (9,3% c-kit⁻Sca-1⁺, 4,2% c-kit⁺Sca-1⁻ e 0,9% c-kit⁺Sca-1⁺). Entre essas subpopulações apenas as células c-kit⁻Sca-1⁺ apresentaram atividade Pgp (21,36%). Por outro lado, as três subpopulações apresentaram células com atividade MRP. A maioria das células c-kit⁺Sca-1⁻ (82,5%) apresentou atividade para esta proteína, comparado com 54,1% das células c-kit⁺Sca-1⁺ e 38,8% das c-kit⁻Sca-1⁺. Além disto, demonstramos que a atividade destas proteínas varia nas diferentes fases da vida do animal. A população de células com atividade da Pgp aumenta gradativamente com o envelhecimento correspondendo a 2,5%, 4,2% e 7,3% das células dos animais jovens, adultos e senis, respectivamente. Com relação a MRP, observamos que os animais senis e adultos expressam cerca de 1,5 vezes a MRP1 em relação aos animais jovens, e o percentual de células com atividade MRP também é maior nestes grupos, correspondendo a $32,4 \pm 10\%$, $55,5 \pm 12\%$ e $58,1 \pm 9\%$ das CMMO dos animais jovens, adultos e senis, respectivamente. Quando as subpopulações de progenitores foram estudadas separadamente, observamos um aumento com o envelhecimento no percentual de células com atividade Pgp na subpopulação c-kit⁻Sca-1⁺, ($10,7 \pm 4,5\%$, $16,1 \pm 1,8\%$ e $19,9 \pm 7,6\%$), e na subpopulação c-kit⁺Sca-1⁺ ($1,8 \pm 1,3\%$ e $2,5 \pm 1,4\%$ e $9,3 \pm 3,1\%$), quando animais jovens, adultos e senis foram comparados respectivamente. Por outro lado, o percentual de células com atividade MRP aumenta nas subpopulações c-kit⁺Sca-1⁻ ($61,4 \pm 14,6\%$, $81,8 \pm 9,6\%$ e $89,8 \pm 3,8\%$) e c-kit⁻Sca-1⁻ ($33,6 \pm 9,6\%$, $62,1 \pm 12,8\%$ e $73,5 \pm 7,4\%$) quando animais jovens, adultos e senis foram comparados respectivamente. Logo, células da medula óssea expressam Pgp e MRP. Estas moléculas estão presentes em proporções diferentes nas várias subpopulações de células progenitoras e a expressão e a atividade destes transportadores varia com a idade do animal. É possível que as mesmas desempenhem um papel na diferenciação das células tronco.

Abstract

P-glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) are members of the ABC family of transporter proteins. Both molecules are membrane associated energy-dependent efflux pumps with different substrate selectivity and may play a role in the activation, differentiation and function of hematopoietic cells. Herein, the presence and activities of Pgp and MRP1 in mouse bone marrow mononuclear cells (BMMC) and their relationship to the proteins c-kit and Sca-1 were evaluated. Mouse BMMC were separated by gradient sedimentation. Pgp and MRP activities were measured based on the extrusion of Rhodamine 123 (for Pgp) and Fluo-3 (for MRP). Cell populations were assessed by cytometry using anti-c-kit and anti-Sca1 antibodies. Pgp activity was present in 5% of BMMC while 50% of BMMC cells presented MRP activity. This agrees with the amount of cells expressing the MRP1 surface molecule ($51.3 \pm 4.17\%$). Around 14% of BMMC were positive for c-kit and/or Sca-1 (9.3% c-kit⁺Sca-1⁺, 4.2% c-kit⁺Sca-1⁻ and 0.9% c-kit⁺Sca-1⁺). Among these subpopulations only c-kit⁺Sca-1⁺ cells presented Pgp activity (21.36%). On the other hand, MRP activity was present in all three subpopulations. Most cells (82.5%) of the c-kit⁺Sca-1⁻ subpopulation presented MRP1 activity compared to 54.1% of c-kit⁺Sca-1⁺ and 38.8% of c-kit⁺Sca-1⁺. Furthermore, it was shown that the activity of these proteins varies during different stages of the animal life. The population of the cells with Pgp activity increases gradually during aging, corresponding to 2.5%, 4.2% and 7.3% of the cells from young, adult and old animals respectively. Regarding MRP, we observed that old and adult animals express nearly 1.5 times more MRP1 compared to young mice, and the percent of cells with MRP activity is also higher in these groups corresponding to $32.4 \pm 10\%$, $55.5 \pm 12\%$ e $58.1 \pm 9\%$ of the BMMC from young, adult and old animals respectively. When the progenitors subpopulation were analyzed separately, an increase in the percent of cells with Pgp activity with the aging process in the subpopulation c-kit⁺Sca-1⁺, ($10.7 \pm 4.5\%$, $16.1 \pm 1.8\%$ and $19.9 \pm 7.6\%$), and c-kit⁺Sca-1⁺ ($1.8 \pm 1.3\%$, $2.5 \pm 1.4\%$ and $9.3 \pm 3.1\%$). On the other hand, the percent of cells with MRP activity increases in the subpopulation c-kit⁺Sca-1⁻ ($61.4 \pm 14.6\%$, $81.8 \pm 9.6\%$ and $89.8 \pm 3.8\%$) and c-kit⁺Sca-1⁻ ($33.6 \pm 9.6\%$, $62.1 \pm 12.8\%$ e $73.5 \pm 7.4\%$). In summary, bone marrow cells express Pgp and MRP. These molecules are present in different proportions in the various subpopulations of the progenitor cells and the expression and activity of these transporters vary with the animal age. It is possible that these molecules play a role in the differentiation process of stem cells.

Lista de abreviaturas

ABC	ATP Binding Cassete
ATP	Adenosina trifosfato
BCRP	Proteína relacionada ao câncer de mama (<i>Breast cancer resistance protein</i>)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CSA	Ciclosporina A
CSF	Fator estimulador de colônias (<i>Colony-stimulating factor</i>)
CMMO	Células mononucleares da medula óssea
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
G- CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos
HSCs	Células tronco hematopoéticas (<i>Hematopoietic stem cells</i>)
IG	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INDO	Indometacina
INF- γ	Interferon gama
Lin	Linhagem
LSK	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺
LT	Leucotrieno
LT-HSC	<i>Long term-hematopoietic stem cells</i>
M-CSF	fator estimulador de colônias de monócitos
MDR	Resistência a múltiplas drogas (<i>multidrug resistance</i>)
MK	MK 571
MRP	Proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (<i>multidrug resistance-associated protein 1</i>)
MSC	Célula tronco mesenquimal (<i>Mesenchymal stem cell</i>)
MTT	[Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol]
NK	<i>Natural killer</i>
PBS	Solução salina tamponada (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PI	Iodeto de propídeo (<i>Propidium iodide</i>)
PRB	Probenecide

Pgp	Glicoproteína-P (<i>P-glycoprotein</i>)
Rho	Rodamina 123
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	
RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase com transcriptase reversa (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
Sca-1	Antígeno de célula tronco-1 (<i>Stem cell antigen-1</i>)
SCF	Fator de célula tronco (<i>Stem cell factor</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SLAM	<i>Signaling lymphocyte-activating molecule</i>
SP	<i>Side Population</i>
ST-HSC	<i>short term- Hematopoietic stem cells</i>
VP	Verapamil

Lista de Figuras

Figura 1. Hematopoese	5
Figura 2. Medula óssea e as células tronco hematopoéticas e mesenquimais	6
Figura 3: Os nichos das células tronco hematopoéticas	7
Figura 4: Estrutura secundária da Pgp	13
Figura 5: Estrutura secundária da MRP1	16
Figura 6. Modelos de envelhecimento das células tronco hematopoéticas	20
Figura 7. Atividade da Pgp nas CMMO	38
Figura 8. Curva de concentração dos inibidores da Pgp	39
Figura 9. Viabilidade das CMMO na presença dos inibidores da Pgp	40
Figura 10. Expressão da MRP1 nas células mononucleares da medula óssea	41
Figura 11. Atividade relacionada a MRP nas CMMO	43
Figura 12. Curva de concentração dos inibidores da MRP	44
Figura 13. Viabilidade das CMMO na presença dos inibidores da MRP	45
Figura 14. Distribuição das subpopulações de células progenitoras nas CMMO	46
Figura 15. Atividade Pgp e MRP nos progenitores	48
Figura 16. Atividade da Pgp nas CMMO durante o envelhecimento	51
Figura 17: Atividade da Pgp em animais jovens, adultos e senis	52
Figura 18. Expressão da MRP1 nas CMMO durante o envelhecimento	53
Figura 19. Atividade da MRP durante o envelhecimento	54
Figura 20. Atividade da MRP durante o envelhecimento	55
Figura 21. Distribuição das subpopulações de células progenitoras nas CMMO durante o envelhecimento	56
Figura 22. Atividade Pgp nas subpopulações das CMMO durante o envelhecimento	58

Figura 23. Atividade MRP nas subpopulações das CMMO durante o envelhecimento.	60
Figura 24. Modelo de desenvolvimento das HSCs.	64

Sumário

Agradecimentos	vi
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
Lista de abreviaturas:	xiii
Lista de Figuras:.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As células tronco	2
1.1.1. A descoberta	2
1.1.2. Definição	3
1.1.3. Célula tronco hematopoética.....	4
1.1.4. Caracterização das células tronco hematopoéticas	8
1.2. Superfamília de transportadores ABC	11
1.2.1. Glicoproteína-P (Pgp ou ABCB1).....	13
1.2.2. Proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas 1 (MRP1 ou ABCC1).....	16
1.3. Envelhecimento	18
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Materiais	25
3.1.1. Soluções	25
3.1.2. Reagentes.....	26
3.1.3. Animais	28
3.2. Métodos	29
3.2.1. Isolamento das células mononucleares da medula óssea (CMMO).....	29

3.2.2. MTT	30
3.2.3. Efluxo de corantes fluorescentes	30
3.2.4. Marcação das moléculas de superfície celular	32
3.2.5. Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Pgp e as células mononucleares da medula óssea	36
4.1.1. Atividade relacionada a Pgp	36
4.1.2. Viabilidade das CMMO na presença dos inibidores da Pgp	39
4.2. MRP1 e as células mononucleares da medula óssea	41
4.2.1. Expressão da MRP1 nas CMMO	41
4.2.2. Atividade MRP nas CMMO	42
4.2.3. Atividade MRP1 e viabilidade celular	44
4.3. Progenitores da medula óssea e as proteínas Pgp e MRP	45
4.4. Pgp e MRP e envelhecimento	49
4.4.1. Atividade da Pgp no envelhecimento	49
4.4.2. Expressão da MRP1 no envelhecimento	52
4.4.3. Atividade MRP no envelhecimento	53
4.4.4. Atividade da Pgp e da MRP nas células progenitoras durante o envelhecimento	55
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	71
7. REFERÊNCIAS	73
8. ANEXO	83

1. INTRODUÇÃO

1.1. As células tronco

1.1.1. A descoberta

Em 1909, Alexander Maximow, trabalhando em São Petersburgo, foi o pioneiro a sugerir a existência de uma célula tronco hematopoética com a aparência morfológica de um “linfócito”, capaz de migrar através do sangue até nichos que permitiriam a estas células proliferar e se diferenciar (FLIEDNER, 1998).

Por cerca de 40 anos não houve avanços nessa área, até que com o surgimento da radiobiologia, experimentos realizados entre 1950 e 1960 descobriram que a administração de uma dose suficiente de radiação levava a anemia e eventualmente a morte, e a transferência de células de medula óssea normal era capaz de recuperar esses animais letalmente irradiados. Estudos subsequentes demonstraram que as células do doador, possíveis de serem distinguidas das células do hospedeiro devido à presença de uma única translocação cromossômica, eram capazes de se auto-renovar e se diferenciar para reconstituir o sistema hematopoético completo no hospedeiro (revisado por MARTIN e KAUFMAN, 2005).

Ainda na década de 60, foi descrito que a administração de números limitantes de células doadoras era capaz de produzir colônias distintas e quantitativas no baço do hospedeiro irradiado. Cada colônia era derivada clonalmente de um único progenitor hematopoético, chamado então de célula formadora de colônia. Estas células eram capazes de originar células mielóides e eritróides (revisado por MARTIN e KAUFMAN, 2005). Subsequentemente, vários ensaios foram desenvolvidos para monitorar a atividade das células tronco hematopoéticas (HSCs de *Hematopoietic Stem Cell*) tanto *in vitro* como *in vivo*. O ensaio mais aceito é a capacidade das HSCs em prover uma reconstituição de longa

duração (LT-HSC) de todas as linhagens sanguíneas, depois de transplantadas em camundongos letalmente irradiados. Existe, ainda, uma subpopulação de HSC que é capaz de originar todas as linhagens sanguíneas, mas apenas por um curto período de tempo (ST-HSC). Uma outra versão deste ensaio é o transplante em série, este requer que a medula óssea, contendo as HSCs doadas possa ser re-transplantada em receptores secundários e até terciários, enquanto mantém a capacidade de auto-renovação e diferenciação (revisado por WILSON e TRUMPP, 2006). Esses estudos estabeleceram a definição central de uma célula tronco: uma célula capaz de auto-renovação e diferenciação.

1.1.2. Definição

Uma célula tronco é definida pela sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em vários tipos celulares. As células tronco são classificadas de acordo com o seu grau de comprometimento com uma determinada linhagem, em totipotente, pluripotente, multipotente, oligopotente e unipotente (revisado por SMITH, 2006).

- Totipotente: capaz de formar o organismo inteiro. A totipotência é vista no zigoto e nas células do meristema das plantas;
- Pluripotente: capaz de formar todas as linhagens celulares do corpo, incluindo células germinativas e tipos celulares extra-embrionários. Exemplo: células tronco embrionárias.
- Multipotente: capaz de formar múltiplas linhagens que constitui um tecido inteiro ou tecidos. Exemplo: células tronco hematopoéticas.

- Oligopotente: capaz de formar duas ou mais linhagens dentro de um tecido. Exemplo: uma célula tronco neural que pode criar um subgrupo de neurônios no cérebro.
- Unipotente: Forma uma única linhagem. Exemplo: célula tronco espermatogonial (revisado por SMITH, 2006).

As células tronco adultas estão presentes na maioria dos tecidos que se auto-renovam, incluindo a pele, o epitélio intestinal e o sistema hematopoético. Além das características já mencionadas de auto-renovação e diferenciação, as células tronco adultas se dividem pouco, possuindo um ciclo celular lento; correspondem sempre a um pequeno percentual da população total do tecido correspondente; e, na maioria dos tecidos, não possuem a especialização funcional da progênie que elas dão origem (ALISON e col., 2002). A célula tronco adulta mais bem estudada é a célula tronco hematopoética (HSC).

1.1.3. Célula tronco hematopoética

Todas as células maduras do sangue são geradas a partir de um número relativamente pequeno de células tronco hematopoéticas (HSCs). As HSCs geram as várias linhagens hematopoéticas através de sucessivos progenitores intermediários. O progenitor linfóide comum gera apenas células B, T ou NK, e o progenitor mielóide comum, origina eritrócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, e plaquetas. Abaixo dos progenitores comuns, estão os progenitores mais maduros que são mais restritos em relação ao número e tipos de linhagem capazes de gerar. Finalmente, são produzidas as células terminantemente diferenciadas,

(Figura 1), que não se dividem e sofrem apoptose depois de um período de tempo que varia de horas (neutrófilos) a anos (alguns linfócitos) (SMITH, 2003).

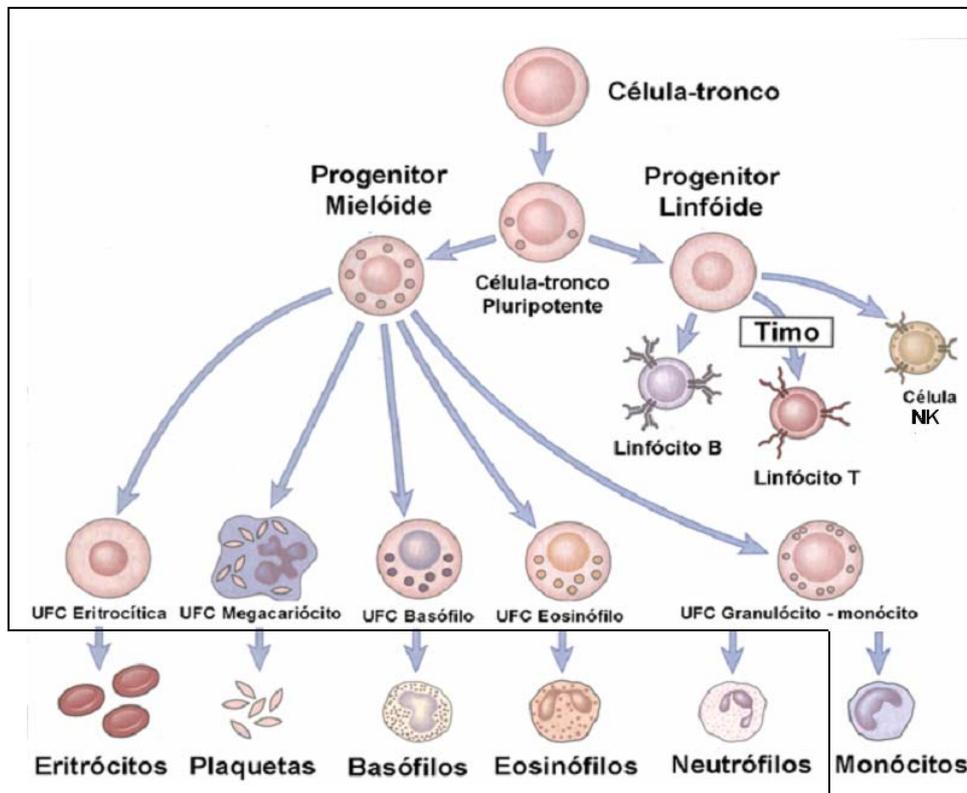


Figura 1. Hematopoese. Células presentes na medula óssea. Em destaque as células mononucleares da medula óssea (CMMO). Figura modificada de ABBAS & LICHTMAN , 2003.

Durante o desenvolvimento, o sítio da hematopoese muda diversas vezes. No período embrionário ela ocorre, inicialmente, no saco vitelino, em seguida no fígado e por último no baço. Entretanto, a partir da fase final do período fetal e durante o restante da vida, essa função é assumida gradualmente pela medula óssea. Quando a medula óssea sofre injúrias ou quando há uma demanda excepcional pela produção de novas células sanguíneas, o fígado e o baço podem ser recrutados como sítios extramedulares de hematopoese (ABBAS e LICHTMAN , 2003).

A cavidade óssea é preenchida pela medula óssea e por vasos sanguíneos. O desenvolvimento das células hematopoéticas ocorre na medula óssea até elas

completarem o processo de maturação, ou seja, até as células adquirirem o fenótipo de células maduras, e serem liberadas no sistema vascular. Logo, a medula óssea contém células em diversos estágios de maturação. Uma maneira simples de obter uma fração rica em células progenitoras é através da separação das células mononucleares da medula óssea (CMMO) (revisado por THOMAS e col., 1999), neste estudo, utilizaremos estas células. As HSCs e sua progênie são ancoradas pelas células estromais na medula óssea. As células tronco mesenquimais (MSCs) também residem na medula óssea e tem sido demonstrado *in vitro* e parcialmente *in vivo*, que delas originam a maioria das linhagens das células estromais da medula óssea, incluindo condrócitos, osteoblastos, fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e miócitos (**Figura 2**). Entretanto, as MSCs não são tão bem caracterizadas quanto as HSCs (revisado por YIN e LI, 2006).

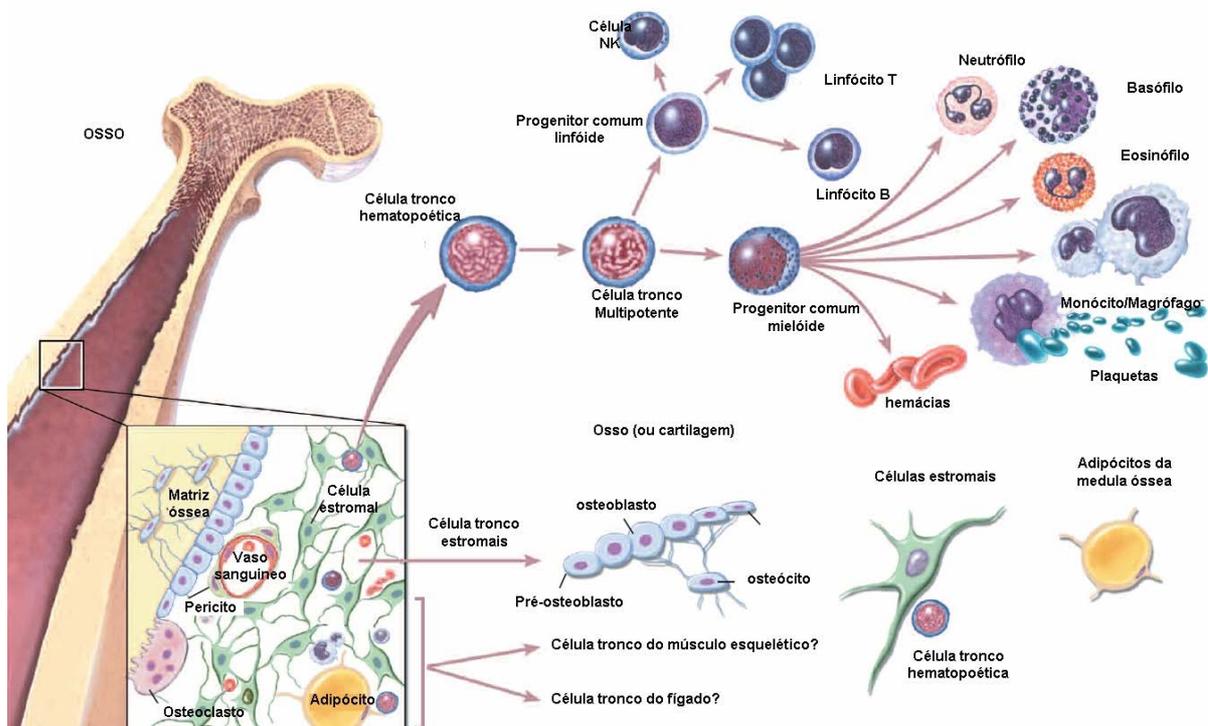


Figura 2. Medula óssea e as células tronco hematopoéticas e mesenquimais. Figura modificada de <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter4.asp>

As células estromais da medula óssea além de fornecer o suporte físico para as células hematopoéticas, liberam fatores fundamentais para o desenvolvimento dessas células, como fator estimulador de colônias (CSF) de granulócitos-monócitos (GM-CSF), de monócitos (M-CSF), de granulócitos (G-CSF), interleucina 3 (IL-3), IL-6, IL-7, fator de célula tronco (SCF), ligante Flt-3, trombopoetina, entre outros (revisado em LOTEM e SACHS, 2002)

O nicho das células tronco é um lugar específico nos tecidos adultos onde as células tronco residem e sofrem os processos de auto-renovação e diferenciação. Estruturalmente, o nicho é formado por células de suporte que formam o microambiente e liberam os fatores necessários para as células tronco (revisado por YIN e LI, 2006). Já foram descritos dois nichos distintos capazes de suportar as HSCs, o nicho osteoblástico (ZHANG e col., 2003) e o nicho vascular (KIEL e col., 2005) (**Figura 3**).

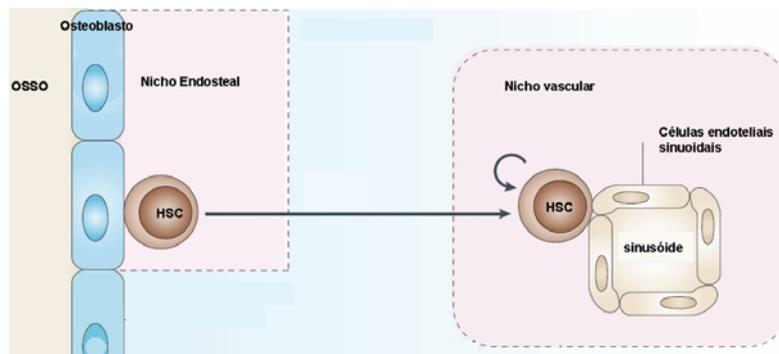


Figura 3: Os nichos das células tronco hematopoéticas. Figura modificada de WILSON e TRUMPP, 2006)

Como dito anteriormente, as células tronco são definidas por sua capacidade de auto-renovação e de produzir células que vão se diferenciar. Uma estratégia pela qual as células tronco podem realizar estas duas tarefas é através da divisão celular assimétrica, onde cada célula tronco se divide para gerar uma célula filha destinada

a ser célula tronco (auto-renovação) e uma célula filha que se divide e se diferencia. Porém, isto não explica a capacidade das células tronco de aumentar o seu número em algumas situações, como quando o *pool* de células tronco está sendo estabelecido durante o desenvolvimento e quando elas são regeneradas depois de uma injúria. Atualmente, é aceito que a maioria das células tronco pode se dividir de forma simétrica ou assimétrica, e que o balanço entre estes dois tipos de divisão celular é controlado para a produção do número apropriado de células tronco e células diferenciadas. Quando este balanço apresenta algum defeito, pode haver a geração de doenças como, por exemplo, o câncer (revisado por MORRISON e KIMBLE, 2006). Os mecanismos que regulam essas divisões ainda não estão totalmente esclarecidos, mas existem evidências que o micro-ambiente participa deste processo.

1.1.4. Caracterização das células tronco hematopoéticas

Os ensaios funcionais, descritos no texto sobre a descoberta das células tronco, têm sido utilizados para estabelecer o fenótipo das HSCs de camundongos, permitindo o isolamento através do citômetro de fluxo. Todas as HSCs funcionais são encontradas na população de células da medula óssea que não expressam as proteínas de superfície celular normalmente presentes nas células hematopoéticas comprometidas com linhagem (Lin), e expressam altos níveis do antígeno de células tronco 1 (Sca-1) e c-kit. Por isso esse subgrupo de células da medula óssea é conhecido como LSK (Lin⁻Sca1⁺c-kit⁺) (Revisado por WILSON e TRUMPP, 2006).

O c-kit é uma proteína da família de proto-oncogene tirosina cinase. Funciona como um receptor de superfície celular e é codificado pelo *locus* W (white spotting loci) localizado no cromossomo 5 de camundongos, e no braço longo do

cromossomo 4 em humanos (NOCKA e col., 1990). O ligante do c-kit é chamado de fator de células tronco (SCF). Já foram descritas diversas ocorrências naturais de mutações com perda de função do gene c-kit. Mutações nos dois alelos leva à morte intra-uterina ou logo após o nascimento, devido à anemia. No estado heterozigoto há ocorrência de anemia, infertilidade e falha na pigmentação (NOCKA e col., 1990). Mutações no gene que codifica o SCF (*Sl*) levam a fenótipos muito parecidos com os descritos acima. A perda completa do SCF leva à morte intra-uterina ou logo após o nascimento, enquanto o heterozigoto apresenta anemia. Os fenótipos descritos nos camundongos mutantes *W* e *Sl*, sugerem que a sinalização do c-kit é fundamental para o desenvolvimento normal da hematopoese (revisado por LENNARTSSON e col., 2005).

Em 1988, Spangrude e seus colaboradores identificaram que as células tronco hematopoéticas de camundongos capazes de reconstituir todas as linhagens sangüíneas de animais letalmente irradiados, expressavam o antígeno de células tronco, Sca-1 (Ly6A/E). O Sca-1 também é uma molécula de superfície, mas o seu ligante ainda não foi identificado, e ainda não se conhece sua função. Esta proteína é expressa nas HSCs, e em fases mais imaturas dos pró-timócitos que semeiam o córtex tímico, mas à medida que esta célula sofre o processo de maturação, a expressão do Sca-1 se perde, e é re-expresso em linfócitos maduros. O Sca-1 também é expresso por células não hematopoéticas, como fibroblastos, osteoblastos e células epiteliais renais (revisado por STANFORD e col., 1997). Estudos demonstraram que animais nocautes para o Sca-1 são aparentemente normais e contém todas as linhagens hematopoéticas, mas as células T periféricas proliferam mais em resposta a mitógenos (STANFORD e col., 1997). Quando testada a capacidade das HSC em ensaios de repopulação competitiva, as células dos

animais nocautes apresentaram desvantagem competitiva na formação de algumas colônias, houve ainda uma diminuição da capacidade de repopular a medula óssea nos transplantes secundários. Esses resultados sugerem que o Sca-1 exerça uma função complexa e específica na hematopoese (ITO e col., 2003).

Em humanos, uma característica das HSC é a expressão da molécula de superfície CD34, que é uma proteína transmembranar altamente glicosilada, expressa em pequenos subgrupos celulares da medula óssea, mas não em células maduras, correspondendo a apenas 1-4% de células da medula óssea de um adulto normal (revisado por THOMAS e col., 1999). No entanto, evidências recentes indicam que as células tronco hematopoéticas possam ser CD34⁻ (ZANJANI e col., 2003). Apesar de ser largamente utilizada, ainda não se identificou a função fisiológica desta molécula, mas há evidências que elas participam dos processos de adesão e *homing* (revisado por GANGENAHALLI e col., 2006)

Recentemente, foi descrito que a simples combinação de duas proteínas de superfície, CD150 e CD48, pertencentes à família de receptores SLAM (*Signaling lymphocyte-activating molecule*) seria suficiente para identificar as células progenitoras da medula óssea. Utilizando estas moléculas como marcadores, é possível chegar ao mesmo grau de purificação obtido através da forma tradicional, que utiliza mais de dez marcadores (Lin⁻kit⁺Sca1⁺) (KIEL e col., 2005). Esses achados irão simplificar significativamente a purificação das células tronco, além de possibilitar uma melhoria neste processo.

Uma outra estratégia que tem sido utilizada para isolar as células tronco é através da marcação diferencial com corantes vitais, Rhodamina 123 e Hoechst 32342. A população que retém pouco corante é chamada de SP (*Side population*). Esta fração é grandemente enriquecida com células tronco hematopoéticas,

caracterizando-se por sua capacidade de promover uma repopulação de longa duração, com níveis similares aos atingidos através da purificação das HSC, usando a combinação de marcadores de superfície celular (GOODELL e col., 1996). Esses estudos foram primeiramente realizados em preparação de medula óssea murina, mas atualmente, já foram descritas células com fenótipo SP em humanos, e em diversos mamíferos, além de estar presente em muitos tecidos sólidos como músculo esquelético, pulmão, fígado, pele, cérebro, e glândula mamária (revisado por CHALLEN e LITTLE, 2006). O fenótipo SP está relacionado com a expressão de proteínas pertencentes à superfamília de transportadores ABC.

1.2. Superfamília de transportadores ABC

A superfamília de transportadores ABC (ATP-binding cassette) é formada por proteínas altamente conservadas evolutivamente, estando presente desde as bactérias até os humanos. Além disso, é uma das maiores e mais bem estudadas superfamílias de proteínas. A maioria dos seus membros é responsável pelo transporte ativo de uma grande variedade de compostos através de membranas biológicas, incluindo: íons, peptídeos, esteróides, polissacarídeos, aminoácidos, ânions orgânicos, ácidos biliares e xenobióticos (revisado por KLEIN e col., 1999).

Em humanos já foram descritos 48 genes ABC. Esses genes são divididos em 7 subfamílias, baseado na organização dos domínios e homologia dos aminoácidos. Essas proteínas possuem a nomenclatura de acordo com a subfamília a que pertencem (revisado por DEAN e col., 2001)

As proteínas ABC são essenciais para várias atividades celulares, e muitas delas participam da manutenção da bicamada lipídica e do transporte de ácidos graxos e esteróides. Mutações nesses genes contribuem para diversas doenças humanas, como por exemplo, fibrose cística, degeneração da retina, doenças

neurológicas, anemia e defeitos no transporte do colesterol e da bile (revisado por DEAN e col., 2001).

A super-expressão de alguns transportadores membros da família ABC está relacionada à resistência a múltiplas drogas (MDR), fenômeno no qual células tumorais são resistentes aos efeitos citotóxicos de diversos quimioterápicos não relacionados funcional ou estruturalmente.

A primeira proteína a ser descrita envolvida na resistência a múltiplas drogas foi a glicoproteína-P (Pgp ou ABCB1) (JULIANO e LING, 1976). Anos mais tarde identificou-se um segundo transportador relacionado a este fenômeno, a proteína relacionada a resistência a múltiplas drogas 1 (MRP1 ou ABCC1) (COLE e col., 1992). A caracterização da MRP1 facilitou a descoberta de mais treze genes dentro da mesma subfamília ABCC (ou MRP), onde pelo menos quatro também estão relacionados ao fenômeno de MDR (COLE e col., 1992). O terceiro transportador descrito envolvido neste fenômeno foi a proteína relacionada ao câncer de mama (BCRP ou ABCG2) (DOYLE e col., 1998).

A Pgp e a MRP foram descritas primeiramente em tumores, mas atualmente já se sabe que elas são expressas fisiologicamente em diversos tecidos. Os primeiros substratos identificados foram agentes quimioterápicos. Apesar das diferenças moleculares, essas proteínas compartilham muitos substratos, especialmente drogas anti-tumorais, como antraciclinas e alcalóides da vinca, porém diferem na maneira de transportá-los.

1.2.1. Glicoproteína-P (Pgp ou ABCB1)

A Pgp é uma glicoproteína de membrana de 170 kDa (ROTHERMBERG e LING 1989). A Pgp possui a estrutura clássica dos transportadores ABC, com quatro domínios (**Figura 4**).

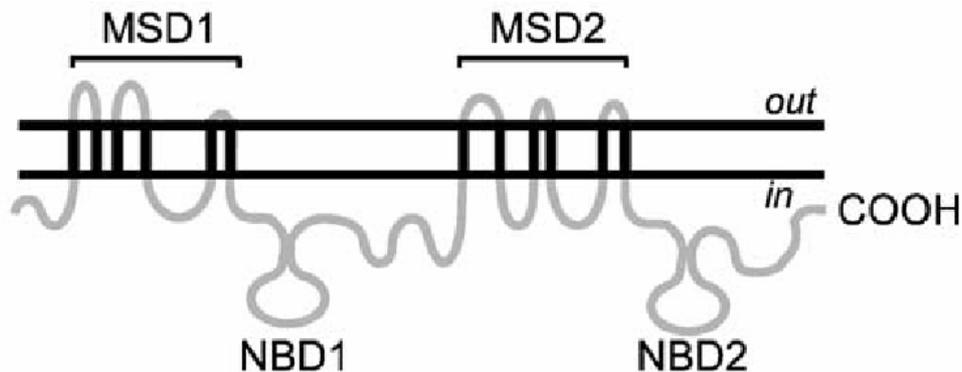


Figura 4: Estrutura secundária da Pgp. Retirado de Leslie e col., 2005.

Em roedores, a Pgp é codificada por uma família de três genes resistentes a múltiplas drogas (*mdr1*, *mdr2*, *mdr3*) e em humanos por dois genes (*mdr1* e *mdr2*) (SCHIENGOLD e col., 2001).

Como dito anteriormente, a Pgp foi identificada primeiramente em células tumorais, no entanto, esta proteína já foi descrita também em diversas células de tecidos normais, como por exemplo: células adrenocorticais, túbulo proximal renal, hepatócitos biliares, células da mucosa do intestino grosso e delgado, dutos pancreáticos (THIEBAUT e col., 1987), nas células endoteliais formadoras da barreira hematoencefálica (CORDON-CARDO e col., 1989), e na barreira materno-fetal da placenta (LANKAS e col., 1998). Além disto, a Pgp já foi descrita nas células do sistema imune, como em células tronco hematopoéticas (CHAUDHARY e RONINSON, 1991), linfócitos maduros (DRACH e col., 1992), células NK (WILISCH e col., 1993), timócitos (MACDONALD e col., 1995; PILARSKI e col., 1995; LEITE e

col., 2006), células dendríticas (RANDOLPH e col.,1998), monócitos (VELLENGA e col., 1999) e macrófagos (PUDDU e col., 1999).

Foram descritos como possíveis substratos fisiológicos para Pgp íons, alguns peptídeos, fator de agregação plaquetária (PAF) (ERNEST e BELLO-REUSS, 1999) e glicocorticóides (GRUOL e BOURGEOIS, 1994). A Pgp também está envolvida na liberação de algumas citocinas por linfócitos ativados, como a Interleucina-2 (IL-2), IL-4 e interferon- γ (IFN- γ) (DRACH e col., 1996). Também foram descritos vários substratos não fisiológicos da Pgp, como a rodamina 123 (Rho), um corante catiônico que se liga à mitocôndria. Esta substância tem sido amplamente utilizada para verificar a atividade da Pgp tanto *in vitro* como *in vivo* (NEYFAKH e col., 1988; MARQUES-SANTOS e col., 1999).

Algumas substâncias são capazes de modular a atividade da Pgp, como por exemplo: ciclosporina A, verapamil, trifluoperazina e PSC833. Estes agentes restauram o acúmulo intracelular de quimioterápicos nas células resistentes a múltiplas drogas, através de mecanismos que envolvem mudanças conformacionais e competição entre substratos (TAN e col., 2000).

A expressão da Pgp tem sido relacionada com a proteção dos tecidos, pois ela está envolvida com a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos e toxinas (revisado por LESLIE e col., 2005). Também já foram descritas algumas funções para a Pgp nas células do sistema imune. Nas células deste sistema, a Pgp parece estar envolvida na atividade citotóxica das células NK e CD8⁺ (GUPTA e col., 1992; CHONG e col., 1993), na regulação da ativação celular (FRANK e col., 2001), na migração (RANDOLPH e col., 1998) e na apresentação de antígenos pelas células dendríticas (PENDSE e col., 2006).

Tem sido sugerido que a Pgp esteja envolvida na modulação do processo de apoptose. A super-expressão da Pgp em linhagens tumorais confere resistência a apoptose induzida por quimioterápicos, por irradiação UV, pela interação entre as moléculas Fas e Fas-L e por outras vias que ativam caspases (SMYTH e col., 1998; MONTOVANI e col., 2006). A inibição da Pgp induz um aumento na morte por apoptose induzida por glicocorticóides e metotrexato, em linfócitos periféricos ativados com mitógenos (PAWLIK e col., 2005).

Como dito anteriormente, existe uma população na medula óssea denominada SP, que é enriquecida de células tronco hematopóéticas (GODELL, 1996). Inicialmente, o fenótipo SP foi relacionado com a expressão da Pgp (GODELL, 1996), mas posteriormente, verificou-se que em animais que não expressam Pgp existe um número normal de células SP na medula óssea, sugerindo que a expressão da Pgp não é requerida para o fenótipo SP (ZHOU e col., 2001). Em contraste, em animais deficientes para BCRP, uma outra proteína da família de transportadores ABC, foi observada uma redução significativa no número de células SP na medula óssea e no músculo esquelético (ZHOU e col., 2002). Além disto, a super-expressão da Pgp aumenta a fração SP para 3,6%, enquanto que a super-expressão da BCRP leva a 62,5% as células SP. Logo, a Pgp pode ajudar a conferir o fenótipo SP, mas não é absolutamente requerida para isso, enquanto que a BCRP parece ser a principal responsável for este fenótipo (BUNTING e col., 2000; revisado em CHALLEN e LITTLE, 2006).

A super-expressão da Pgp leva a expansão das HSC e da doença mielo-proliferativa (BUNTING e col., 1998), enquanto que, a super-expressão da BCRP bloqueia o desenvolvimento da hematopoese (ZHOU e col., 2001). No entanto, os animais deficientes em BCRP possuem o número normal de HSC na medula óssea,

e animais deficientes para as duas proteínas simultaneamente, também possuem número normal de células sanguíneas, e de células formadoras de colônias na medula óssea e demonstram um desenvolvimento hematopoético normal (ZHOU e col., 2003). Células isoladas apenas pela presença da BCRP exibiram um pequeno potencial de formar colônias (revisado em CHALLEN e LITTLE, 2006).

Nos animais $Pgp^{-/-}BCRP^{-/-}$, as células progenitoras hematopoéticas eram mais sensíveis a mitoxantrona comparada com os animais nocautes para apenas uma das proteínas, sugerindo que essas proteínas atuam na proteção destas células contra substâncias tóxicas, na diminuição de substâncias fisiológicas que levam a diferenciação ou a proliferação e ainda protegendo as células do processo de apoptose (revisado em CHALLEN e LITTLE, 2006).

1.2.2. Proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas 1

(MRP1 ou ABCC1)

A MRP1 é uma glicoproteína de membrana, de 190 kDa, e difere da Pgp em sua estrutura, possuindo cinco domínios (COLE e col.,1992) (**Figura 5**).

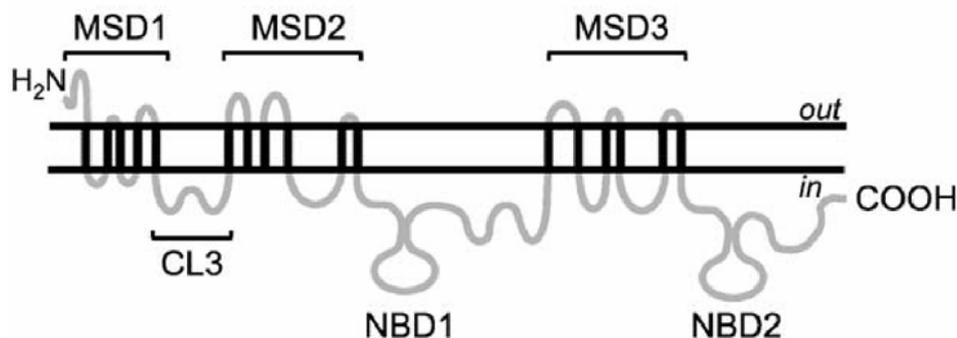


Figura 5: Estrutura secundária da MRP1. Retirado de Leslie e col., 2005,

A MRP1 transporta alguns de seus substratos conjugados à glutathiona reduzida (GSH), glucoronide ou sulfato, ou ainda utilizando um mecanismo de co-transporte (LOE e col., 1996).

A MRP1 é expressa na maioria dos tecidos do corpo, sendo encontrada nos pulmões, testículos, rins, músculos esqueléticos, células mononucleares do sangue periférico e no fígado (revisado em LESLIE e col., 2005). Esta proteína também já foi descrita em linfócitos maduros (LEGRAND e col., 1996) e em células dendríticas (ROBBIANE e col., 2000). Além disto, nosso grupo demonstrou a expressão e atividade de MRP1 em timócitos murinos, sugerindo que ela esteja amplamente distribuída, não parecendo haver uma expressão preferencial entre as diversas subpopulações tímicas (LEITE e col., 2006).

Já foram descritas algumas funções fisiológicas para a MRP, como a secreção de eicosanoides, do leucotrieno C₄ (LTC₄), LTD₄ e LTE₄, a secreção de glutathiona oxidada por radicais livres, e o transporte de cortisol (MULLER e col., 1994).

Assim como a Pgp, a MRP possui substratos não fisiológicos, que são utilizados para analisar a atividade desta proteína como, por exemplo, o ânion fluorescente, Fluo-3 (PRECHT e col., 2000). Também já foram descritas várias substâncias capazes de reverter a atividade da MRP, como a indometacina (um anti-inflamatório não esteroidal), probenicida (um inibidor do tráfego de vesículas) e MK 571 (um antagonista do receptor de leucotrieno).

Os animais deficientes para MRP1 não apresentam alterações quantitativas nas células do sistema imune, sugerindo que não deve apresentar problemas na hematopoese mas apresentam uma diminuição na resposta inflamatória (LORICO e col., 1997, WIJNHOLDS e col., 1997). Em modelos de tuberculose, (VERBON e

col., 2002) e de pneumonia (SCHULTZ e col., 2001) observou-se um comprometimento na indução da resposta imune. Além disso, a MRP1 está envolvida na regulação da ativação celular (PRECHT e col., 2000), na migração e diferenciação das células dendríticas (ROBBIANI e col., 2000).

Nosso grupo também demonstrou usando um modelo *in vivo* de inflamação, que a MRP está envolvida com a formação de edema, com a migração de polimorfonucleares para o sítio inflamatório e na liberação de mediadores lipídicos e de citocinas (LEITE, 2007). Esse efeito é provavelmente decorrente de um efeito regulatório na ativação de macrófagos, visto que na linhagem macrofágica Raw 267.4, o bloqueio da atividade da MRP induziu uma redução na ativação destas células, através da diminuição da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Leite e col., 2007).

Outros aspectos do papel da MRP também foram abordados. Ao utilizar uma linhagem celular de timoma murino, EL-4 (CD4⁻CD8⁻), nós observamos que estas células expressam a MRP1. Quando esta proteína foi inibida, as células passaram a expressar as moléculas CD4 e CD8, sugerindo que a MRP tenha um papel na maturação de timócitos (ECHEVARRIA-LIMA, e col., 2005).

1.3. Envelhecimento

Existem evidências que com a idade ocorre um declínio gradual das funções do sistema imune, coagulação sangüínea e transporte de oxigênio. Mas essas mudanças não são devido à eliminação gradual das células tronco hematopoéticas (HSC), já que existe até um aumento das HSC com o envelhecimento. Estudos *in vitro* usando HSC isoladas mostraram que não existem diferenças entre células jovens e velhas, em termos da capacidade de formar colônias e seu potencial

proliferativo. Da mesma forma, não foi observado um declínio na capacidade das HSC em interagir com o estroma *in vitro* com o envelhecimento (revisado por RANDO, 2006).

No entanto, quando comparado à capacidade das HSC, de animais jovens ou senis, de repopular a medula óssea, é possível observar uma variação entre as estirpes de camundongos. As células dos animais da estirpe C57BL6 senis são mais eficientes em repopular a medula óssea do que as do jovem. Na estirpe CBA acontece o contrário, as células do jovem são mais eficientes em repopular a medula óssea do que as do senil (HARRINSON, 1983). Porém, uma porcentagem das HSCs oriundas dos animais senis podem apresentar uma reconstituição defeituosa, originando apenas células mielóides (SUDO e col., 2000).

O envelhecimento pode ocorrer em função de fatores intrínsecos (**Figura 6a**), como por exemplo: acúmulo de mutações no DNA, encurtamento do telômero, acúmulo de danos causados por estresse oxidativo ocasionando disfunção mitocondrial, danos em algumas proteínas citoplasmáticas, mudanças na afinidade receptor-ligante ou *turnover* do receptor; ou a fatores extrínsecos, como por exemplo: alterações no microambiente (**Figura 6b**) (GEIGER e VAN ZANT, 2002).

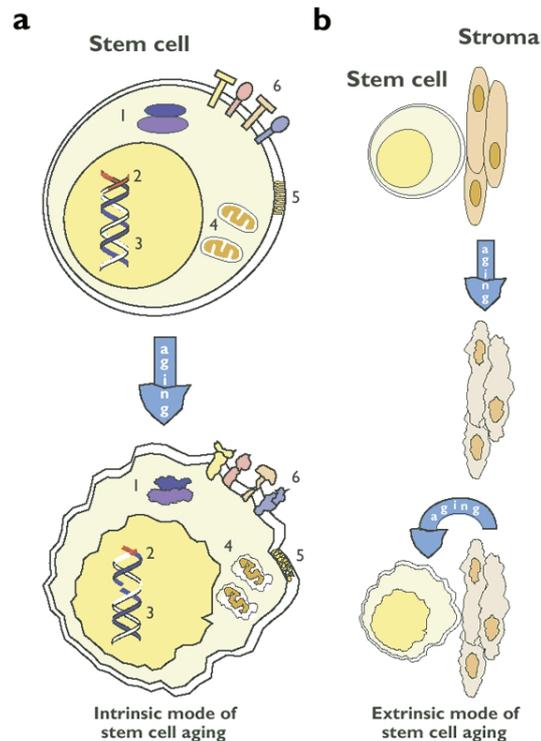


Figura 6. Modelos de envelhecimento das células tronco hematopoéticas. 6a. Modelo de envelhecimento intrínseco. 6b. Modelo de envelhecimento extrínseco. Figura retirada de GEIGER e VAN ZANT, 2002

Foi descrito que a expressão da Pgp aumenta durante a ontogenia e no envelhecimento nas células do baço, cérebro, fígado glândula adrenal, intestino, rim, testículos e ovário (SCHIENGOLD e col., 2001). Nas células do sistema imune, já foi mostrado que a expressão e a atividade da Pgp aumentam com o envelhecimento em linfócitos periféricos humanos (AGGARWAL e col., 1997) e em esplenócitos murinos (WITKOWSKI e col., 1993). Em relação às células tronco hematopoéticas, foi descrito um aumento da população que transporta rodamina (KIM e col., 1998).

Ao contrário da Pgp, pouco se sabe sobre a MRP1 no envelhecimento. Um estudo comparou a expressão da MRP1 no fígado, rim, coração, cérebro e pulmão em ratos, e não observou variações significativas desta proteína, apenas no rim e no fígado foi observada uma redução da expressão nos animais de oito meses

(ROSATI e col., 2003). A falta de informações sobre a expressão e a atividade da MRP1 e sua importância para as células do sistema imune, nos sugere que seja de extrema relevância um estudo sobre esta proteína durante o envelhecimento.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estudar a importância da Pgp e da MRP1 nas células progenitoras do sistema imune.

Objetivos específicos:

1. Investigar se as proteínas Pgp e MRP estão presentes e ativas nas células mononucleares da medula óssea (CMMO);
2. Caracterizar essas proteínas nas subpopulações de progenitores;
3. Investigar se existem diferenças na atividade das proteínas Pgp e MRP nas células mononucleares da medula óssea, entre animais jovens, adultos e senis;
4. Verificar o impacto do envelhecimento nas atividades dessas proteínas nas subpopulações das células mononucleares da medula óssea.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Soluções

3.1.1.1. Tampão Salina-Fosfato (PBS)

Reagente ^a	Concentração (g)	Procedência
NaCl	8,0	Merck
KCl	0,2	Reagen
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	1,15	Reagen
Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	0,2	Reagen

^a Reagentes solubilizados em 1l de água deionizada, pH 7,4.

3.1.1.2. Meio de Cultura de Células

Reagentes	Concentração	Procedência
RPMI-1640	10,4g/l	Sigma
Bicarbonato de sódio	2g/l	Reagen
HEPES	25mM	Sigma
Soro Fetal Bovino	100ml/l	Hyclone ou Gibco
Estreptomicina	10mg/l	Sigma
Penicilina	60mg/l	Sigma
β-mercaptoetanol	5μM	Sigma

A Todos os reagentes foram adicionados em 1L de água deionizada e filtrados por uma membrana de nitrocelulose 0.22μm (MILLIPORE). O pH foi ajustado para 7,2 - 7,4.

3.1.1.3. Solução de Lise

Foi usada FACS™ *Lysing Solution* (Becton & Dickinson) diluído 1:10 em água Milli-Q.

3.1.2. Reagentes

3.1.2.1. Iodeto de propídeo (PI)

Foi feita uma solução estoque de PI (Sigma) 10 mg/ml dissolvida em água deionizada e mantida a 4°C, sendo utilizada na concentração de 10 µg/ml.

3.1.2.2. Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

MTT 5mg/ml (Sigma) diluído em salina estéril e mantido a 4°C..

3. 1.2.3. Anticorpos

Foram utilizados os seguintes anticorpos, todos estocados a 4°C:

- anti-CD117 (c-kit), acoplado à molécula fluorescente Tricolor (TC - emissão em 679nm, BD Biosciences)
- anti-Ly-6 (Sca-1), acoplado à molécula fluorescente ficoeritrina (PE - emissão em 585nm, BD Biosciences)
- IgG rat Anti-MRP1(Alexis Biochemical)
- Anti-IgG rat conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC - emissão em 530nm, Sigma)

As partículas fluorescentes foram excitadas a 488nm.

3.1.2.4. Rodamina 123 (Rho 123)

Solução estoque de Rho 123 (Sigma) 1mg/ml dissolvida em solução salina e mantida a -20°C , sendo diluído em meio RPMI no momento do uso.

3.1.2.5. Fluo-3

Solução estoque de Fluo-3 (Alexis) 1mg/ml dissolvida em DMSO e mantida a -20°C , sendo diluído a em meio RPMI no momento do uso.

3.1.2.6. Reversores da atividade da Pgp

Reagentes	Concentração da solução estoque	Procedência
Ciclosporina A [#]	100 mg/ml	Novaquímica
Verapamil [*]	50 mM (diluída em H ₂ O)	Sigma

[#] Reagente mantido à temperatura ambiente. ^{*} Reagente mantido estocado a -20°C .

Todos os reagentes foram diluídos em meio RPMI sem soro para o seu uso.

3.1.2.7. Reversores da atividade da MRP

Reagentes	Concentração da solução estoque	Procedência
Indometacina*	30 mM (diluída em DMSO)	Sigma
MK 571*	50 mM (diluído em DMSO)	Alexis Biochemical
Probenecide#	100 mM (diluída em H ₂ O)	Sigma

* Reagentes mantidos estocados a -20°C. # Reagente foi mantido estocado a 4°C. Todos os reagentes foram diluídos em meio RPMI sem soro para o seu uso.

3.1.2.8. Histopaque 1083

Histopaque de densidade 1.083mg/ml (Sigma Aldrich)

3.1.3. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos machos ou fêmeas (de 3-4 semanas, 3 meses e 18 meses) da estirpe C57BL6. Todos os animais foram mantidos em nosso biotério com temperatura controlada, água e alimento à vontade. Para todos os experimentos, os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical.

3.2. Métodos

3.2.1. Isolamento das células mononucleares da medula óssea (CMMO)

A razão com que uma célula se movimenta em um meio quando uma força de centrifugação é aplicada, depende da densidade do meio e do tamanho e densidade da célula. As células hematopoéticas maduras variam em ambos os parâmetros. Devido a este fato, se torna possível remover determinados tipos de células maduras, como eritrócitos e granulócitos de uma suspensão de células hematopoéticas, através da centrifugação em um meio de densidade maior. Desta forma é possível enriquecer a população com células mais imaturas (revisado em THOMAS e col., 1999).

Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura estéreis retirou-se a pele e os músculos adjacentes ao fêmur e à tibia. As epífises ósseas foram cortadas, e a cavidade medular lavada com meio de cultura RPMI 1640, utilizando uma seringa colocada sobre um tubo. As células foram homogeneizadas, e em seguida centrifugadas a 200g durante 7 minutos. O sedimento de células foi ressuspendido em 3ml de meio RPMI, e em seguida adicionou-se cuidadosamente sobre 3ml de Histopaque 1083. A seguir, as células foram centrifugadas a 400g durante 30 minutos. O anel de células formado na interface após a centrifugação foi coletado, pois nele estão contidas as células mononucleares da medula óssea (CMMO). As células foram ressuspendidas em solução salina e lavadas três vezes, centriugando-as 200g por 7 minutos. Após a centrifugação as células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino.

3.2.2. MTT

A viabilidade celular foi avaliada através da adição de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; SIGMA), dissolvido em salina 5mg/ml e mantido a 4°C. O ensaio do MTT se baseia na formação de cristais de formazana, oriundos da clivagem do sal de tetrazolium pelas desidrogenases mitocondriais presentes nas células viáveis.

As células mononucleares da medula óssea (5×10^5 células/ml) foram colocadas em uma placa de 96 poços, com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino na presença ou ausência de substâncias de interesse, em um volume final de 180µl. Os pontos foram feitos em triplicata. As células permaneceram em cultura por 48h a 37°C e em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, foi colocado 20µl de MTT e a placa mantida em estufa e protegida da luz. Após 3h, as células foram centrifugadas a 200g por 7 minutos, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 200µl de DMSO para dissolver os cristais. Os cristais dissolvidos foram avaliados por colorimetria a 490nm.

3.2.3. Efluxo de corantes fluorescentes

3.2.3.1. Atividade relacionada a Pgp

As células mononucleares da medula óssea (5×10^5) foram colocadas em uma placa de 96 poços com fundo em U, e incubadas com ou sem o substrato fluorescente rodamina 123 (200 ng/ml - Rho 123) em placa de 96 poços, com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, na presença ou na ausência dos seus reversores: ciclosporina A (0,1; 0,5; e 1,0 µM) ou verapamil (5; 10; e 50 µM) por 30 minutos a 37 °C, num volume final de 100µl. Após este período

as células foram lavadas, adicionando-se 100µl de solução salina, e centrifugando-as a 200g por 7 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células ressuspendido com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, com ou sem os reversores, num volume final de 100µl. As células permaneceram por 90 minutos a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, as células foram lavadas adicionando-se 100µl de solução salina, e centrifugando-as a 200g por 7 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células ressuspendido em 200µl PBS, as células foram transferidas para microtubos e mantidas no gelo até o momento de serem analisadas no citômetro de fluxo.

3.2.3.2. Atividade relacionada a MRP

As células (5×10^5) foram colocadas em uma placa de 96 poços com fundo em U, e incubadas com o substrato Fluo-3 (5µg/ml), em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, na presença ou na ausência dos seus reversores: indometacina (75, 150 e 300µM), probenicida (100; 500 e 1000µM) e MK571 (12,5, 25 e 50µM) por 30 minutos a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ num volume final de 100µl. Após este período as células foram lavadas, adicionando-se 100µl de solução salina, e centrifugando-as a 200g por 7 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células ressuspendido com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, com ou sem os reversores, num volume final de 100µl. As células permaneceram por 90 minutos a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, as células foram lavadas adicionando-se 100µl de solução salina, e centrifugando-as a 200g por 7 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células

ressuspendido em 200µl PBS, as células foram transferidas para microtubos, e mantidas no gelo até o momento de serem analisadas no citômetro de fluxo.

Tanto a atividade relacionada a Pgp quanto a MRP foram avaliadas pela aquisição de células através do uso de um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton & Dickinson). As amostras foram excitadas a 488 nm usando um laser de argônio, e a emissão de fluorescência foi detectada a 530 nm (FL-1). Dez mil células foram adquiridas baseadas no tamanho e granulosidade. Todas as análises dos resultados obtidos pela citometria de fluxo foram feitas usando o programa WinMDI versão 2.8.

3.2.4. Marcação das moléculas de superfície celular

3.2.4.1. Identificação dos progenitores

As sub-populações dos progenitores hematopoéticos foram identificadas através da marcação das moléculas c-kit e Sca-1 com anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos diferentes.

Após o ensaio de atividade das proteínas, mas antes de ressuspendê-las, as células foram incubadas na mesma placa, com os anticorpos, c-kit-TC diluído 1:200 e Sca-1-PE diluído 1:50, em um volume final de 30µl, a 4°C por 30 minutos. Os anticorpos foram diluídos com PBS acrescido de 5% de soro fetal bovino. Após este período, as células foram lavadas adicionando-se 170µl de solução salina, e centrifugando-as a 200g por 7 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células ressuspendido em 200µl PBS. As células foram transferidas para microtubos, e mantidas no gelo até serem analisadas no citômetro de fluxo. As amostras foram excitadas a 488 nm usando um laser de

argônio, e a emissão de fluorescência foi detectada a 530nm (FL-1), 585nm (FL-2) e 679nm (FL-3).

3.2.4.2. Marcação da MRP1

Para a marcação da MRP1, 1×10^6 células foram colocadas em uma placa de 96 poços com fundo em U e centrifugadas. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento de células foram adicionados 100µl de solução de lise (B&D) diluída 10 vezes, por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir a permeabilização. Em seguida as células foram lavadas adicionando-se 100µl de solução salina, e centrifugas a 200g por 7 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado ao sedimento de células 50µl do anticorpo primário anti-MRP1 (feito em rato), diluído 1:80. As células permaneceram com este anticorpo por 30 minutos a temperatura ambiente. Então as células foram lavadas adicionando-se 150µl de solução salina, e centrifugas a 200g por 7 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células incubado com 50µl do anticorpo secundário anti-IgG de rato acoplado à FITC, diluído 1:200, por 30 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. Após este período, as células foram lavadas adicionando-se 150µl de solução salina, e centrifugas a 200g por 7 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células ressuspendido em 200µl PBS, as células foram transferidas para microtubos, e mantidas no gelo até o momento de serem analisadas no citômetro de fluxo. As amostras foram excitadas a 488 nm usando um laser de argônio, e a emissão de fluorescência foi detectada a 530nm (FL-1).

3.2.5. Análises estatísticas

Foi realizado um teste de análise de variância (ANOVA) seguido dos pós testes de Bonferroni ou Dunnett. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Pgp e as células mononucleares da medula óssea

4.1.1. Atividade relacionada a Pgp

Diversos trabalhos descreveram a presença da glicoproteína P (Pgp) nas células tronco (CHAUDHARY e RONINSON, 1991; GOODELL e col., 1996; BUTING e col., 2000). A fim de estudar a atividade desta proteína no nosso modelo, utilizamos a extrusão do substrato fluorescente da Pgp, a rodamina 123 (Rho) (NEYFAKH e col., 1988), como indicador da funcionalidade desta proteína.

A rodamina 123 se difunde para dentro da célula se ligando à mitocôndria de células viáveis. As células em Rho^{neg} podem ser células mortas ou células quiescentes, com baixa atividade mitocondrial; ou células capazes de realizar a extrusão do corante. Para excluirmos a possibilidade de serem células mortas, utilizamos o iodeto de propídeo, um corante fluorescente e intercalante de DNA. As células viáveis são impermeáveis ao iodeto de propídeo, logo, sua entrada na célula indica a perda da integridade da membrana plasmática. Foi feito um ensaio de viabilidade celular com o iodeto de propídeo, e as células mortas formaram a região R1 (**Figura 7A**). Em seguida, identificamos no gráfico de tamanho por granulosidade as células mortas que formaram a região R2 (**Figura 7B**). Essas células foram excluídas das análises subsequentes.

A atividade da Pgp nas células mononucleares da medula óssea foi avaliada incubando-se as células na presença ou ausência de Rho, com ou sem os inibidores desta proteína: verapamil (VP) e ciclosporina A (CSA), em diferentes concentrações. O gráfico de intensidade de fluorescência versus granulosidade possibilitou a observação de uma região que contém as células que não acumulam Rho, cuja

fluorescência se iguala à auto-fluorescência das células, esta população foi chamada de Rho^{neg} (**Figura 7C**).

A região Rho^{neg} representa cerca de 4% das CMMO. Foi possível comprovar que a população de células Rho^{neg} corresponde a células com atividade da Pgp, pois quando as mesmas foram incubadas com os inibidores CSA e VP foi observada uma diminuição da população nesta região (**Figura 7C e 8**). O bloqueio da Pgp impediu as células de realizar a extrusão do corante, aumentando a intensidade fluorescência. Este resultado indica a presença de atividade da Pgp nestas células. Em todas as concentrações testadas, observou-se a modulação da Pgp pelos seus inibidores. O verapamil promoveu uma inibição concentração-dependente, enquanto que a CSA inibiu igualmente a atividade da Pgp em todas as concentrações testadas (**Figura 7C e 8**).

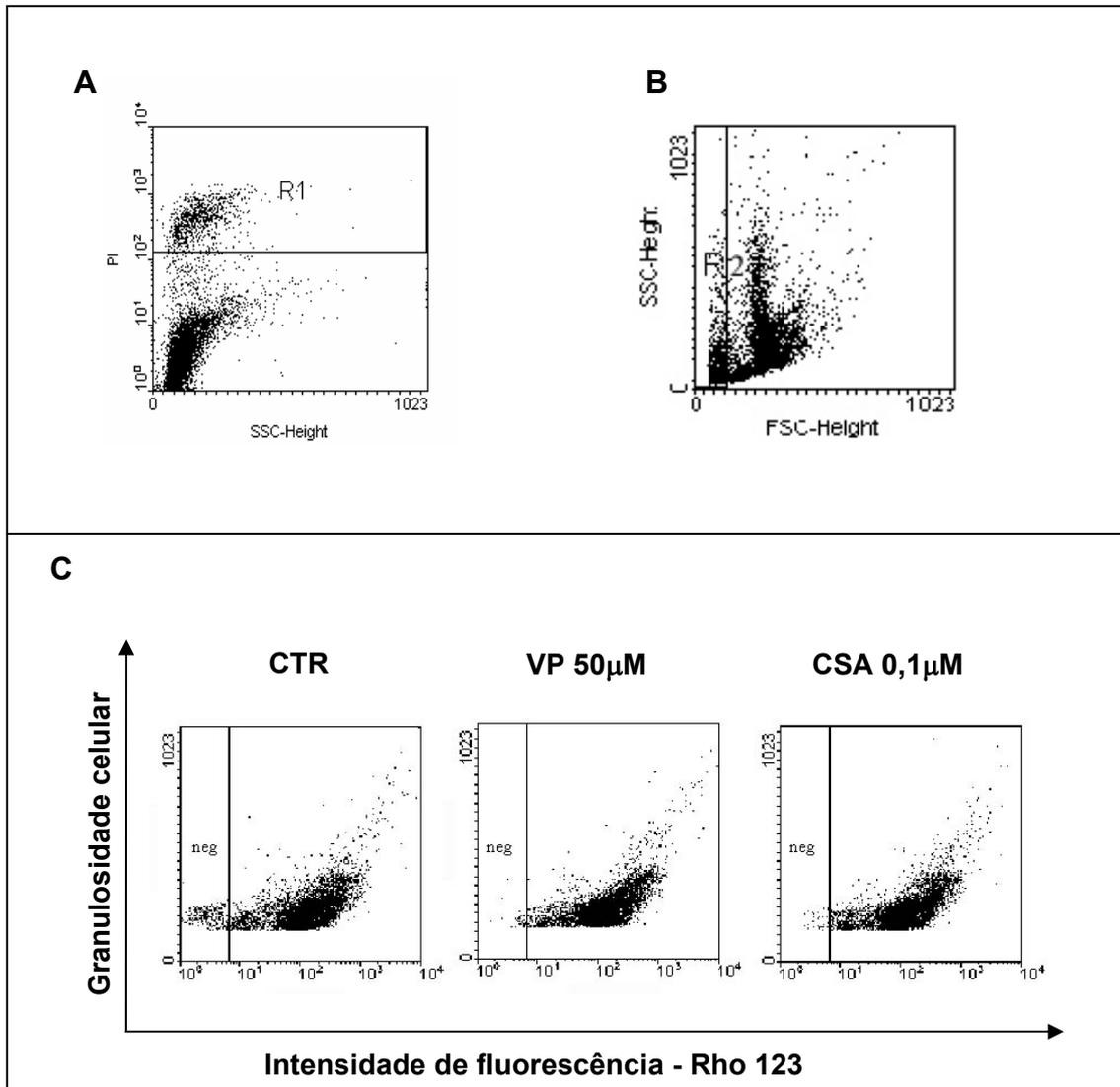


Figura 7. Atividade da Pgp nas CMMO. As CMMO foram incubadas com rodamina 123 (200ng/ml - Rho), com ou sem os inibidores da Pgp (ciclosporina A – CSA e verapamil - VP) por 30 minutos a 37°C. Após este período as células foram lavadas e incubadas com e sem os inibidores de Pgp por mais 90 minutos a 37°C. As células foram lavadas e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo. O de iodeto de propídeo (PI) (10µg/ml) foi adicionado no momento da leitura no citômetro. **A.** Dot Plot indicando a intensidade de fluorescência do PI (PI) *versus* a granulosidade (SSC) das CMMO. A região R1 contém as células que marcaram para o PI, ou seja, células mortas. **B.** Dot Plot indicando o tamanho (FSC) *versus* a granulosidade (SSC) das CMMO, onde R1 representa a região contendo células mortas. **C.** CTR são as células incubadas com Rho 123. VP e CSA representam as células incubadas com Rho 123 na presença dos inibidores da Pgp: VP na concentração de 50µM, e CSA, na concentração de 0,1µM. Esta figura é representativa de 3 experimentos diferentes

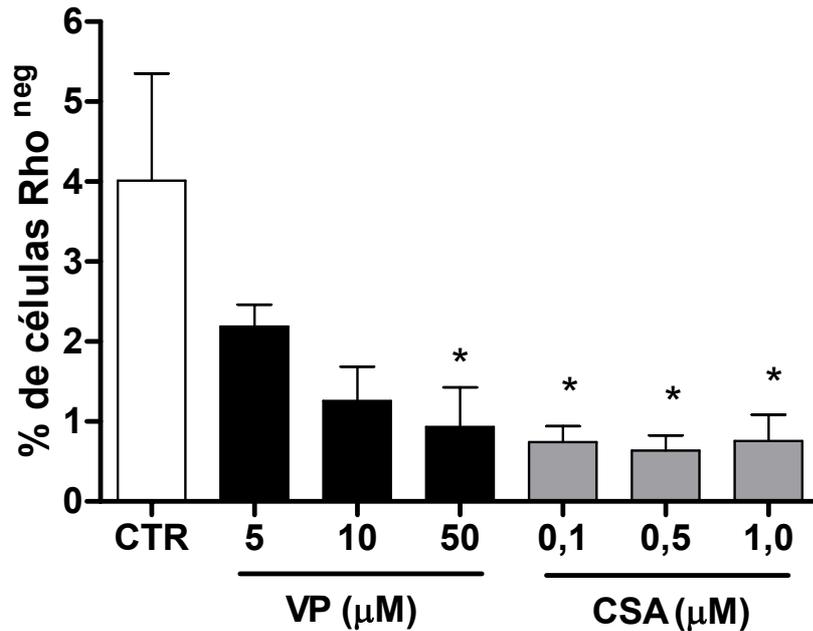


Figura 8. Curva de concentração dos inibidores da Pgp. Foi avaliado o percentual de células em R2. CTR são as células controle incubadas com Rho 123. VP (Verapamil) e CSA representam as células incubadas com Rho 123 na presença dos inibidores da Pgp, VP (5, 10 e 50 μ M) e CSA (0,1; 0,5 e 1,0 μ M). Gráfico da média entre 3 experimentos diferentes. O resultado está expresso como média \pm desvio padrão. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$ (*) quando comparado ao controle.

4.1.2. Viabilidade das CMMO na presença dos inibidores da Pgp

Verificamos se a presença da atividade da Pgp era importante para a manutenção da viabilidade celular. Apesar de apenas uma pequena população possuir atividade Pgp, os fatores por ela secretados poderiam regular a viabilidade das células adjacentes. Também nos questionamos se os inibidores da Pgp, VP e CSA, seriam capazes de alterar a viabilidade das CMMO nas concentrações utilizadas. Para isso, as células foram incubadas com ou sem os inibidores e após 48 horas a viabilidade foi aferida através do ensaio colorimétrico MTT. Foi observado que apenas na presença da maior concentração de CSA houve uma diminuição da viabilidade, e ainda assim 64% das células permaneceram viáveis (**Figura 9**). A partir deste resultado foram escolhidas as concentrações para os demais

experimentos. Estes resultados sugerem que a atividade da Pgp não é essencial para a sobrevivência das células mononucleares da medula óssea e seus inibidores não são capazes de comprometer a viabilidade destas células.

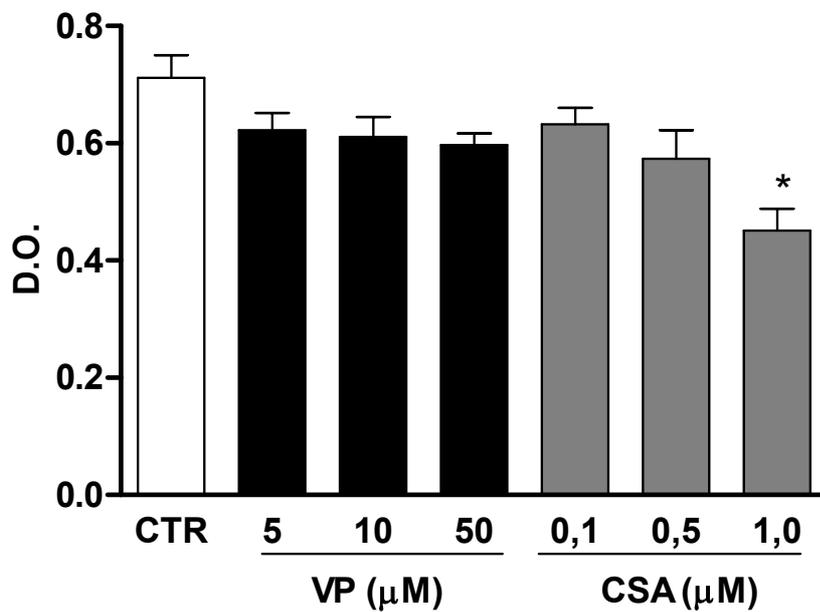


Figura 9. Viabilidade das CMMO na presença dos inibidores da Pgp. As CMMO foram incubadas com os inibidores da Pgp, verapamil e ciclosporina, por 48 horas a 37°C. VP células incubadas com verapamil nas concentrações de 5 - 50µM. CSA células incubadas com ciclosporina A nas concentrações de 0,1 - 1,0µM. Viabilidade medida por MTT. Gráfico da média entre três experimentos diferentes. O resultado está expresso como média ± desvio padrão. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$ (*) quando comparado ao controle.

4.2. MRP1 e as células mononucleares da medula óssea

4.2.1. Expressão da MRP1 nas CMMO

A MRP1 já foi descrita em linfócitos maduros (LEGRAND e col., 1996), em células hematopoéticas do sangue periférico (LAUPEZE e col., 2001), células dendríticas (ROBBIANE e col., 2000) e por nosso grupo em timócitos murinos (LEITE e col., 2006). Assim, fomos investigar a expressão desta proteína nas células mononucleares da medula óssea (CMMO) de camundongos. O nível de expressão da MRP1 foi determinado por citometria de fluxo usando um anticorpo anti-MRP1 (**Figura 10**). Em três experimentos, foi observado que $51,3 \pm 4,2\%$ das CMMO eram positivas para MRP1.

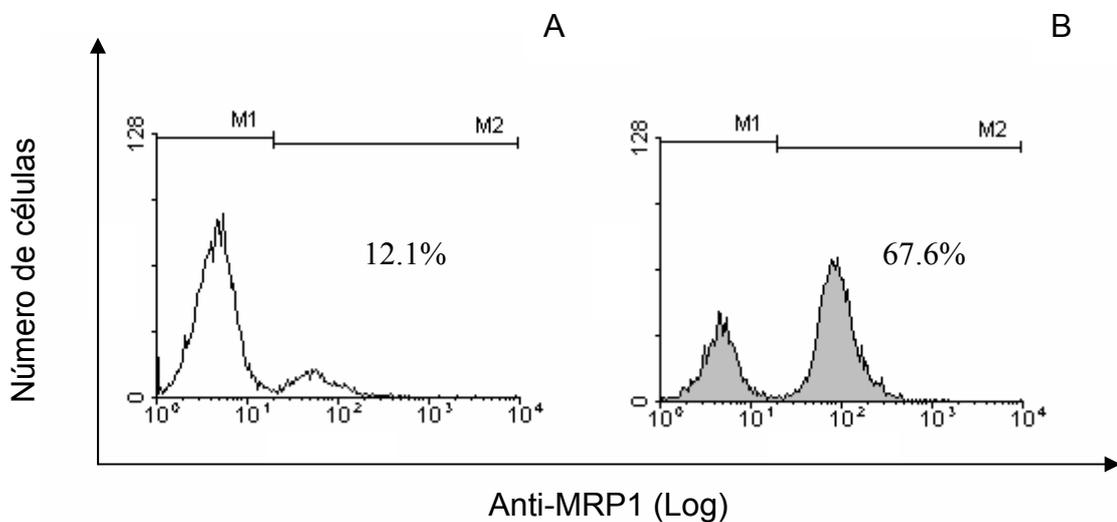


Figura 10. Expressão da MRP1 nas células mononucleares da medula óssea. (A) células marcadas apenas com o anticorpo secundário (anticorpo anti-IgG de rato acoplado a FITC). (B) células marcadas com IgG de rato anti-MRP1 e em seguida as células foram marcadas com anticorpo secundário. M1 indica a região de autofluorescência, M2 indica a região marcada. Figura representativa de 3 experimentos diferentes.

4.2.2. Atividade MRP nas CMMO

Para verificar se a MRP1, presente em aproximadamente 50% das CMMO, estava ativa, foi realizado um ensaio que avalia a capacidade de extrusão deste transportador. Para tal, utilizamos o ânion fluorescente Fluo-3, que como mencionado anteriormente é um substrato da MRP1 (PRECHTL e col., 2000).

As células foram incubadas na presença ou ausência de Fluo-3, com ou sem os inibidores da MRP: indometacina (INDO 75 - 300 μ M), probenecide (PRB 500 - 2500 μ M) e MK571 (MK 12,5 - 50 μ M). Após a incubação com o Fluo-3 pode ser observado que existem duas populações, uma com maior intensidade de fluorescência, e outra com intensidade de fluorescência relativamente baixa (**Figura 11**), mostrando que estas células possuem a capacidade de transportar o Fluo-3. Baseado na fluorescência observada nas células incubadas com Fluo-3 foram definidas duas regiões, M1 e M2, onde a região M2 mostra maior retenção do corante no meio intracelular. Na presença dos inibidores há um aumento da intensidade de fluorescência e no percentual de células na região M2, sugerindo que as células mononucleares da medula óssea murinas apresentam atividade relacionada a MRP (**Figura 11 B-D**).

Os inibidores da MRP foram capazes de reverter a atividade de forma concentração dependente (**Figura 12**), com uma diminuição consistente no número de células em M1, que foram caracterizadas como Fluo-3^{low}. Estes resultados demonstram que em torno de 50% das CMMO possuem a MRP1 ativa.

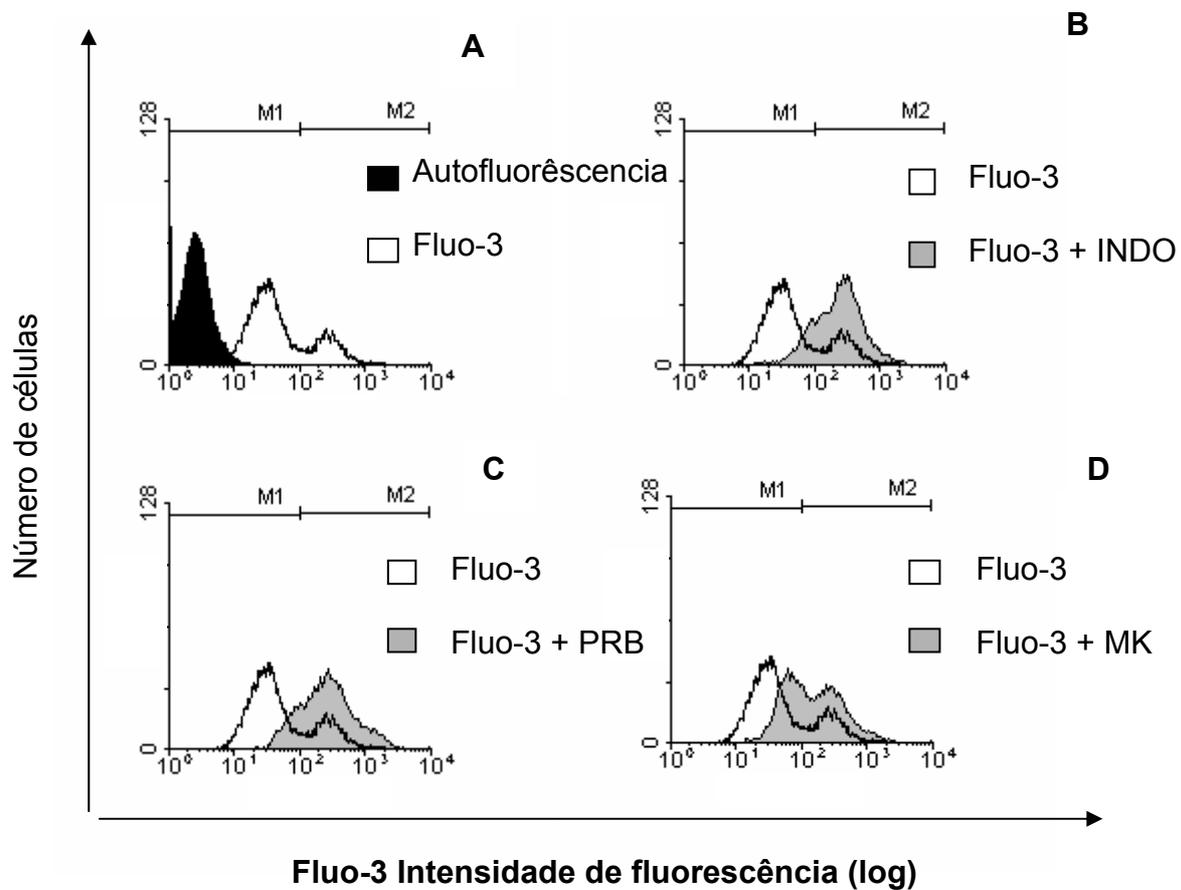


Figura 11. Atividade relacionada a MRP nas CMMO. As CMMO foram incubadas na presença ou ausência do Fluo-3 (5 μ g/ml), com ou sem os inibidores da MRP: INDO – Indometacina (75 μ M), PRB - Probenicida (1000 μ M) e MK – MK571 (25 μ M) por 30 minutos a 37°C. Após este período as células foram lavadas e incubadas com ou sem os inibidores da MRP por mais 90 minutos a 37°C. As células foram lavadas e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo. Foram analisadas as células viáveis, baseado na incorporação do iodeto de propídeo (10 μ g/ml). O histograma preto representa a autofluorescência, células que não foram incubadas com o corante. O histograma aberto são as células incubadas apenas com Fluo-3, e em cinza, células incubadas com Fluo-3 e com os inibidores. Figura representativa de 4 experimentos diferentes.

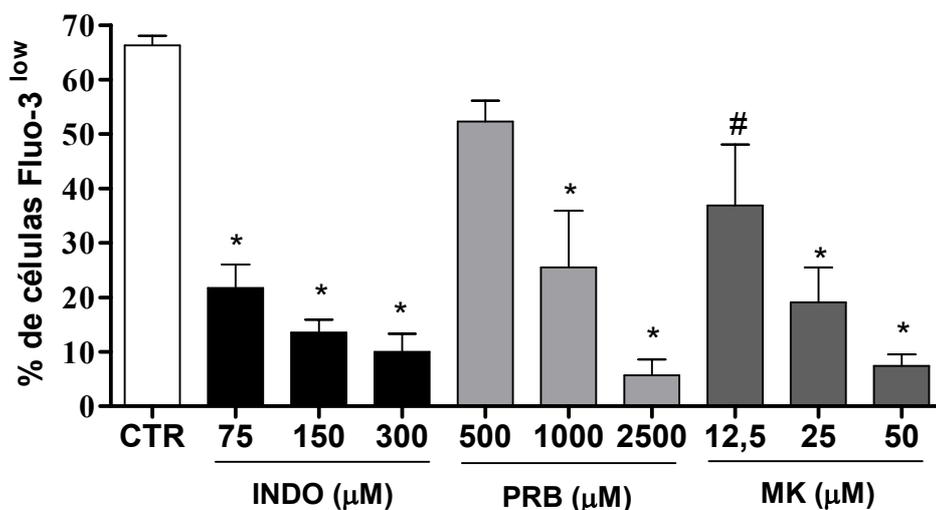


Figura 12. Curva de concentração dos inibidores da MRP. Foi avaliado o percentual de células em M2. CTR são as células controle incubadas apenas com Fluo-3 com Rho 123. INDO – Indometacina, PRB - Probenicida e MK – MK571 representam as células incubadas com Fluo-3 na presença dos inibidores da MRP, INDO (75, 150 e 300μM), PRB (500, 100 e 2500 μM) e MK (12,5, 25 e 50μM). Gráfico da média entre 4 experimentos diferentes. O resultado está expresso como média \pm desvio padrão. Foi considerado estatisticamente significativo (*) $p < 0,01$, e (#) $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

4.2.3. Atividade MRP1 e viabilidade celular

Para investigar se a presença da MRP1 ativa era importante para a manutenção da viabilidade das células mononucleares da medula óssea (CMMO), as células foram mantidas em cultura na presença ou ausência dos inibidores da MRP, indometacina, probenicida e MK571. Assim, as CMMO foram incubadas com os inibidores em diferentes concentrações e a viabilidade foi testada através do ensaio colorimétrico MTT. Foi observado que os inibidores alteravam a viabilidade nas maiores concentrações analisadas (**Figura 13**), mas nas concentrações menores, onde há inibição de 80% da atividade relacionada a MRP, a viabilidade não foi alterada, sugerindo que a presença da MRP1 ativa não é essencial para a sobrevivência das células. A partir deste resultado foram escolhidas as concentrações utilizadas nos demais experimentos, indometacina 75μM e MK 25μM.

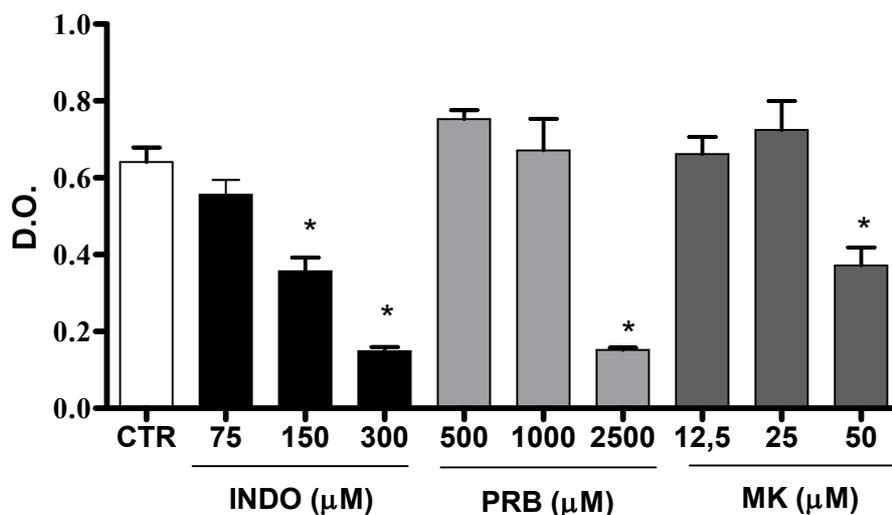


Figura 13. Viabilidade das CMMO na presença dos inibidores da MRP. 5×10^5 CMMO foram incubadas por 48 h a 37°C com os inibidores da MRP: INDO – Indometacina (75, 150 e $300\mu\text{M}$), PRB - Probenicida (500, 100 e $2500\mu\text{M}$) e MK – MK571 (12,5, 25 e $50\mu\text{M}$). A viabilidade foi medida por MTT. Gráfico da média entre três experimentos diferentes. O resultado está expresso como média \pm desvio padrão. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$ (*) quando comparado ao controle.

4.3. Progenitores da medula óssea e as proteínas Pgp e MRP

Os progenitores da medula óssea podem ser caracterizados a partir da expressão de algumas moléculas de superfície e pela falta de expressão de outras. Ainda não foi descrita uma única molécula que estivesse presente apenas nestas células, e por isso existem muitas caracterizações diferentes para células progenitoras. As moléculas mais utilizadas até hoje são as proteínas de membrana c-kit e Sca-1 (SPANGRUDE e col., 1988 e OKADA e col., 1991).

Para conhecer a distribuição dessas subpopulações no nosso modelo, as CMMO foram marcadas com anticorpos fluorescentes anti-c-kit-TC e anti-Sca-1-PE. Nós encontramos que dentre as células mononucleares da medula óssea de camundongos C57BL6 adultos, cerca de 14% expressam estas proteínas, sendo $9,30 \pm 2,0\%$ c-kit⁻Sca-1⁺, $4,19 \pm 0,7\%$ c-kit⁺Sca-1⁻ e $0,89 \pm 0,4$ c-kit⁺Sca-1⁺ (**Figura**

14). Como mencionado na introdução, o Sca-1 é re-expresso nas células maduras, logo a subpopulação c-kit⁺Sca-1⁺ pode conter um percentual de células maduras.

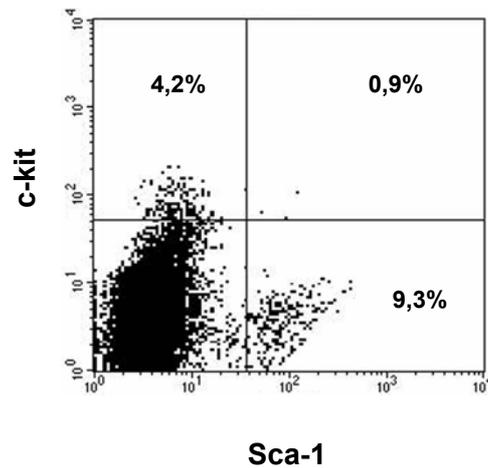


Figura 14. Distribuição das subpopulações de células progenitoras nas CMMO. As CMMO foram incubadas com os anticorpos anti-ckit-TC e anti-Sca-1-PE a 4°C por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas e a fluorescência medida por citometria de fluxo. O quadrante apresentado na figura foi elaborado a partir da região de alta fluorescência da molécula c-kit. Figura representativa de 5 experimentos.

A expressão da Pgp já foi descrita em células tronco hematopoéticas, sugerindo que a atividade da bomba de efluxo poderia ser responsável pela baixa retenção de Rho 123 neste subgrupo de células indiferenciadas (CHAUDHARY e RONINSON, 1991), porém pouco se sabe sobre a MRP nessas células. Como demonstramos que 50% das células mononucleares da medula óssea expressam e possuem atividade para MRP, julgamos de grande importância investigar se as células progenitoras da medula óssea apresentavam atividade relacionada a MRP, já que a medula óssea é um órgão linfóide primário responsável pela hematopoese. Investigamos também a presença da Pgp nas subpopulações de progenitores da medula óssea.

Para estudar essas proteínas nas células progenitoras da medula óssea, foi realizado o ensaio de atividade da Pgp e da MRP, utilizando os substratos Rho 123 e Fluo-3, respectivamente, e em seguida as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes anti-c-kit-TC e anti-Sca-1-PE. A inclusão desta etapa para a identificação das proteínas c-kit e Sca-1 não alterou o percentual de células com atividade Pgp e MRP.

Nós observamos que dentro das células que tinham atividade Pgp, ou seja, dentre as células Rho^{neg}, 35% expressam c-kit e/ou Sca-1. Ao analisarmos a atividade Pgp dentro das subpopulações, observamos que dentre as subpopulações c-kit⁺Sca-1⁻ e c-kit⁺Sca-1⁺ existe uma atividade muito pequena para esta proteína, enquanto $21,36 \pm 6,83\%$ das células c-kit⁻Sca-1⁺, apresentam atividade relacionada a Pgp (**Figura 15 A**).

No entanto, observamos que dentro das células que tinham atividade MRP, ou seja, dentre as células Fluo-3^{low}, apenas 14% expressavam c-kit e/ou Sca-1. Para melhor avaliarmos esta distribuição, nós analisamos o percentual de células dentro das subpopulações que apresentam atividade relacionada a MRP. E verificamos que $82,52 \pm 5,3\%$ da subpopulação c-kit⁺Sca-1⁻ apresentava atividade MRP, enquanto $38,81 \pm 12,5\%$ das células c-kit⁻Sca-1⁺ e $54,14 \pm 4,5\%$ c-kit⁺Sca-1⁺, possuíam esta proteína ativa (**Figura 15 B**).

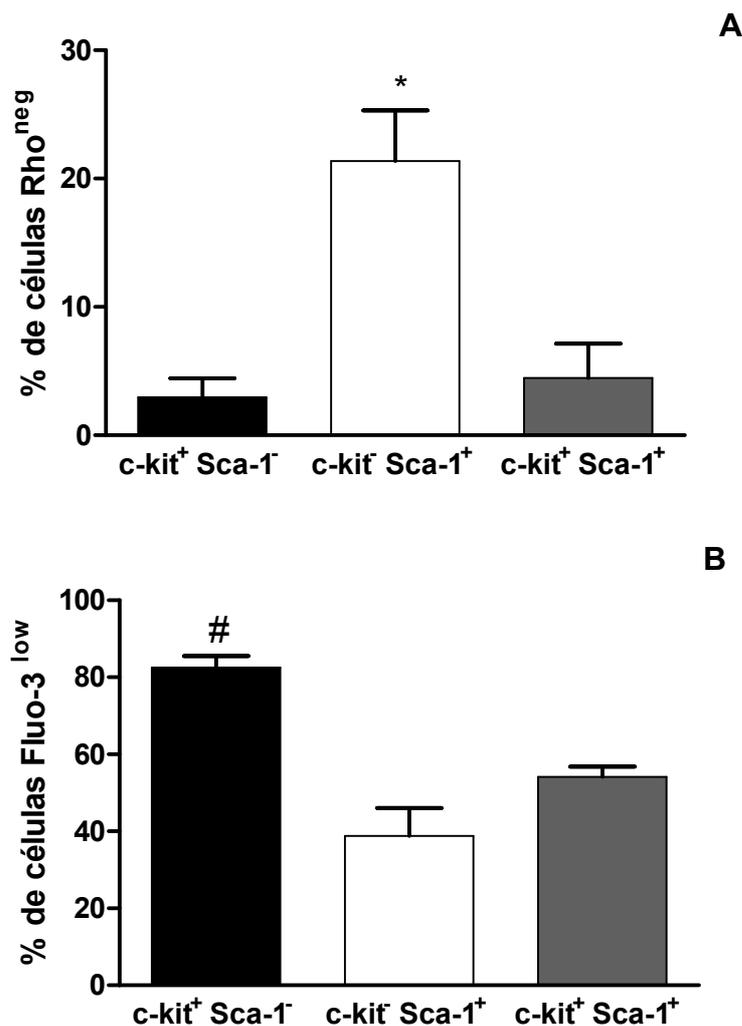


Figura 15. Atividade Pgp e MRP nos progenitores. Foi realizado o ensaio de atividade das proteínas Pgp e MRP, e em seguida as CMMO foram marcadas com os anticorpos anti-ckit-TC e anti-Sca-1-PE a 4°C, as células foram lavadas e então analisadas por citometria de fluxo. **(A) Atividade da Pgp.** As barras representam o percentual de células que extruíram Rho, ou seja, células que possuem Pgp ativa, nas subpopulações indicadas. **(B) Atividade da MRP.** As barras representam o percentual de células que extruíram Fluo-3, ou seja, células que possuem MRP ativa nas subpopulações indicadas. Preto - subpopulação c-kit⁺Sca-1⁻, branco - subpopulação c-kit⁻Sca-1⁺ e cinza - subpopulação c-kit⁺Sca-1⁺ Gráfico da média entre três experimentos diferentes. O resultado está expresso como média \pm desvio padrão. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) no grupo c-kit⁻Sca-1⁺ quando comparado com os grupos c-kit⁺Sca-1⁻ e c-kit⁺Sca-1⁺. (#) indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo c-kit⁺Sca-1⁻ quando comparado com o grupo c-kit⁻Sca-1⁺ ($p < 0,01$) e ao grupo c-kit⁺Sca-1⁺. ($p < 0,05$).

4.4. Pgp e MRP e envelhecimento

O envelhecimento traz algumas mudanças no sistema imune, como o declínio progressivo da resposta humoral e celular, e alterações na hematopoese (DE HAAN e col., 1997; SUDO e col., 2000). Existe ainda uma grande discussão se as células tronco sofrem o processo de envelhecimento e se este é intrínseco, dependente de fatores genéticos, ou se está relacionado com alterações no microambiente (GEIGER e VAN ZANT, 2002).

Os produtos fisiológicos secretados pelas proteínas transportadoras como a Pgp e a MRP1, também parecem estar envolvidos com a resposta imune e a maturação das células do sistema imune (MULLER e col., 1994; PAWLIK e col., 2005, ECHEVARRIA-LIMA e col., 2005). Como o envelhecimento é um processo fisiológico, ele pode estar relacionado com as proteínas de nosso interesse. Além disso, já foi descrito que a expressão e a atividade da Pgp apresentam variações durante a ontogenia e o envelhecimento (PILARSKI e col., 1995; AGGARWAL e col., 1997; SCHIENGOLD e col., 2001).

4.4.1. Atividade da Pgp no envelhecimento

A fim de investigar se existe diferença entre animais jovens e senis, com relação à presença e atividade da Pgp nas células mononucleares da medula óssea, foi realizado o ensaio de extrusão de rodamina 123, utilizando animais jovens (3 - 4 semanas), adultos (3 meses) e senis (18 meses).

O gráfico de intensidade de fluorescência versus granulosidade possibilitou a observação de uma região que contém as células que não acumulam Rho (Rho^{neg}), as células mortas foram retiradas como explicado anteriormente. Podemos observar no gráfico controle (CTR), que são as células incubadas apenas com Rho, que esta

população aumenta gradativamente com o envelhecimento (**Figura 16**). Ao serem incubadas na presença dos inibidores da Pgp, esta população diminui nos três grupos igualmente (**Figura 16**). Ao quantificar esta população graficamente, observamos que 2,5%, 4,2% e 7,3% das células dos animais jovens, adultos e senis, respectivamente, apresentaram atividade para a Pgp (**Figura 17**). Estes valores mostram, que nas CMMO, a população de células com atividade da Pgp aumenta gradativamente com o envelhecimento.

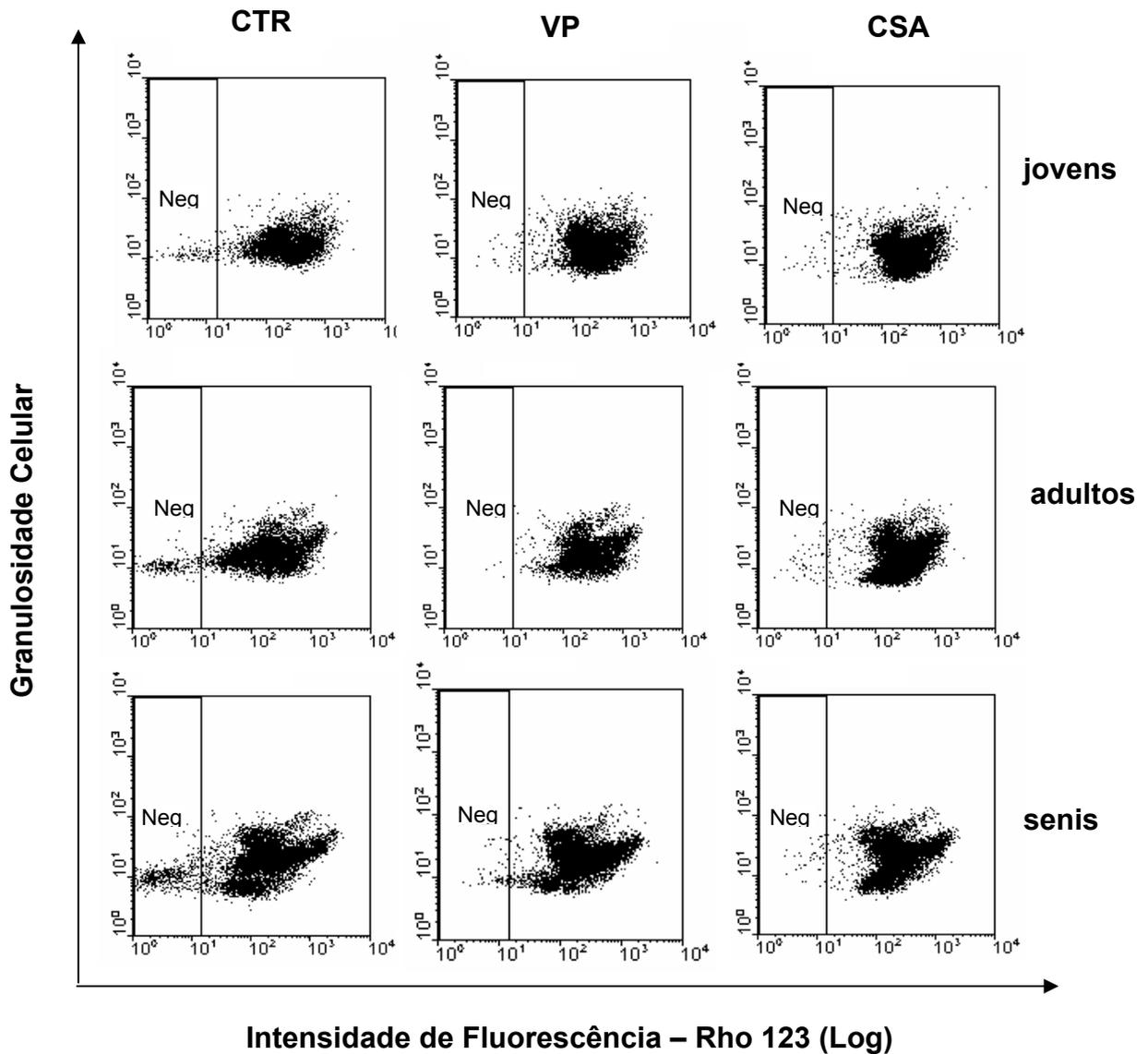


Figura 16. Atividade da Pgp nas CMMO durante o envelhecimento. As CMMO foram obtidas a partir da medula óssea de camundongos jovens, (3-4) semanas, adultos (3 meses) e senis (18 meses). As células foram incubadas com Rho (200ng/ml), com ou sem os inibidores da Pgp: CSA – Ciclosporina A (0,1 μ M) e VP – Verapamil (50 μ M). CTR – Controle, representa as células incubadas apenas com Rho 123. Figura representativa de 5 experimentos diferentes.

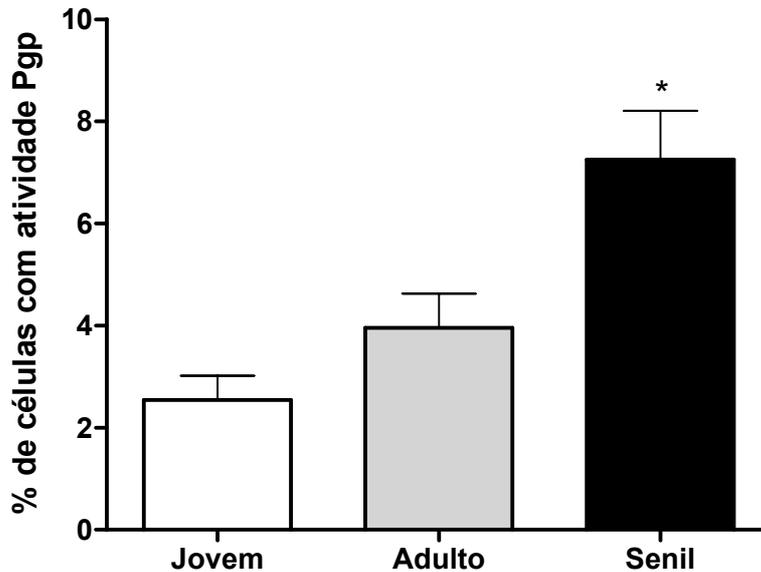


Figura 17: Atividade da Pgp em animais jovens, adultos e senis. As CMMO foram obtidas a partir da medula óssea de camundongos jovens, (3-4) semanas, adultos (3 meses) e senis (18 meses). As células foram incubadas com Rho (200ng/ml), com ou sem os inibidores da Pgp: CSA – Ciclosporina A (0,1 μ M) e VP - Verapamil (50 μ M). As barras representam o percentual de células com atividade Pgp. Gráfico da média entre 5 experimentos diferentes. O resultado está expresso como média \pm desvio padrão. Foi considerado estatisticamente significativo * $p < 0,01$, o grupo senil em relação ao jovem e adulto.

4.4.2. Expressão da MRP1 no envelhecimento

Ao contrário da Pgp, pouco se sabe sobre a MRP1 no envelhecimento, e nada foi descrito nas células hematopoéticas.

Assim, fomos estudar a expressão e a atividade da MRP1 durante o envelhecimento. Para isto investigamos a expressão desta proteína nas CMMO de camundongos C57BL6 machos de diferentes idades, 3 – 4 semanas (jovem), 3 meses (adulto) e 18 meses (senil). O nível de expressão da MRP1 foi determinado por citometria de fluxo usando o anticorpo contra esta proteína. Foi observado um aumento na média de intensidade de fluorescência (MIF) nas células marcadas com anti-MRP1 nos animais adultos e senis em relação aos jovens (**Figura 18**).

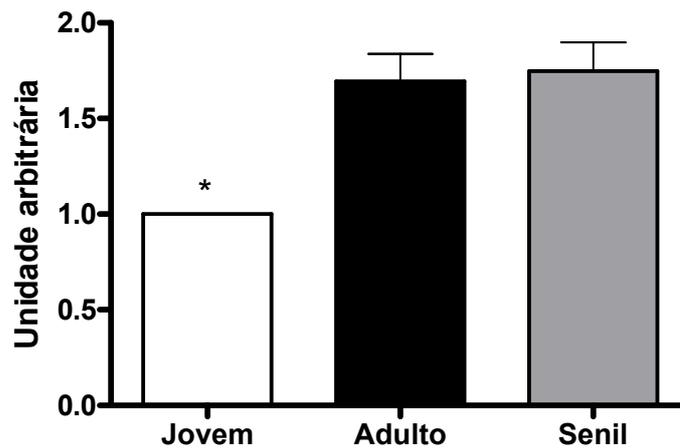


Figura 18. Expressão da MRP1 nas CMMO durante o envelhecimento. As CMMO foram marcadas com o anticorpo anti-MRP1 por 30 minutos, em seguida foram lavadas e marcadas com o anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado a molécula fluorescente FITC. Após 20 minutos a temperatura ambiente as células foram lavadas e em seguida analisadas por citometria de fluxo. Os valores da média de intensidade de fluorescência obtidos com o grupo jovem foram considerados 1 em cada experimento, e os valores obtidos no animal adulto e senil no mesmo dia experimental foram expressos como a razão entre adulto e jovem ou senil e jovem. Gráfico da média entre três experimentos diferentes. O resultado está expresso como média \pm desvio padrão. Foi considerado estatisticamente significativo * $p < 0,05$, o grupo jovem em relação ao adulto e ao senil.

4.4.3. Atividade MRP no envelhecimento

Tendo sido observado um aumento nos níveis de expressão da MRP1 com o envelhecimento, verificamos se esta elevação seria traduzida em um aumento da atividade da mesma. Para isso, realizamos o ensaio de atividade para MRP com o substrato fluorescente Fluo-3 e os seus inibidores.

O gráfico de intensidade de fluorescência versus granulosidade possibilita a observação de uma região que contém as células que acumulam pouco Fluo-3, denominada Fluo-3^{low} (R2), as células mortas também foram retiradas como explicado anteriormente. Observamos que o percentual de células nesta região R2 no gráfico controle (CTR) é maior nos animais adultos e senis do que nos animais jovens (**Figura 19**).

Observamos que nos animais jovens $32,4 \pm 10\%$ das células apresentam atividade relacionada a MRP, enquanto que os adultos possuem $55,5 \pm 12\%$ e os senis $58,1 \pm 9\%$ (**Figura 20**). O aumento da atividade da MRP1 com o envelhecimento corrobora com o resultado encontrado na expressão desta proteína.

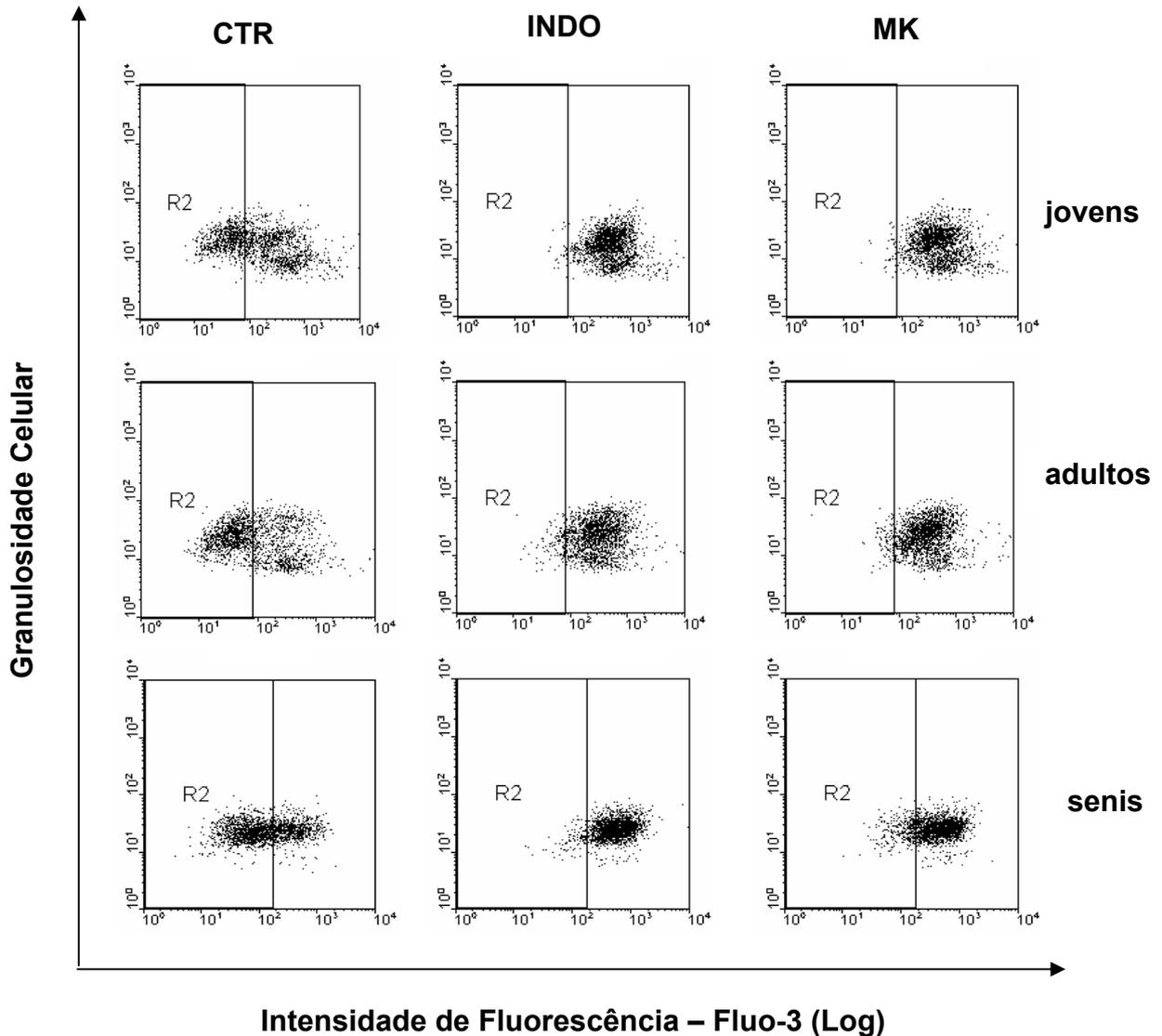


Figura 19. Atividade da MRP durante o envelhecimento. As CMMO de camundongos jovens, (3-4) semanas, adultos (3 meses) e senis (18 meses) foram incubadas na presença ou ausência do Fluo-3 ($5\mu\text{g/ml}$), com ou sem os inibidores da MRP: INDO ($75\mu\text{M}$) - Indometacina e MK – MK571($25\mu\text{M}$) por 30 minutos a 37°C . Após este período as células foram lavadas e incubadas com ou sem os inibidores da MRP por mais 90 minutos a 37°C . As células foram lavadas e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo. CTR – Controle, representa as células incubadas apenas com Fluo-3. Figura representativa de 5 experimentos diferentes.

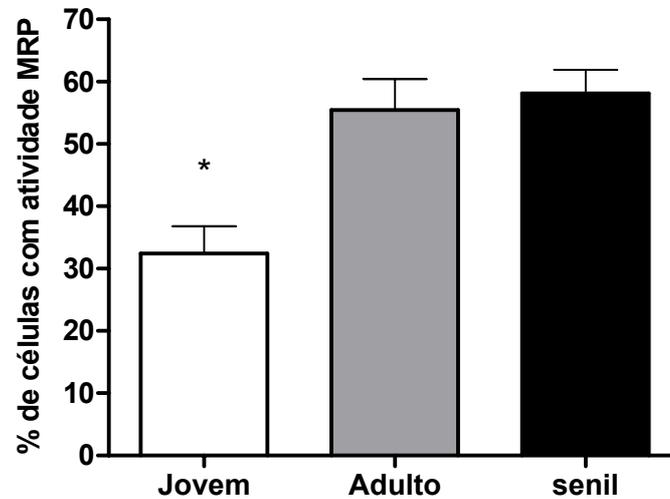


Figura 20. Atividade da MRP durante o envelhecimento. As CMMO dos animais de diferentes idades foram incubadas na presença ou ausência do Fluo-3 (5µg/ml), com ou sem os inibidores da MRP: INDO (75µM) - Indometacina e MK – MK571(25 µM) por 30 minutos a 37°C. Após este período as células foram lavadas e incubadas com ou sem os inibidores da MRP por mais 90 minutos a 37°C. As células foram lavadas e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo. O gráfico representa o percentual de células com atividade MRP. Gráfico da média entre cinco experimentos diferentes. O resultado está expresso como média ± desvio padrão. (*) estatisticamente significativo $p < 0,05$, comparando as células dos animais jovens em relação às dos animais adulto e senil.

4.4.4. Atividade da Pgp e da MRP nas células progenitoras durante o envelhecimento

Foi demonstrado que a população de células tronco hematopoéticas (Thy-1.1^{low}Sca1⁺Lin⁻) capaz de transportar Rho, aumenta conforme o animal envelhece (KIM e col., 1998). Porém em relação a MRP não há nada descrito. Como observamos um aumento na expressão e na atividade da MRP1 nos animais adultos e senis em relação aos jovens, fomos verificar se este aumento afetava as células progenitoras da medula óssea.

Primeiramente, analisamos se a proporção das subpopulações de células progenitoras variava com o envelhecimento nas células mononucleares da medula

óssea nos animais C57BL6. A **Figura 21** demonstra que dentre as CMMO não há uma diferença significativa nas subpopulações entre as células progenitoras com o envelhecimento.

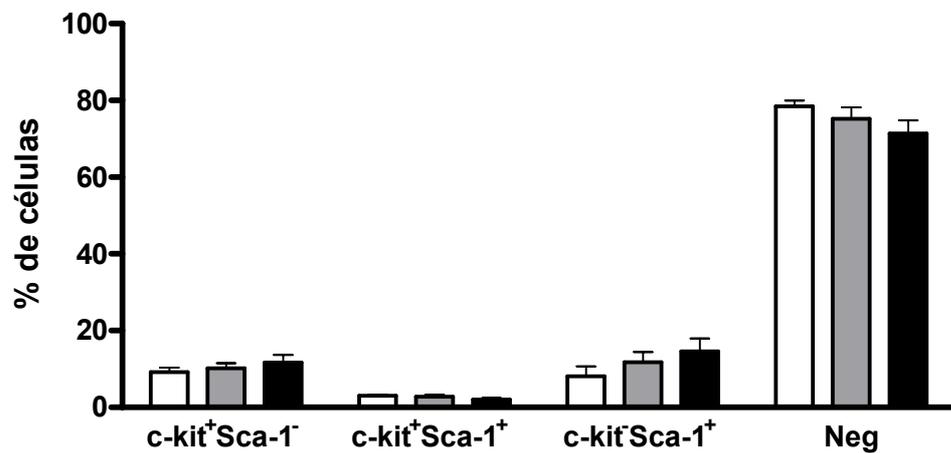


Figura 21. Distribuição das subpopulações de células progenitoras nas CMMO durante o envelhecimento. As células foram incubadas com os anticorpos anti-ckit-TC e anti-Sca-1-PE a 4°C por 30 minutos, em seguida as células foram lavadas e a fluorescência medida por citometria de fluxo. As barras brancas representam os animais jovens (20-30 dias), as barras cinza representam os animais adultos (3 meses), e as barras pretas representam os animais senis (18 meses). O resultado está expresso como média \pm desvio padrão. Gráfico da média de 5 experimentos diferentes.

Como foi observado um aumento na atividade da Pgp nas CMMO com o envelhecimento, fomos analisar se esse aumento afetava as células progenitoras da medula óssea. Para isso, após o ensaio de atividade da Pgp, as células foram marcadas com os anticorpos anti-ckit-TC e anti-Sca-1-PE, e analisado o percentual de células Rho^{neg}, ou seja, células com atividade Pgp dentro de cada subpopulação.

Podemos observar um aumento no percentual de células com atividade relacionada a Pgp na subpopulação c-kit⁺Sca-1⁺ com o envelhecimento. O grupo jovem e o adulto possuem um percentual muito pequeno de células com atividade Pgp nessa subpopulação, sendo $1,8 \pm 1,3\%$ e $2,5 \pm 1,4\%$ respectivamente. Enquanto

que o grupo senil possui $9,3 \pm 3,1\%$ das células $c\text{-kit}^+\text{Sca-1}^+$ com atividade Pgp **(Figura 22 B)**.

A subpopulação $c\text{-kit}^+\text{Sca-1}^+$, que verificamos ser a que possui mais células com Pgp ativa, também apresentou um aumento do percentual de células com atividade com o envelhecimento. Dentro desta subpopulação, o grupo jovem possui $10,7 \pm 4,5\%$ de células com atividade Pgp, enquanto que os grupos adulto e senil possuem $16,1 \pm 1,8\%$ e $19,9 \pm 7,6\%$ de células com atividade desta proteína **(Figura 22 A)**.

Observamos ainda que as subpopulações $c\text{-kit}^+\text{Sca-1}^-$ e $c\text{-kit}^-\text{Sca-1}^-$ não apresentaram variação no percentual de células com atividade Pgp durante o envelhecimento **(Figura 22 C e D)**.

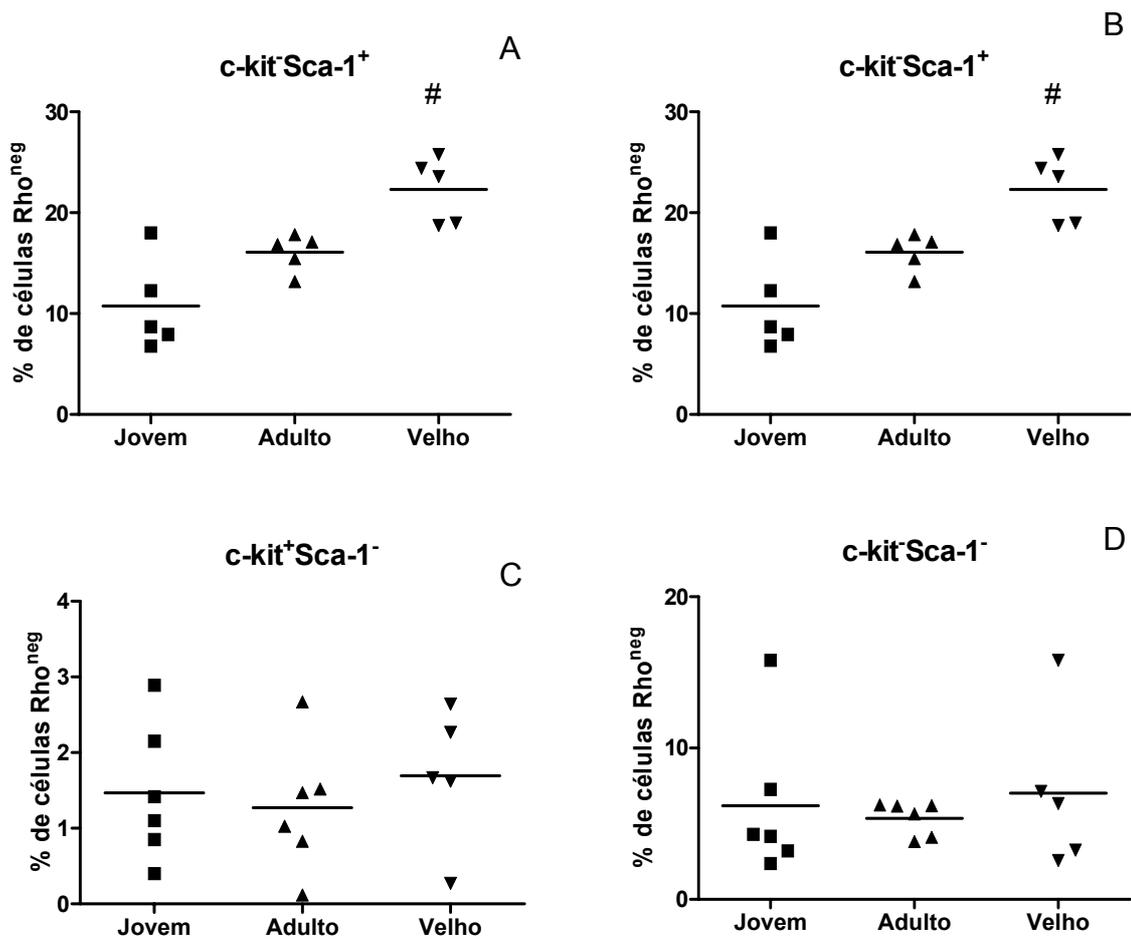


Figura 22. Atividade Pgp nas subpopulações das CMMO durante o envelhecimento. Foi realizado o ensaio de atividade da Pgp, e em seguida as células foram marcadas com os anticorpos anti-c-kit-TC e anti-Sca-1-PE, a 4°C por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas e então analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam o percentual de células Rho^{neg} dentro de cada subpopulação. Gráfico da média de 5 ou 6 experimentos diferentes. (**) indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), quando comparando o grupo senil com aos grupos jovem e adulto. Na subpopulação c-kit⁺Sca-1⁺, (#) indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo senil quando comparado o grupo jovem ($p < 0,001$) e quando comparado o grupo adulto ($p < 0,05$),

Avaliamos a atividade MRP dentro das subpopulações das células mononucleares da medula óssea nos animais de diferentes idades. Para isso, após o ensaio de atividade da MRP, as células foram marcadas com os anticorpos anti-ckit-TC e anti-Sca-1-PE, e o percentual de células Fluo-3^{low} foi analisado, ou seja, células com atividade MRP dentro de cada subpopulação.

Verificamos que dentre as células progenitoras, a subpopulação c-kit⁺Sca-1⁻ apresentou um aumento no percentual de células com atividade relacionada a MRP com o envelhecimento (**Figura 23 C**). Nesta subpopulação o grupo jovem possui $61,4 \pm 14,6\%$ de células com MRP ativa, enquanto o adulto apresenta $81,8 \pm 9,6\%$ e o senil $89,8 \pm 3,8\%$ de células com atividade para esta proteína (**Figura 23 C**).

Além dessa subpopulação, a subpopulação de células que não expressa nenhuma destas moléculas (c-kit⁻Sca-1⁻) também apresentou um aumento do percentual de células com atividade relacionada a MRP com o envelhecimento (**Figura 23 D**). O grupo jovem apresentou $33,6 \pm 9,6\%$, o adulto $62,1 \pm 12,8\%$ e o senil $73,5 \pm 7,4\%$ de células com atividade MRP (**Figura 23 D**).

No entanto, as subpopulações c-kit⁻Sca-1⁺ e c-kit⁺Sca-1⁺ não apresentam modificações no percentual de células com atividade relacionada a MRP durante o envelhecimento (**Figura 23 A e B**).

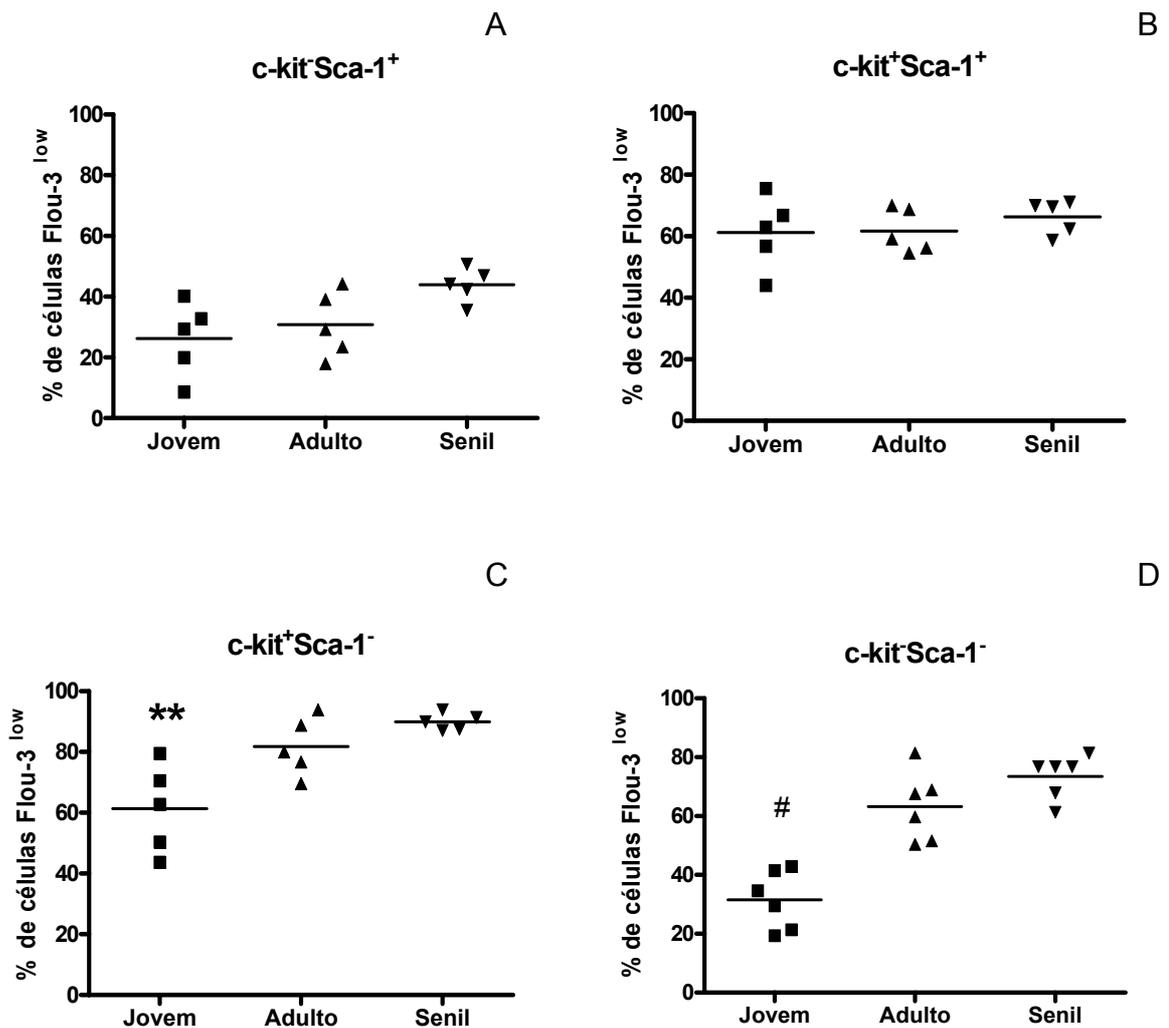


Figura 23. Atividade MRP nas subpopulações das CMMO durante o envelhecimento. Foi realizado o ensaio de atividade MRP1, e em seguida as células foram marcadas com os anticorpos anti-c-kit-TC e anti-Sca-1-PE, as células foram lavadas e então analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos demonstram o percentual de células Flou-3^{low}, dentro de cada subpopulação. Gráfico da média entre 5 ou 6 experimentos diferentes. (**) indica diferença estatisticamente significativa no grupo jovem quando comparado ao adulto ($p < 0,05$), e ao senil ($p < 0,01$). (#) indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo jovem com os grupos adulto e senil ($p < 0,001$).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que as células mononucleares da medula óssea (CMMO) murina expressam tanto a proteína MRP1 quanto a Pgp, e ambas estão ativas nestas células. Também observamos que embora estes transportadores estejam presentes nas células progenitoras, expressando c-kit e/ou Sca-1, entretanto estas subpopulações possuem atividade relacionada a Pgp e a MRP em proporções diferentes. Além disto, pudemos demonstrar que a atividade destas proteínas varia nas diferentes fases da vida do animal. Quando todas as CMMO foram observadas em conjunto, verificamos um aumento das populações que exibem atividade relacionada a Pgp e a MRP no animal senil em relação ao animal jovem. Ao estudar as subpopulações de progenitores separadamente, observamos que este aumento acontece em subpopulações diferentes dependendo da proteína analisada.

Baixos níveis de expressão da Pgp já haviam sido descritos na medula óssea de hamster (BAAS e BORST, 1988) e de seres humanos (PIRKER e col., 1989). A expressão da MRP1 foi descrita na medula óssea humana (ABBASZADEGAN e col., 1994, LAUPEZE e col., 1996) e por RT-PCR na medula óssea de murinos (ZHOU e col., 2001). Porém em nenhum desses trabalhos foi quantificado o percentual de células que expressava esta proteína. Nós fomos os primeiros a descrever e quantificar a expressão e a atividade da MRP1 em cerca de 50% das células mononucleares da medula óssea murina.

Desde o início dos estudos sobre os transportadores ABC, a expressão da Pgp nas células da medula óssea foi correlacionada com as células tronco hematopoéticas (HSC). Primeiramente, foi demonstrado que os progenitores hematopoéticos acumulavam baixos níveis de rodamina 123 (BERTONCELLO e col., 1985) e que o aumento da intensidade da marcação com Rho estava

diretamente correlacionado com a diminuição do potencial de diferenciação (PLOEMACHER e BRONS, 1988, SPANGRUDE e JOHNSON, 1990). O baixo acúmulo de Rho pelas células tronco hematopoéticas era explicado pela característica da Rho de se ligar à mitocôndria. Como estas células são quiescentes, se caracterizam por possuírem poucas mitocôndrias e uma atividade metabólica baixa, logo, acumulariam menos Rho. Além disso, também já era sabido que as HSC tinham uma baixa marcação para o Hoechst 33342, um corante fluorescente que se liga ao DNA, que também era explicado pela quiescência destas células, ou seja, possuíam a cromatina mais condensada (PALLAVICINI e col., 1985). No entanto, esses dois corantes são substratos para a Pgp, e em 1991, foi demonstrado que a pouca marcação das HSC com essas substâncias era resultado da presença da Pgp ativa nestas células, que transportava os corantes para o meio extracelular (CHAUDHARY e RONINSON, 1991).

Em nosso trabalho encontramos que dentre as células Rho^{neg} 35% eram progenitores hematopoéticos, baseado na expressão de c-kit e Sca-1. No entanto, quando avaliamos a atividade da Pgp dentro de cada subpopulação de progenitores, nós encontramos que a subpopulação c-kit⁻Sca-1⁺ era a que possuía o maior percentual de células com atividade Pgp. Este fato a princípio parecia contradizer a literatura, já que é amplamente aceito e utilizado que as HSC possuem o fenótipo LKS (Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺), mas, na realidade, pouco se sabe sobre as outras subpopulações que existem em relação à presença ou ausência destas duas proteínas. Em 1998, Randall e Weissman, publicaram um artigo no qual estudavam a subpopulação c-kit⁻Sca-1⁺. Eles descreveram que esta subpopulação c-kit⁻Sca-1⁺ contém células menores do que a subpopulação c-kit⁺Sca-1⁺, além disto, a subpopulação c-kit⁻Sca-1⁺ é formada por células quiescentes, com ciclo celular mais

lento do que as células $c\text{-kit}^+\text{Sca}1^+$, mais resistente ao tratamento com 5-fluorouracil, e ainda, acumulava menos rodamina, o que está de acordo com os nossos resultados. Porém, quando a capacidade funcional de repopulação destas células foi testada, verificou-se que elas não originavam colônias no baço, nem eram capazes de reconstituir a medula óssea (RANDALL e WEISSMAN, 1998). Posteriormente, um estudo *in vitro* demonstrou que as células $c\text{-kit}^+\text{Sca}1^+$ são capazes de gerar as células $c\text{-kit}^+\text{Sca}1^+$, sugerindo um modelo de desenvolvimento para células tronco hematopoéticas. Na **Figura 24** observamos (1) que inicialmente as células não expressariam nenhuma das moléculas ($c\text{-kit}$ ou Sca-1); (2) em seguida estas células passariam a expressar a molécula Sca-1 , (3) seguido pela expressão de $c\text{-kit}$ em níveis baixos; com o processo de maturação (4) a expressão do $c\text{-kit}$ aumentaria, (5) e então a expressão do Sca-1 seria perdida (KLARMANN e col., 2003). Dentre estes grupos de células, a subpopulação com maior capacidade de repopulação é a $\text{Lin}^-c\text{-kit}^+\text{Sca}1^+$. Embora este modelo sugira que as células mais indiferenciadas, ou seja, capazes de gerar todas as outras, não expressem as moléculas $c\text{-kit}$ e Sca-1 , existem na medula óssea, células maduras que também não expressam estas proteínas.

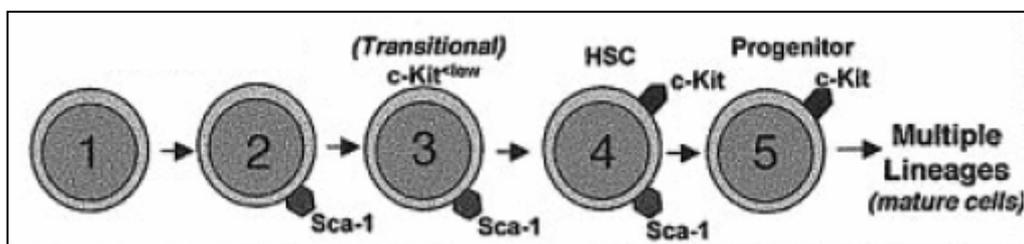


Figura 24. Modelo de desenvolvimento das HSCs. Retirado de KLARMANN e col., 2003.

Segundo Li e Johnson, as células que expressam apenas a molécula $c\text{-kit}$ correspondem à cerca de 6% a 8% das células da medula óssea, das quais a

grande maioria é negativa ou apresenta baixa fluorescência quando marcadas com os anticorpos que identificam as proteínas características de linhagens celulares. As células que expressam apenas a molécula Sca-1 correspondem à cerca de 8% a 10% das células da medula óssea. As células que co-expressam estas duas proteínas representam um percentual muito pequeno da medula óssea, e quando são retiradas as células que expressam as proteínas características de linhagens celulares, as células $c\text{-kit}^+ \text{Sca}1^+$ constituem cerca de 0,4% a 0,5% das células da medula óssea (LI e JOHNSON, 1995).

Também verificamos no nosso trabalho, que o percentual de células com atividade Pgp nas CMMO aumenta durante o envelhecimento. Foi mostrado que a expressão e a atividade da Pgp aumentam com o envelhecimento em linfócitos periféricos humanos (AGGARWAL e col., 1997) e em esplenócitos murinos (WITKOWSKI e col., 1993). Alguns autores observaram que a expressão da Pgp nas células mononucleares de sangue periférico humano varia com a idade, no entanto, apesar de ser menor durante a infância do que na vida adulta, diminui nos indivíduos idosos (PILARSKI e col., 1995, MACHADO e col., 2003).

Além disso, nós observamos que durante o envelhecimento ocorre um aumento no percentual de células com atividade Pgp dentro da subpopulação de progenitores $c\text{-kit}^+ \text{Sca}1^+$, que é a que tem o maior percentual de células com atividade desta proteína, e na subpopulação $c\text{-kit}^+ \text{Sca}1^+$, que é a subpopulação com capacidade de repopulação. Estes dados estão de acordo com o trabalho de Kim e seus colaboradores, onde se demonstrou que durante o envelhecimento ocorre um aumento no percentual de HSC ($\text{Thy-1.1}^{\text{low}} \text{Sca}1^+ \text{Lin}^-$) Rho^{neg} (KIM e col., 1998). Também existem evidências de que, com o envelhecimento, ocorre um aumento no efluxo de Rho nas células da medula óssea $\text{CD}34^+$ humanas (CALADO, 2003).

Nós não observamos alterações significativas no percentual das subpopulações de progenitores durante o envelhecimento. No entanto, o artigo que estuda a “população misteriosa” (RANDALL e WEISSMAN, 1998), relata que camundongos muito jovens (1 a 3 semanas) possuem uma maior freqüência da população $\text{Lin}^- \text{Thy-1.1}^{\text{low}} \text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+$ e uma freqüência muito baixa da população c-kit^- . Em torno de cinco semanas a freqüência das populações é similar, em torno de 0,02%, e durante os meses seguintes, a população $\text{Lin}^- \text{Thy-1.1}^{\text{low}} \text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+$ diminui e estabiliza em cerca de 0,01%, enquanto que a freqüência da população c-kit^- aumenta progressivamente, atingindo 0,08% com vinte semanas, quando acaba o estudo, mas com a tendência de continuar aumentando (RANDALL e WEISSMAN, 1998).

O aumento do percentual de células com atividade Pgp na subpopulação $\text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+$ é observado apenas nos animais senis ($9,3 \pm 3,1\%$), os adultos ($2,5 \pm 1,4\%$) possuem este percentual bem próximo aos jovens ($1,8 \pm 1,3\%$). Estes resultados estão de acordo com a observação de que a prevalência da expressão da Pgp na leucemia mielóide aguda aumenta progressivamente com a idade (LEITH e col., 1999), e ainda, que a taxa de cura da leucemia linfóide aguda da infância é entre 60-80% e nos adultos entre 30-40% (STYCZYNSKI e WYSOCKI, 2002).

A expressão da MRP1 nas células progenitoras é controversa, Legrand compara a expressão da MRP1, nas células do sangue periférico, baço, timo e da medula óssea, e descreve que a MRP1 está mais expressa nas células mais maduras do que nas células imaturas, e que as células CD34^+ possuem baixos níveis de RNA que codifica a MRP1 (LEGRAND e col., 1996). No entanto, Laupeze observa uma maior atividade relacionada a MRP nas células CD34^+ do sangue periférico do que nos linfócitos de sangue periférico humano, (LAUPEZE e col.,

2001), porém o percentual de células no sangue periférico que expressam CD34 é muito pequeno.

Nós encontramos que dentre as células com atividade MRP, apenas 14% eram progenitores hematopoéticos, mas diferente da Pgp, todas as subpopulações de progenitores possuíam um grande percentual de células com atividade relacionada a MRP, sendo que a subpopulação $c\text{-kit}^+ \text{Sca}1^-$, apresentava atividade para esta proteína em quase todas as células (82%). A atividade MRP estava presente, principalmente, nas células $c\text{-kit}^+$ (82% das células $c\text{-kit}^+ \text{Sca}1^-$ e 54% das células $c\text{-kit}^+ \text{Sca}1^+$), comparado com 38,8% das células $c\text{-kit}^+ \text{Sca}1^+$.

Fomos os primeiros a demonstrar o aumento da expressão e do percentual de células com atividade relacionada a MRP durante amadurecimento nas CMMO de murinos. Observamos que os animais adultos e senis expressam cerca 1,5 vezes mais a MRP1 do que os animais jovens, mas não há diferença nesta expressão entre os animais adultos e os senis. Apenas um estudo relata a expressão da MRP em diferentes fases da vida, comparando a sua expressão no fígado, rim, coração, cérebro e pulmão de ratos da idade fetal até a vida adulta. Não foram observadas variações significativas na expressão desta proteína no coração, cérebro e pulmão. Entretanto, no rim e no fígado foi observada uma redução na expressão nos animais de oito meses em relação às outras idades (ROSATI e col., 2003).

Em nosso trabalho, encontramos um aumento significativo no percentual de células com atividade MRP nas subpopulações $c\text{-kit}^+ \text{Sca}1^-$ e $c\text{-kit}^- \text{Sca}1^-$ com o envelhecimento. As células que não expressam nenhuma destas proteínas são células maduras, e de acordo com o modelo proposto de maturação das células hematopoéticas (**Figura 24**) (KLARMANN e col., 2003), a subpopulação que expressa apenas o $c\text{-kit}$ é formada por células mais maduras. Desta forma, o

percentual de células com atividade MRP aumenta durante o envelhecimento nas células mais maduras.

Visto que essas proteínas são expressas de forma diferente nas subpopulações de progenitores, qual seria a vantagem funcional que a presença dessas proteínas conferiria? A principal função das células tronco hematopoéticas é se diferenciar nas diversas linhagens sanguíneas, de forma que estas células possam colonizar e repopular.

Como dito anteriormente, a MRP transporta alguns mediadores lipídicos, entre eles o leucotrieno C4 (LTC₄) (LEIER e col., 1994). Foi descrito que o LTC₄ potencializa a formação de colônias mielóides induzida por GM-CSF (STENKE e col., 1993), e ainda que os progenitores mielóides possuem as enzimas necessárias para metabolizar os leucotrienos (TORNHAMRE e col., 2003). Como a MRP está distribuída entre todas as subpopulações de progenitores, é possível que esta proteína desempenhe um papel importante na mielopoese.

No envelhecimento, uma porcentagem das HSC pode apresentar uma reconstituição defeituosa, originando apenas células mielóides (SUDO e col., 2000) e, de acordo com esta observação, verificamos que ocorre um aumento no percentual de células com atividade MRP, principalmente, na população madura e nos progenitores mielóides c-kit⁺.

Seria interessante especular que diferentes populações de progenitores pudessem sinergizar para produzir uma situação ideal de repopulação hematopoética. No entanto, a população Sca-1⁺ é a que apresenta em números absoluto o maior número de células com atividade Pgp e/ou MRP, no entanto, estas células não são capazes de reconstituir por si só a medula óssea, sugerindo que a presença destes transportadores não confere a estas células a capacidade de

repopulação. Neste trabalho não foi possível verificar se a atividade das duas proteínas nas mesmas células, o que dificulta uma discussão sobre uma possível ação sinérgica em populações diferentes.

A outra função fundamental das células tronco é sua capacidade de diferenciação, poderíamos então especular que a presença das proteínas Pgp e MRP nas subpopulações de progenitores estejam envolvidas não no processo de colonização, mas sim no processo de diferenciação. Há evidências que ambas proteínas estariam envolvidas neste processo em outro sistema, o de diferenciação tímica.

Como dito anteriormente, a Pgp é capaz de transportar glicocorticóides (GRUOL e BOURGEOIS, 1994), e estes hormônios participam do processo de seleção tímica, sendo que a subpopulação mais sensível a estes hormônios são os tímocitos duplo-positivos (COHEN, 1992), justamente a subpopulação que não possui atividade Pgp (MACDONALD e col., 1995). Enquanto que, as subpopulações simples positivas $CD4^+$ ou $CD8^+$, células mais maduras, apresentam atividade Pgp e são resistentes aos glicocorticóides. Por outro lado, a MRP1 está presente em todas as subpopulações dos tímocitos (LEITE e col., 2006), e utilizando uma linhagem celular de timoma murino, EL-4 ($CD4^-CD8^-$), nós observamos que estas células expressam a MRP1, e ao inibir esta proteína, as células passaram a expressar as moléculas CD4 e CD8, sugerindo que a MRP tenha um papel na maturação de tímocitos (ECHEVARRIA-LIMA, e col., 2005).

Em resumo, células da medula óssea expressam transportadores ABC. Estas moléculas estão presentes em proporções diferentes nas várias subpopulações de células progenitoras e a expressão e a atividade destes transportadores varia com a

idade do animal. É possível que as mesmas desempenhem um papel na diferenciação das células tronco.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos nossos experimentos chegamos às seguintes conclusões:

- Cerca de 5% das células mononucleares da medula óssea apresentam atividade relacionada a Pgp, e destas, 35% são progenitores hematopoéticos da medula óssea. Dentre os progenitores, a subpopulação c-kit⁻Sca-1⁺ é a que apresenta maior atividade relacionada a Pgp.
- Cerca de 50% das células mononucleares da medula óssea expressam e apresentam atividade relacionada a MRP, e destas, 14% são progenitores hematopoéticos da medula óssea. Dentre os progenitores, todas as subpopulações apresentam atividade relacionada a MRP.
- As células mononucleares da medula óssea apresentam atividade relacionada a Pgp aumentada com o envelhecimento, e dentre os progenitores, as subpopulações c-kit⁻Sca-1⁺ e c-kit⁺Sca-1⁺ são as que apresentam este aumento.
- A expressão e a atividade da MRP aumentam com o envelhecimento nas células mononucleares da medula óssea, e as subpopulações c-kit⁺Sca-1⁻ e c-kit⁻Sca-1⁻ são as que apresentam esse aumento.
- É possível que as proteínas Pgp e MRP desempenhem um papel importante no processo de diferenciação das células tronco hematopoéticas da medula óssea.

7. REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology 5th edition. 2003.

Abbaszadegan MR, Futscher BW, Klimecki WT, List A, Dalton WS. Analysis of multidrug resistance-associated protein (MRP) messenger RNA in normal and malignant hematopoietic cells. *Cancer Res.* 1;54(17):4676-9, 1994.

Aggarwal S, Tsuruo T, Gupta S. Altered expression and function of P-glycoprotein (170 kDa), encoded by the MDR 1 gene, in T cell subsets from aging humans. *J Clin Immunol.* 17(6):448-54, 1997.

Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol.* 197(4):419-23, 2002.

Baas F, Borst P. The tissue dependent expression of hamster P-glycoprotein genes. *FEBS Lett.* 14;229(2):329-32, 1988.

Bertoncello I, Hodgson GS, Bradley TR. Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells: I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on the basis of rhodamine-123 fluorescence. *Exp Hematol.* 13(10):999-1006, 1985.

Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP. Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood.* 1;92(7):2269-79, 1998.

Bunting KD, Zhou S, Lu T, Sorrentino BP. Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo. *Blood.* 1;96(3):902-9, 2000.

Calado RT, Machado CG, Carneiro JJ, Garcia AB, Falcao RP. Age-related changes of P-glycoprotein-mediated rhodamine 123 efflux in normal human bone marrow hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 17(4):816-8, 2003.

Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells.* 24(1):3-12, 2006.

Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991; 66:85-94 Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258: 1650-4, 1992.

Cohen JJ. Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. *Semin Immunol.* 4(6):363-9, 1992.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 4;258(5088):1650-4, 1992.

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittiman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) in normal human tissues. *Proc Nat Acad Sci. USA.* 86 695-8, 1989.

Chong AS, Markham PN, Gebel HM, Bines SD, Coon JS. Diverse multidrug-resistance-modification agents inhibit cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 36(2):133-9, 1993.

de Haan G, Nijhof W, Van Zant G. Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. *Blood.* 1;89(5):1543-50, 1997.

Dean M, Allikmets R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr.* 33(6):475-9, 2001.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22;95(26):15665-70, 1998.

Drach D, Zhao S, Drach J, Mahadevia R, Gatringer C, Huber H, Andreeff M. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. *Blood.* 1;80(11):2729-34, 1992.

Drach J, Gsur A, Hamilton G, Zhao S, Angerler J, Fiegl M, Zojer N, Raderer M, Haberl I, Andreeff M, Huber H. Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes. *Blood.* 1;88(5):1747-54, 1996.

Echevarria-Lima J, Kyle-Cezar F, P Leite DF, Capella L, Capella MA, Rumjanek VM. Expression and activity of multidrug resistance protein 1 in a murine thymoma cell line. *Immunology.* 114(4):468-75, 2005.

Ernest S, Bello-Reuss E. Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 10(11):2306-13, 1999.

Fliedner TM. Prologue to characteristics and potentials of blood stem cells, *Stem Cells* volume 16, supplement 1. *Stem Cells.* 16(6):357-60, 1998.

Frank MH, Denton MD, Alexander SI, Khoury SJ, Sayegh MH, Briscoe DM. Specific MDR1 P-glycoprotein blockade inhibits human alloimmune T cell activation in vitro. *J Immunol.* 166:2451-9, 2001.

Gangenahalli GU, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma RK, Chandra R, Luthra PM. Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. *Stem Cells Dev.* 15(3):305-13, 2006.

Geiger H, Van Zant G. The aging of lympho-hematopoietic stem cells. *Nat Immunol.* 3(4):329-33, 2002.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC,. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* 183(4):1797-806, 1996.

Gupta S, Kim CH, Tsuruo T, Gollapudi S. Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a functionally active efflux pump, in human CD8+ T cells: a role in cytotoxic effector function. *J Clin Immunol.* 12(6):451-8, 1992.

Gruol DJ, Bourgeois S. Expression of the mdr1 P-glycoprotein gene: a mechanism of escape from glucocorticoid-induced apoptosis. *Biochem Cell Biol.* 72(11-12):561-71, 1994.

Harrison DE. Long-term erythropoietic repopulating ability of old, young, and fetal stem cells. *J Exp Med.* 1;157(5):1496-504, 1983.

Ito CY, Li CY, Bernstein A, Dick JE, Stanford WL. Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A-null mice. *Blood.* 15;101(2):517-23, 2003.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 11;455(1):152-62, 1976.

Klarmann K, Ortiz M, Davies M, Keller JR. Identification of in vitro growth conditions for c-Kit-negative hematopoietic stem cells. *Blood.* 1;102(9):3120-8, 2003.

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 1;121(7):1109-21, 2005.

Kim MJ, Cooper DD, Haynes SF, Spangrude GJ. Rhodamine 123 staining in hematopoietic stem cell of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux. *Blood.* 91, 11: 4106-17, 1998.

Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta*. 6;1461(2):237-62, 1999.

Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod Toxicol*. 12(4):457-63, 1998.

Laupeze B, Amiot L, Bertho N, Grosset JM, Lehne G, Fauchet R, Fardel O. Differential expression of the efflux pumps P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein in human monocyte-derived dendritic cells. *Hum Immunol*. 62(10):1073-80, 2001.

Legrand O, Perrot JY, Tang R, Simonin G, Gurbuxani S, Zittoun R, Marie JP. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) mRNA and protein in normal peripheral blood and bone marrow haemopoietic cells. *Br J Haematol*. 94:23-33, 1996.

Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J Biol Chem*. 11;269(45):27807-10, 1994.

Leite DFP. Proteínas ABCC na inflamação. 2007. Tese (Doutorado em ciência Biológicas-Fisiologia) –Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Leite DFP, Echevarria-Lima J, Salgado LT, Capella MAM, Calixto JB, Rumjanek VM. In vivo and in vitro modulation of MDR molecules in murine thymocytes. *Int Immunopharmacol* 6:204-15, 2006.

Leite DF, Echevarria-Lima J, Calixto JB, Rumjanek VM. Multidrug resistance related protein (ABCC1) and its role on nitrite production by the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol*. 1;73(5):665-74, 2007.

Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdem L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*. 1;94(3):1086-99, 1999.

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1;204(3):216-37, 2005.

Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells*. 23(1):16-43, 2005.

Li CL, Johnson GR. Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization. *Blood*. 15;85(6):1472-9, 1995.

Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J Biol Chem*. 19;271(16):9675-82, 1996.

Lorico A, Rappa G, Finch RA, Yang D, Flavell RA, Sartorelli AC. Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione. *Cancer Res*. 1;57(23):5238-42, 1997.

Lotem J, Sachs L. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene*. 13;21(21):3284-94, 2002.

MacDonald HPR, Bommhardt U, Cerottini JC. Developmentally regulated expression of P-glycoprotein (multidrug resistance) activity in mouse thymocytes. *Eur J Immunol*. 25:1457-60, 1995.

Machado CG, Calado RT, Garcia AB, Falcao RP. Age-related changes of the multidrug resistance P-glycoprotein function in normal human peripheral blood T lymphocytes. *Braz J Med Biol Res*. 36(12):1653-7, 2003

Mantovani I, Cappellini A, Tazzari PL, Papa V, Cocco L, Martelli AM. Caspase-dependent cleavage of 170-kDa P-glycoprotein during apoptosis of human T-lymphoblastoid CEM cells. *J Cell Physiol*. 207(3):836-44, 2006.

Marques-Santos LF, Harab RC, de Paula EF, Rumjanek VM. The in vivo effect of the administration of resistance-modulating agents on rhodamine 123 distribution in mice thymus and lymph nodes. *Cancer Lett*. 22;137(1):99-106, 1999.

Martin CH, Kaufman DS. Synergistic use of adult and embryonic stem cells to study human hematopoiesis. *Curr Opin Biotechnol*. Oct;16(5):510-5, 2005.

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 29;441(7097):1068-74, 2006.

Muller M, de Vries EG, Jansen PL. Role of multidrug resistance protein (MRP) in glutathione S-conjugate transport in mammalian cells. *J Hepatol*. 24 Suppl 1:100-8, 1996.

Neyfakh AA, Dmitrevskaya TV, Serpinskaya AS. The membrane transport system responsible for multidrug resistance is operating in nonresistant cells. *Exp Cell Res*. 178(2):513-7, 1998.

Nocka K, Tan JC, Chiu E, Chu TY, Ray P, Traktman P, Besmer P. Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *EMBO J.* 9(6):1805-13, 1990.

Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood.* 1;78(7):1706-12, 1991.

Pallavicini MG, Summers LJ, Dean PN, Gray JW. Enrichment of murine hemopoietic clonogenic cells by multivariate analyses and sorting. *Exp Hematol.* 13(11):1173-811, 1985.

Pawlik A, Baskiewicz-Masiuk M, Machalinski B, Gawronska-Szklarz B. Involvement of P-gp in the process of apoptosis in peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol.* 5(5):821-8, 2005.

Pendse SS, Behjati S, Schatton T, Izawa A, Sayegh MH, Frank MH. P-Glycoprotein Functions as a Differentiation Switch in Antigen Presenting Cell Maturation. *Am J Transplant.* 3; [Epub ahead of print] 2006

Pilarski LM, Paine D, Mcelhaaney JE, Cass CE, Belvh AR. Multidrug transporter P-glycoprotein 170 as a differentiation antigen on normal human lymphocytes and thymocytes: modulation with differentiation stage and during aging. *Am J Hematol.* 49:323-35, 1995.

Pirker R, Goldstein LJ, Ludwig H, Linkesch W, Lechner C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug resistance gene in blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Cancer Commun.* 1(2):141-4, 1989.

Ploemacher RE, Brons NH. In vivo proliferative and differential properties of murine bone marrow cells separated on the basis of rhodamine-123 retention. *Exp Hematol.* 16(11):903-7, 1988.

Prechtel S, Roellinghoff M, Scheper R, Cole SP, Deeley RG, Lohoff M. The multidrug resistance protein 1: a functionally important activation marker for murine Th1 cells. *J Immunol* 164:754-61, 2000.

Puddu P, Fais S, Luciani F, Gherardi G, Dupuis ML, Romagnoli G, Ramoni C, Cianfriglia M, Gessani S. Interferon-gamma up-regulates expression and activity of P-glycoprotein in human peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Lab Invest.* 79:1299-309, 1999.

Randall TD, Weissman IL. Characterization of a population of cells in the bone marrow that phenotypically mimics hematopoietic stem cells: resting stem cells or mystery population? *Stem Cells.* 16(1):38-48, 1998.

Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*. 29;441(7097):1080-6, 2006.

Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M, Sugawara I, Hoffman L, Steinman RM, Muller WA. A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:1624-9, 1998.

Robbiani DF, Finch RA, Jager D, Muller WA, Sartorelli AC, Randolph GJ. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell*. 103:757-68, 2000.

Rosati A, Maniori S, Decorti G, Candussio L, Giraldi T, Bartoli F. Physiological regulation of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and cytochrome P450 3A2 during rat ontogeny. *Dev Growth Differ*. 45(4):377-87, 2003.

Rothenberg M, Ling V. Multidrug resistance: molecular biology and clinical relevance. *J Natl Cancer Inst*. 21;81(12):907-10, 1989.

Schiengold M, Schwantes L, Schwartzmann G, Chies JA, Nardi NB. Multidrug resistance gene expression during the murine ontogeny. *Mech Ageing Dev*. 122(3):255-70, 2001.

Schultz MJ, Wijnholds J, Peppelenbosch MP, Vervoordeldonk MJ, Speelman P, van Deventer SJ, Borst P, van der Poll T. Mice lacking the multidrug resistance protein 1 are resistant to *Streptococcus pneumoniae*-induced pneumonia. *J Immunol*. 15;166(6):4059-64, 2001.

Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 441:1060, 2006.

Smith C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control*. 10(1):9-16, 2003.

Smyth MJ, Krasovskis E, Sutton VR, Johnstone RW. The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9;95(12):7024-9, 1998.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 241: 58-62, 1988.

Spangrude GJ, Johnson GR. Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(19):7433-7, 1990.
Stanford WL, Haque S, Alexander R, Liu X, Latour AM, Snodgrass HR, Koller BH, Flood PM. Altered proliferative response by T lymphocytes of Ly-6A (Sca-1) null mice. *J Exp Med*. 29;186(5):705-171, 1997.

Stenke L, Mansour M, Reizenstein P, Lindgren JA. Stimulation of human myelopoiesis by leukotrienes B₄ and C₄: interactions with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 15;81(2):352-6, 1993.

Styczynski J, Wysocki M. Differences in significance of drug resistance mechanisms between adult and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologia (Budap)*.32(4):313-25, 2002.

Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 6;192(9):1273-80, 2000.

Tan B, Piwnica-Worms D, Ratner L.. Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr Opin Oncol*. 12(5):450-8, 2000.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(21):7735-8, 1987.

Thomas TE, Miller CL, Eaves CJ. Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. *Methods*. 17:202-218, 1999.

Tornhamre S, Stenke L, Granzelius A, Sjolinder M, Nasman-Glaser B, Roos C, Widell S, Lindgren JA. Inverse relationship between myeloid maturation and leukotriene C₄ synthase expression in normal and leukemic myelopoiesis-consistent overexpression of the enzyme in myeloid cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 31:122-30, 2003.

Vellenga E, Tuyt L, Wierenga BJ, Muller M, Dokter W. Interleukin-6 production by activated human monocytic cells is enhanced by MK-571, a specific inhibitor of the multi-drug resistance protein-1. *Br J Pharmacol*. 127:441-8, 1999.

Verbon A, Leemans JC, Weijer S, Florquin S, Van Der Poll T. Mice lacking the multidrug resistance protein 1 have a transiently impaired immune response during tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 130(1):32-6, 2002.

Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P, Borst P. Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med*. 3(11):1275-9, 1997.

Wilisch A, Noller A, Handgretinger R, Weger S, Nussler V, Niethammer D, Probst H, Gekeler V. Mdr1/P-glycoprotein expression in natural killer (NK) cells enriched from peripheral or umbilical cord blood. *Cancer Lett*. 30;69(2):139-48, 1993.

Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 6(2):93-106, 2006.

Witkowski, J. M., and R. A. Miller. Increased function of P-glycoprotein in T lymphocyte subsets of aging mice. *J. Immunol.* 150:1296, 1993.

Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 116(5):1195-201, 2006.

Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Zeng H, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 31(5):406-12, 2003.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 23;425(6960):836-41, 2003.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 7(9):1028-34, 2001.

Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17;99(19):12339-44, 2002.

Zhou S, Zong Y, Lu T, Sorrentino BP. Hematopoietic cells from mice that are deficient in both Bcrp1/Abcg2 and Mdr1a/1b develop normally but are sensitized to mitoxantrone. *Biotechniques.* 35(6):1248-52, 2003.

8. ANEXO

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)