

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Papel do H_2O_2 na Resistência Adquirida ao Cancro: Alterações na Organização das Biomembranas

Daniela Oliveira Grácio

Mestrado em Bioquímica

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Papel do H_2O_2 na Resistência Adquirida ao Cancro: Alterações na Organização das Biomembranas

Daniela Oliveira Grácio

Mestrado em Bioquímica

Dissertação orientada pelo Doutor Fernando Antunes e pela Doutora Susana Marinho

2011

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
AGRADECIMENTOS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA.....	5
RESUMO	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUÇÃO	10
I.1. Membrana plasmática	10
I.1.1. Constituição da membrana plasmática.....	10
I.1.2. Jangadas lipídicas	13
I.1.3. <i>Caveolae</i>	16
I.1.4. Transportadores ATP-binding cassette (ABC)	19
I.1.5. A membrana plasmática como barreira à entrada de peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	21
I.2. Formação de espécies reactivas de oxigénio <i>in vivo</i> e stress oxidativo.....	23
I.2.2 Papel do H ₂ O ₂ em sistemas biológicos	24
I.2.2. O estado estacionário de H ₂ O ₂ como modelo biológico	26
I.3 Quimioterapia do Cancro	28
I.3.1 Espécies reactivas de oxigénio e o cancro	28
I.3.2 Fármacos utilizados na terapia.....	30
II. OBJECTIVOS	32
III. MATERIAIS E MÉTODOS	33
III.1. Reagentes	33
III.2. Material biológico	33
III.3. Métodos experimentais	34
III.3.1 Condições de cultura celular	34
III.3.2 Adaptação das células a 12,5 ou 25 µM de H ₂ O ₂ em estado estacionário	35
III.3.3 Detecção de jangadas lipídicas na membrana plasmática.....	36
III.3.4 Identificação de domínios <i>Caveolae</i> - Imunofluorescência	37
III.3.5 Ensaio de sobrevivência celular.....	38
III.3.6 Medição dos níveis da peroxidação lipídica com ácido tiobarbitúrico	39
III.3.7 Preparação de extractos proteicos totais	39
III.3.8 Quantificação proteica pelo método de Bradford	40

III.3.9 Electroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	41
III.3.10 Electrotransferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose	41
III.3.11 <i>Western blotting</i>	42
III.3.12 Análise estatística	43
IV. RESULTADOS	44
IV.I. Análise da influência do estado estacionário de H ₂ O ₂ na sobrevivência celular	44
IV.II. Análise da influência do H ₂ O ₂ na alteração de propriedades da membrana plasmática em células HeLa.....	47
V.II.1 Análise da influência do H ₂ O ₂ na peroxidação lipídica	47
IV.II.2 Análise da influência do H ₂ O ₂ nas jangadas lipídicas	48
IV.II.2 Análise da Influência do H ₂ O ₂ nos domínios <i>caveolae</i>	50
IV.III. Análise da Influência do estado estacionário de H ₂ O ₂ na resistência a fármacos utilizados na terapia química em células HeLa	55
V. DISCUSSÃO	59
VI. PERSPECTIVAS	64
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Doutor Fernando Antunes e Doutora Susana Marinho, que me receberam na sua segunda casa e me ajudaram a crescer como pessoa e como profissional. Obrigada pelas discussões, esclarecimento de dúvidas e pela paciência ao longo deste ano!

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo apoio financeiro no âmbito do projecto PTDC/QUI/69466/2006.

A todos os professores e colegas de laboratório do Grupo de Bioquímica dos Oxidantes e Antioxidantes, em especial ao Gonçalo Covas, sem ele este ano não seria a mesma coisa, apenas teria feito uma tese em vez de duas! Obrigada pela disponibilidade e entreaajuda que nos caracterizou!

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e que sou capaz de ir tão longe quanto eu queira. Que sempre apoiaram as minhas escolhas sem me questionar ou influenciar a ir por outros caminhos e sempre estiveram presentes para me amparar as quedas. Obrigada por tudo!

À minha família, que principalmente nos últimos meses sentiu a minha falta (bem sei que a praia sem mim não é a mesma coisa!) mas que sempre me incentivou e apoiou a lutar por aquilo que gosto e acredito, apesar de as minhas escolhas não serem enquadradas no seu padrão de normalidade. Obrigada pela confiança! Em especial aos meus tios, Alice e Fernando, que durante 4 anos me receberam e acolheram na sua casa como se fosse minha e todas as palavras que possa colocar neste pedaço de papel não chegaram perto do quanto vos tenho a agradecer!

Aos meus amigos, que se encontram em etapas semelhantes à minha mas que sempre se disponibilizaram para me ouvir tanto nos momentos em que explodia de alegria, como também naqueles em que já não aguentava a pressão! Em especial à

Ana Raquel Jacinto, Inês Martins, Inês Pereira, Patrícia Ramos e Sofia Henriques, porque de uma forma ou de outra sempre estiveram lá, sempre acreditaram em mim mesmo quando nem eu própria acreditei. Obrigada pelos bons momentos e pelos puxões de orelhas! Não são preciso enumerar vocês não se devem ter esquecido.

Por último, mas não menos importante, ao Helder Ferreira, por me mostrar que nada pode ser tomado como certo e a vida dá imensas voltas, mas que se lutar e acreditar que sou capaz serei recompensada. És especial S.! Obrigada por teres entrado na minha vida!

Simplesmente obrigado! Em parte, a vós devo aquilo que sou hoje...

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

- 8-oxo-dG – 8-Oxo-2'-deoxiguanosina
- BODIPY – 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
- BSA – Albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumine*)
- cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês *cyclic Adenosine MonoPhosphate*)
- Cisplatina – *cis*-diamminedicloroplatina (II)
- CTx – Toxina da cólera (do inglês *Cholera Toxin*)
- CTxB – Subunidade B da Toxina da cólera (do inglês *Cholera Toxin B subunit*)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)
- DTT – Ditioneitol
- Em – Emissão
- ERO – Espécies Reactivas de Oxigénio
- Ex – Excitação
- FBS – Soro fetal bovino (do inglês *Fetal Bovine Serum*)
- GM1 – Receptor gangliósido
- GO – Glucose Oxidase (Beta-D-glucose:oxigénio 1-oxido-redutase, EC. 1.1.3.4)
- GSH – γ -glutamilcisteínilglicina, Glutathione reduzido
- GSSG – Glutathione oxidado
- I_o – Líquido ordenado
- M β CD – Metil- β -Ciclo Dextrina
- MDA – Malonaldeído; propanodial
- MDR – multiresistência aos fármacos (do inglês *multidrug resistance*)
- NADPH – Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- NP-40 – Nonidet P-40
- PBS – *Phosphate Buffered Saline*
- PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil
- PSA – Persulfato de amónia
- S. cerevisiae* - *Saccharomyces cerevisiae*
- SDS – Sulfato de dodecilo de sódio (do inglês *Sodium Lauryl Sulfate*)

SOD – Superóxido dismutase (EC. 1.15.1.1)

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

TEMED – N,N,N,N-Tetrametiletilenodiamina

Transportador ABC – do ingles *ATP-binding cassette transporter*

v – Velocidade

FÓRMULAS QUÍMICAS

H_2O – Água

H_2O_2 – Peróxido de hidrogénio

HCl – Ácido clorídrico

HO^\bullet – Radical hidroxilo

HO^- – Ião hidroxilo

KCl – Cloreto de potássio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NH_4Cl – Cloreto de amónia

$^1\text{O}_2$ – Oxigénio singuleto

$\text{O}_2^{\bullet-}$ – Radical anião superóxido

O_2 – Dioxigénio

ROOH – Hidroperóxido orgânico

RESUMO

A membrana plasmática é uma barreira que controla a entrada e a saída de compostos na célula, ao separar o interior desta do meio extracelular. Este trabalho teve como objectivo elucidar o papel do peróxido de hidrogénio (H_2O_2), uma molécula sinalizadora, na alteração das jangadas lipídicas e domínios *caveolae* da membrana plasmática e estabelecer a possível resistência de células tumorais (HeLa) adaptadas ao H_2O_2 , aos fármacos anti-cancro *cis*-diamminedicloroplatina (II) (cisplatina) e doxorubicina.

As células HeLa quando expostas a um estado estacionário de 12,5 μM de H_2O_2 durante 6 h adaptam-se ao H_2O_2 , apresentando um aumento de sobrevivência quando expostas a doses letais deste agente. Durante a exposição ao H_2O_2 ocorreu um aumento da peroxidação lipídica da membrana, mas este aumento não comprometeu a viabilidade celular. A marcação de células HeLa com a subunidade B da toxina da cólera, a qual detecta a presença de jangadas lipídicas, mostrou uma diminuição de intensidade aos 30 min e uma ligeira acumulação de proteína aos 360 min de exposição a 12,5 μM de H_2O_2 . Estudos usando imunofluorescência sugerem um aumento dos níveis de caveolina-1 para tempos curtos de exposição ao H_2O_2 em estado estacionário, facto comprovado por *Western blot*. Resultados preliminares usando *Western blot* e a análise por imunofluorescência sugerem que a pré-exposição ao H_2O_2 aumenta os níveis de caveolina-1 fosforilada.

Estudos de sobrevivência indicam que células HeLa adaptadas ao H_2O_2 se tornaram mais resistentes a uma exposição a doses letais de cisplatina mas menos resistentes aquando da exposição à doxorubicina.

Estes resultados mostram, numa linha celular humana, que concentrações baixas e adaptativas de H_2O_2 alteram rapidamente, em poucos minutos a organização da membrana plasmática. A adaptação ao H_2O_2 influencia a resistência das células à utilização dos fármacos cisplatina e doxorubicina, o que poderá ter importância na terapia anti-cancro, no desenho de terapias adjuvantes.

Palavras-Chave: Peróxido de hidrogénio, Jangadas lipídicas, *Caveolae*, Adaptação, Resistência, Cisplatina, Doxorubicina

ABSTRACT

The plasma membrane is a barrier that controls the entry and exit of compounds in the cell, separating the intracellular content from the extracellular medium. This study aimed to elucidate the role of hydrogen peroxide (H_2O_2), a signaling molecule, in the alteration of lipid rafts and caveolae domains in plasma membrane and establishment of possible resistance of tumor cells (HeLa) adapted to H_2O_2 , to anti-cancer drugs cisplatin and doxorubicin.

When HeLa cells were exposed to a steady state of 12,5 μM of H_2O_2 for 6 h, it was observed that cells adapt to H_2O_2 , showing a survival advantage when exposed to lethal doses of this agent. During this exposure to H_2O_2 , it was observed an increase in lipid peroxidation of the membrane, though this increase did not affect cell viability. The labeling of HeLa cells with the B subunit of cholera toxin, which detects the presence of lipid rafts, showed a decrease in intensity at 30 min and a slight accumulation at 360 min of exposure to 12,5 μM H_2O_2 . Studies using immunofluorescence suggest an increasing in the levels of caveolin-1 for short periods of exposure to H_2O_2 steady-state, which was confirmed by *Western* blot. Preliminary results using *Western* blot and immunofluorescence suggested that pre-exposure to 12,5 μM H_2O_2 also increased the levels of phosphorylated caveolin-1.

Concerning the resistance of tumor cells to lethal doses of the anti-cancer drugs cisplatin and doxorubicin, adaptation to H_2O_2 , increased resistance to cisplatin, having the opposite effect when was used doxorubicin-induced cell death.

These results show that, in a human cell line, low and adaptive concentrations of H_2O_2 change, in a few minutes, the organization of the plasma membrane. Adaptation to H_2O_2 confers resistance of HeLa cells to the drug cisplatin, while increasing doxorubicin anti-tumor action. Altogether, these observations may have implications to anti-cancer therapy, namely in the design of adjuvant therapy.

Keywords: Hydrogen peroxide, Lipid rafts, Caveolae, Adaptation, Resistance, Cisplatin, Doxorubicin

I. INTRODUÇÃO

I.1. Membrana plasmática

I.1.1. Constituição da membrana plasmática

A membrana plasmática das células animais é conhecida por ser uma estrutura complexa constituída por um elevado número de macromoléculas (Atkinson & Summers, 1971), desempenhando um papel crucial na maioria dos processos celulares (Singer & Nicolson, 1972). Esta possui duas funções chave: (1) separação do interior do exterior da célula, por via da barreira proteínas/lípidos e (2) possuem domínios celulares que podem promover alterações no ambiente externo e iniciar eventos que alteram a fisiologia celular (transporte, comunicação, transdução de sinal, entre outros). Um aspecto fundamental destas respostas funcionais é a localização de moléculas na membrana que reconhecem estímulos externos e depois a comunicação desses eventos com locais específicos da membrana plasmática ou de outros compartimentos celulares (Patel & Insel, 2009).

As primeiras noções sobre a estrutura da membrana plasmática foram desenvolvidas no início dos anos 70, por Singer & Nicolson, com o modelo do mosaico fluído, onde a membrana plasmática é constituída por uma dupla camada de lípidos com proteínas. A bicamada lipídica forma-se espontaneamente originando uma barreira permeável e dinâmica, que pode ser alterada através da internalização de macromoléculas, que permite passar informação entre a célula e o ambiente. Neste modelo, as proteínas estão dispersas na membrana e combinam as suas zonas hidrófobas com as zonas hidrófobas da bicamada lipídica não perturbando a sua estabilidade (Figura 1) (Engelman, 2005). É possível distinguir duas categorias de proteínas: as proteínas integrais, que se encontram no interior da membrana plasmática e as proteínas periféricas que se encontram na superfície da membrana (Singer & Nicolson, 1972). Ambas as categorias possuem variadas funções como por exemplo receptores e transportadores e em alguns casos a interacção com os lípidos pode influenciar a função da proteína modificando-a (Spector & Yorek, 1985).

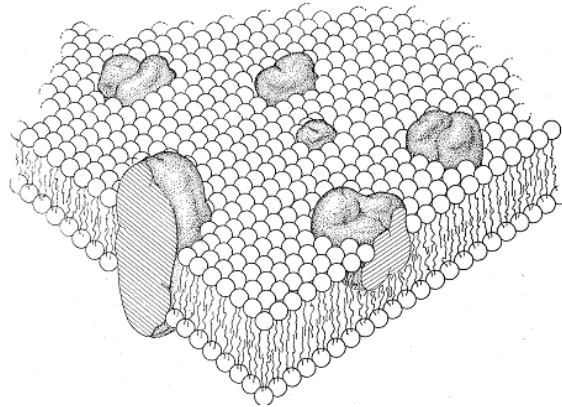


Figura 1: Esquema ilustrativo das interações proteína-lípido na membrana plasmática – modelo do mosaico fluido. Matriz lipídica com proteínas distribuídas aleatoriamente (Singer & Nicolson, 1972).

Existem outras interações não covalentes, para além das interações hidrófobas e hidrófilas, como as ligações de hidrogénio e interações electroestáticas que contribuem para a estabilidade da estrutura da membrana (Singer & Nicolson, 1972).

Os componentes lipídicos que formam a estrutura principal da membrana plasmática não são distribuídos aleatoriamente nas duas metades da bicamada lipídica. Os fosfolípidos e o colesterol são os principais constituintes da membrana plasmática, estando presentes nos dois lados da bicamada (Singer & Nicolson, 1972). Contudo, no lado externo da membrana existe uma predominância de colesterol, esfingolípidos e glico-esfingolípidos e no lado interno de glicerofosfolípidos contendo etanolamina (Patel & Insel, 2009). A endo e a exocitose também produzem um distúrbio na estrutura normal da membrana plasmática que contribui para a existência da assimetria entre os dois lados (Bever *et al.*, 1999). Estudos com filipina, um marcador de colesterol, mostraram que esta se liga a locais distintos na membrana, o que indica a heterogeneidade da membrana plasmática (Patel & Insel, 2009).

No entanto, apesar do modelo do mosaico fluido ter contribuído para o conhecimento da membrana plasmática, apresenta algumas limitações em termos da explicação da sua função, uma vez que estudos posteriores mostraram que a difusão lateral, um processo importante no controlo da estrutura e função das biomembranas, não ocorre livremente na membrana mas sim através de várias interações directas e indirectas com elementos do citoesqueleto (Marguet *et al.*, 2006 e Schütz *et al.*, 1997).

O modelo também não define a natureza física do mosaico nem reconhece a complexidade da organização de certos constituintes, ignorando por exemplo a existência de jangadas lipídicas e dos domínios *caveolae* (Figura 2) (Patel & Insel, 2009).

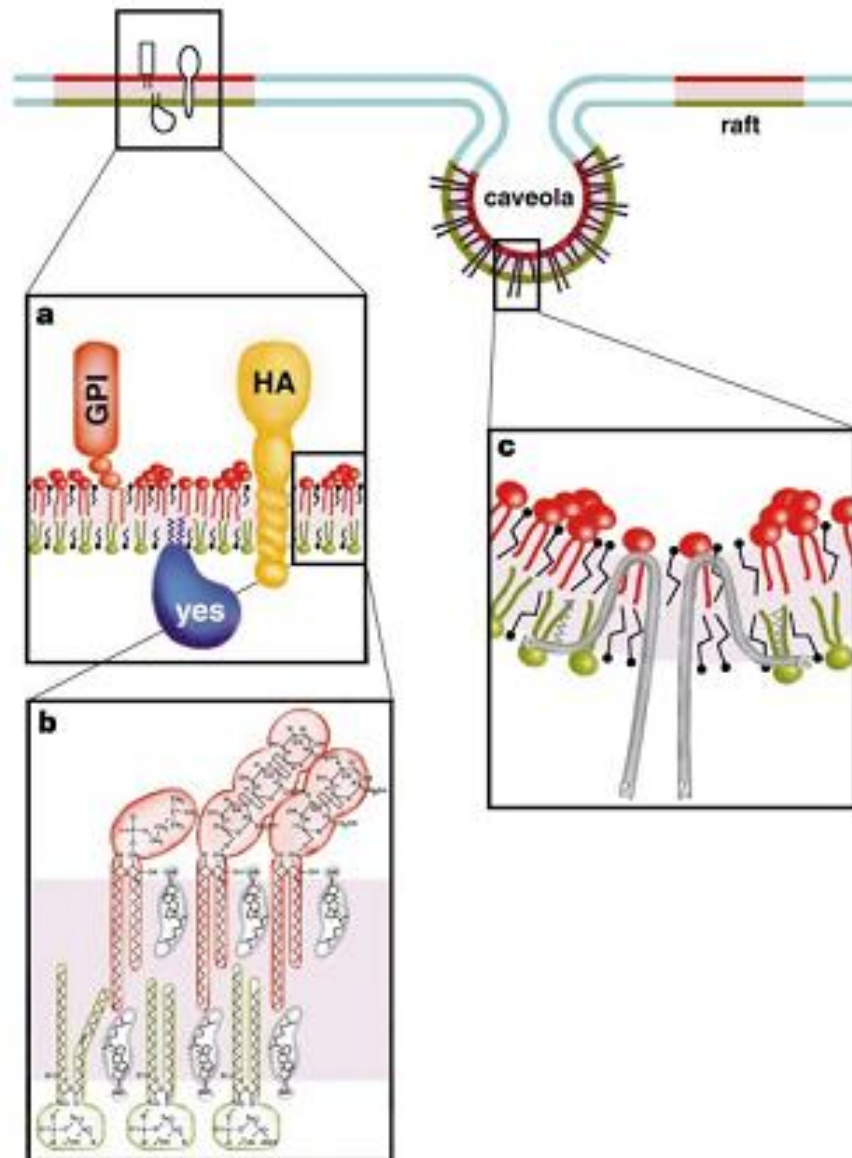


Figura 2: Modelo da organização das jangadas lipídicas e dos domínios caveolae na membrana plasmática. (a) As jangadas lipídicas contêm proteínas ancoradas ao lado exterior da membrana através de ancoragem por glicosilfosfatidilinositol, ao lado interior por caudas acil (família das tirosina cinases) e proteínas integrais de membrana. (b) A bicamada lipídica nas jangadas lipídicas é assimétrica com esfingomielina e glicoesfingolípido (vermelho) do lado exterior e fosfolípido (azul) no interior. O colesterol (cinzento) encontra-se presente em ambos os lados. (c) Os domínios *caveolae* são formados por associação da proteína caveolina que forma invaginações na membrana (Adaptado de Simon & Ikonen, 1997).

As jangadas lipídicas são associações dinâmicas de proteínas e lípidos que flutuam livremente na fase líquida-ordenada (l_o) da membrana mas que também podem formar plataformas ordenadas. São enriquecidas em colesterol, glicoesfingolipídios, glicosilfosfatidilinositol e receptor gangliósido (GM1). Os domínios *caveolae* são pequenas invaginações da membrana plasmática, devido à presença da proteína caveolina. A existência destes domínios na membrana transforma o modelo do mosaico fluído num sistema mais complexo onde as proteínas e os lípidos se podem difundir lateralmente (Simons & Ehehalt, 2002).

I.1.2. Jangadas lipídicas

As jangadas lipídicas são resistentes a detergentes e estão envolvidas na propagação da sinalização celular e endocitose, facilitando o transporte de entidades moleculares para outras regiões da célula ou a sua passagem através da membrana plasmática (Patel & Insel, 2009 e Wilson *et al.*, 2004). A formação e/ou ruptura das jangadas lipídicas ocorre por resposta a diferentes estímulos e em consequência da internalização independente de clatrina (Patel & Insel, 2009). O facto de a endocitose ser sensível à depleção de colesterol, distingue a endocitose mediada pelas jangadas lipídicas da endocitose mediada pelas vias dependentes de clatrina (Foerg *et al.*, 2005).

No entanto, as jangadas lipídicas não são facilmente identificadas em separado das outras porções da membrana plasmática e, embora se encontrem predominantemente entre os 100-200 nm, o seu tamanho é muito variável, assim como, a percentagem de cada componente presente, sugerindo várias propriedades funcionais (Patel & Insel, 2009). Uma técnica muito utilizada no estudo das jangadas lipídicas é a sua localização por microscopia com a ajuda da toxina da cólera (CTx). Foi observado que um elevado número de patógenos, incluindo bactérias e vírus, entram nas células através das jangadas lipídicas, pois observa-se a co-localização dos domínios de receptores GM1 com os patógenos (Gabel *et al.*, 2004). A toxina da cólera liga-se ao receptor GM1 da mesma forma que os patógenos através de uma interacção multivalente proteína-glícido, constituindo a melhor interacção conhecida para este receptor (Kuziemko *et al.*, 1996, Pelkmans & Insel, 2004).

A CTx é um membro das citoxinas AB₅, e é composta por uma subunidade A com 27 kDa, constituída por dois polipéptidos ligados por uma ligação persulfureto com actividade catalítica e por cinco subunidades B com 11,6 kDa responsáveis pelo reconhecimento e ligação ao receptor GM1 (Figura 3) (Fishman & Atikkan, 1980 e Shi, *et al.*, 2007). A maioria das ligações é estabelecida por ligações de hidrogénio mediadas por grupos hidroxilo. Quando a CTx se encontra na sua forma total, ocorre intoxicação quando a subunidade B reconhece e se liga ao receptor GM1. A subunidade A ao entrar na célula aumenta os níveis de cAMP, que originam perda de fluidos pelo intestino e consequente morte do organismo. Assim, em experiências em que a CTx é usada como sonda para as jangadas lipídicas, os estudos efectuados são feitos utilizando apenas a subunidade B da toxina da cólera (CTxB) que se liga ao receptor GM1 das jangadas lipídicas (Figura 3) (Kuziemko *et al.*, 1996).



Figura 3: Esquema da ligação entre a subunidade B da toxina da cólera e o receptor GM1 (Kuziemko, 1996).

A CTxB é transportada através das jangadas lipídicas, passando através dos endossomas primários, onde o pH ácido induz modificações conformacionais na CTxB que levam à alteração da sua forma tridimensional e da sua ligação ao GM1, suficiente para permitir a sua dissociação e a sua difusão, sendo acumulada no complexo de Golgi (Pelkmans & Insel 2009). Contudo, foi descoberto que a internalização da CTxB pode ocorrer por endocitose dependente de clatrina consoante o tipo de célula e o nível de expressão da caveolina-1. Por exemplo, a internalização do receptor GM1 após ligação da CTxB é alterada, em células HeLa, quando a expressão da caveolina-1 é

baixa, sendo a endocitose predominantemente dependente de clatrina. Isto porque, a ligação da CTxB ao receptor, altera o processo de internalização ao contrário de outros ligandos. Estudos com 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY), em células HeLa demonstraram que a presença de CTxB diminui a internalização pela via dependente da caveolina, uma vez que ocorre ruptura da ligação do GM1 com os lípidos envolventes, proteínas e colesterol necessários a esta via (Singh *et al.*, 2003). A interação de colesterol com jangadas lipídicas artificiais contendo GM1, mostram que a ligação da CTxB ao GM1 causa perturbações na membrana como consequência da agregação das moléculas de GM1, mas que são importantes para promover ligações caso o receptor se encontre em pouca densidade na membrana (Fishman & Atikkan, 1980). É de referir que a expressão do receptor GM1, em células HeLa, não é muito elevada, quando comparada com células como as 293A (Figura 4) (Oi *et al.*, 2010).

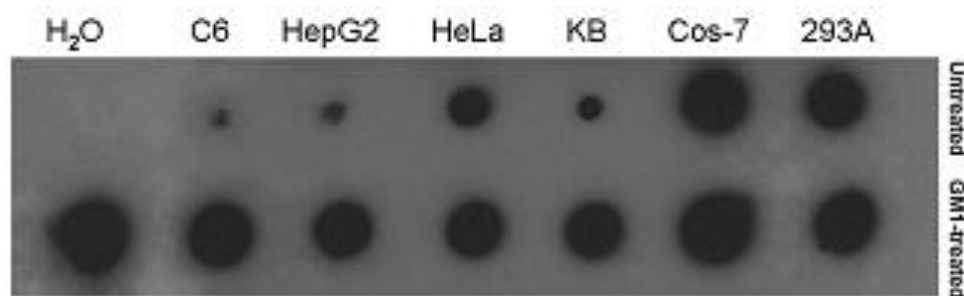


Figura 4: Expressão de GM1 em diferentes tipos de linhas celulares determinada por *dot blot*. Cada ponto representa a quantidade de GM1 em 10 µg de proteína total. A CTxB marcada com HRP foi utilizada para detectar a ligação específica CTxB-GM1. Na primeira linha encontra-se a expressão inicial de GM1 para os diferentes tipos de células e na segunda linha a expressão de GM1 após tratamento das mesmas linhas celulares com meio de cultura enriquecido em GM1, durante 12 h (Oi *et al.*, 2010).

No caso da densidade dos receptores na membrana das células HeLa ser baixa, a temperaturas onde a membrana se encontre fluida, o complexo CTxB-GM1 move-se lateralmente no plano da membrana ou ocorre a mobilização dos receptores para junto do complexo CTxB-GM1. No entanto, se a densidade do receptor for alta, mesmo que a membrana se encontre em fase gel, a ligação CTxB-GM1 ocorre rapidamente mantendo-se estável, não sendo necessária a mobilização de receptores (Figura 5) (Fishman & Atikkan, 1980).

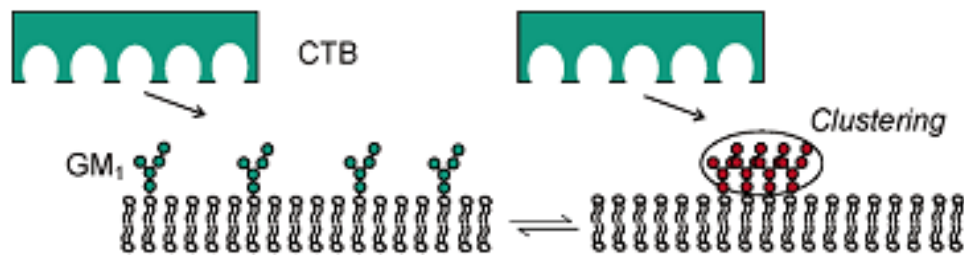


Figura 5: Representação esquemática da localização de GM1 na membrana de modo a ligar-se à CTxB de forma estável, a alta densidade em fase gel e baixa densidade em fase fluída (Shi *et al.*, 2007).

I.1.3. Caveolae

Os domínios *caveolae* são uma especialização das jangadas lipídicas, e foram descobertos em alguns tipos de células (Gabel *et al.*, 2004 e Patel *et al.*, 2009). Morfologicamente, apresentam-se como um sub-compartimento da membrana plasmática, de forma vesicular, enriquecido em colesterol e esfingolípidos, com 50-100 nm de diâmetro (Figura 6) (Fingelman *et al.*, 1997 e Jansen *et al.*, 2008).

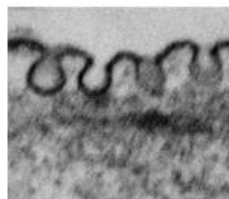


Figura 6: Microscopia electrónica de uma artéria pulmonar, em músculo liso, com invaginações caveolares (Patel *et al.*, 2009).

Os domínios *caveolae* possuem uma morfologia distinta, das jangadas lipídicas, por existir na sua composição uma quantidade elevada de caveolina-1. A caveolina-1 é uma proteína integral de membrana com 21-24 kDa (Fingelman *et al.*, 1997). Esta liga-se ao colesterol e por oligomerização das duas entidades ocorre a formação das caveolas, formando uma estrutura filamentosa que estabiliza a membrana e define o tamanho destas (Pelkmans *et al.*, 2004). No entanto, não se conhece nenhum detalhe

estrutural da associação. São estruturas imóveis, sendo que a sua internalização pode ser estimulada por esfingolípidos, integrinas e alguns vírus (Jansen *et al.*, 2008).

É de referir que existem 3 isoformas de caveolina (caveolina-1, caveolina-2 e caveolina-3), todas elas proteínas estruturais que marcam especificamente os domínios *caveolae*. No entanto, as várias isoformas são expressas de forma diferente na célula: a expressão da caveolina-3 encontra-se restrita ao tecido muscular (esquelético, cardíaco e liso), a caveolina-1 é expressa mais uniformemente e a caveolina-2 é expressa paralelamente à caveolina-1. A caveolina-3 tem uma localização cromossomal diferente das restantes, mas todas as isoformas de caveolina são altamente conservadas entre as espécies. A caveolina-1 é constituída por duas isoformas α e β que derivam do mesmo gene mas possuem começos alternativos, a isoforma α é a proteína completa enquanto a isoforma β é uma forma truncada no terminal amina, sendo a sua função ainda desconhecida. A fosforilação da caveolina-1 (na Tyr14) é uma marcação oncogénica que altera as propriedades da caveolina-1, incluindo as interações com a matriz extracelular, oferecendo outro potencial às funções fisiológicas, podendo levar à transformação celular e progressão do tumor ou promover a apoptose, consoante a composição dos domínios *caveolae* (Patel *et al.*, 2009).

A endocitose em células animais envolve vários mecanismos que diferem nos constituintes da vesícula, formação da vesícula e no processo de internalização. Nestes mecanismos estão incluídos a fagocitose, a macropinocitose, a endocitose dependente de clatrina e a independente de clatrina, como é o caso dos domínios *caveolae*, que internaliza ligandos e moléculas associadas (Pelkmans *et al.*, 2004). No entanto, este último processo depende da dinamina, embora a maquinaria molecular que diferencia os dois processos ainda não seja totalmente conhecida. Estudos sugeriram que a endocitose caveolar é o principal mecanismo de internalização da membrana plasmática, levando a supor que este processo é importante na manutenção da composição lipídica da membrana e na estrutura dos microdomínios (Singh *et al.*, 2003). Foi também demonstrado que a acumulação de dermatosterol (por inibição do enzima que converte dermatosterol em colesterol) interfere com a função das proteínas contidas nos domínios *caveolae*, uma vez que enfraquece a interacção esteróis-caveolina e modifica a quantidade de caveolina por caveola afectando a sua função

como vesícula endocítica (Jansen *et al.*, 2008). Sabe-se ainda que alterações relacionadas com a quantidade de caveolina estão associadas a patologias como a hipertensão ou isquémia e a secreção de caveolina para o espaço extracelular contribui para a regulação e crescimento de tumores (Patel *et al.*, 2009). A perda de expressão da caveolina-1 contribui para o seu fenótipo oncogénico, uma vez que em linhas celulares humanas transformadas obtidas a partir de carcinomas mamários, como é o caso das células MCF-7, a sua expressão está ausente mas a caveolina-1 encontra-se abundantemente expressa em células normais do epitélio e a sua expressão é suficiente para iniciar a fragmentação do DNA, uma característica da morte celular por apoptose (Engelman *et al.*, 1997). Após internalização, as vesículas caveolares podem mover-se no citosol e fundir-se com os endossomas ou com os caveossomas, os quais são compartimentos endocíticos distinguíveis das outras vesículas por possuírem caveolina-1 o que permite a ligação de espécies neutras (Figura 7). A libertação e internalização das vesículas caveolares depende da interacção das moléculas com a caveolina-1, com os outros componentes caveolares, com os lípidos e do pH da vesícula (Pelkmans *et al.*, 2004).

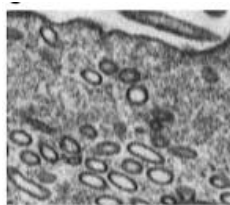


Figura 7: Microscopia electrónica de uma artéria pulmonar em músculo liso, após formação de vesículas intracelulares (caveossomas) (Patel *et al.*, 2009).

Após fusão das vesículas caveolares com os caveossomas, estes domínios não são decompostos mas sim preservados, retendo a composição lipídica e proteica ao contrário da endocitose mediada pela clatrina (Figura 8) (Pelkmans *et al.*, 2004). A co-expressão das proteínas flotilina 1 e 2 nos domínios *caveolae* aumenta a acumulação de vesículas intracelulares (Patel *et al.*, 2009).

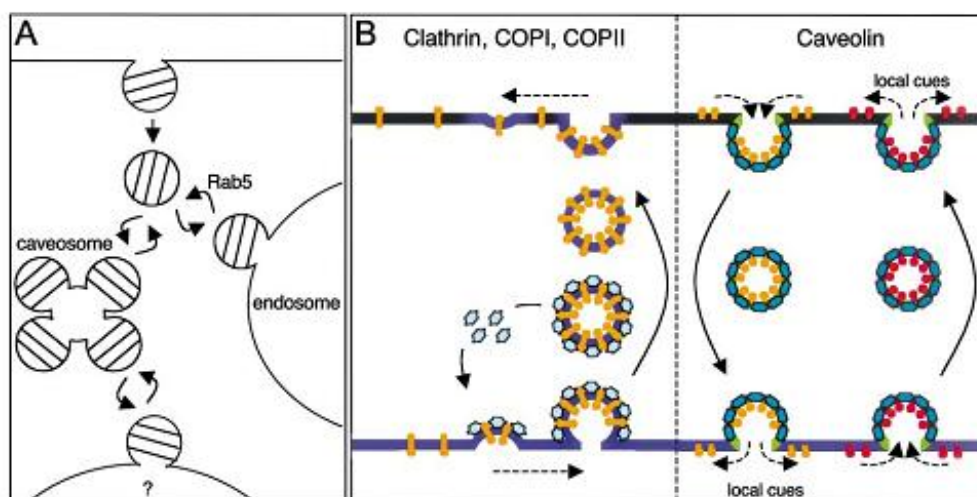


Figura 8: Esquema representativo da endocitose. (A) A internalização de vesículas caveolares é transitória entre endossomas marcados com Rab5 ou por interação com caveossomas, podendo ligar-se a outros compartimentos. (B) Ao contrário das vesículas formadas por clatrina, as vesículas caveolares são estáveis não ocorrendo associação e ruptura dos componentes (Pelkmans *et al.*, 2004)

No entanto, a análise destes componentes é limitada devido à incapacidade de separar inequivocamente as jangadas lipídicas dos domínios *caveolae*, uma vez que a maioria dos métodos se baseia no estudo de propriedades comuns a ambos. Contudo, quando se consegue ultrapassar esta limitação, recorrendo a técnicas como a microscopia electrónica ou imunofluorescência, observa-se que a membrana não é toda equivalente e essas diferenças têm consequências funcionais. A produção celular de óxido nítrico e moléculas com potencial sinalizador, como o radical anião superóxido e o monóxido de carbono, podem controlar a reactividade de moléculas nos domínios *caveolae*, alterando a transdução de sinal, sugerindo que as espécies reactivas de oxigénio podem estar na origem ou ruptura dos domínios *caveolae*. Em células endoteliais, as espécies reactivas de oxigénio induzem a formação e agregação de jangadas lipídicas, efeito que é bloqueado na presença de superóxido dismutase (Patel *et al.*, 2009).

I.1.4. Transportadores ATP-binding cassette (ABC)

Os transportadores ABC (ATP-binding cassette) pertencem à família dos transportadores de membrana. A sua família representa a maior família de proteínas

transmembranares e é designada com base na sequência e organização dos seus domínios de ligação ao ATP (trifosfato de adenosina). São responsáveis pelo transporte de inúmeros substratos, incluindo hormonas, lípidos, fármacos e outras toxinas através da membrana plasmática (Borst *et al.*, 2004), sendo encontrados em todas as espécies (Higgins, 2001). Possuem um papel importante na absorção, distribuição e excreção de compostos farmacológicos, estando envolvidos na defesa da célula através do reconhecimento e remoção dependente de energia de vários agentes tóxicos (Annereau *et al.*, 2004). Esta família é subdividida através das similaridades dos domínios estruturais, ligação a nucleótidos e domínios transmembranares. Das 48 famílias identificadas, dez estão envolvidas na resistência à quimioterapia do cancro e duas estão relacionadas com o fenótipo resistente aos fármacos (Scotto, 2003). O transportador ABC responsável pela resistência aos fármacos denomina-se MDR (multiresistência aos fármacos) (Shmitt & Tampé, 2002), é uma proteína com 12 segmentos transmembranares com dois locais de ligação aos nucleótidos (figura 9) (Scotto, 2003).

Estes ligam o substrato e movem-se através da membrana utilizando a hidrólise do ATP para bombear o substrato contra o gradiente de concentração (Scotto, 2003). As células que sobreexpressão a proteína ABCB1 aumentam a resistência dos transportadores MDR a fármacos hidrófobos como, por exemplo, a doxorrubicina (Dean & Chimini, 2001). Os fármacos hidrófobos não necessitam de uma internalização activa para o sistema alvo, uma vez que podem entrar nas células por difusão passiva através da membrana. Deste modo, a defesa contra estes fármacos envolve ou inactivação enzimática ou extrusão activa por uma bomba de efluxo do fármaco (Borst *et al.*, 2000).

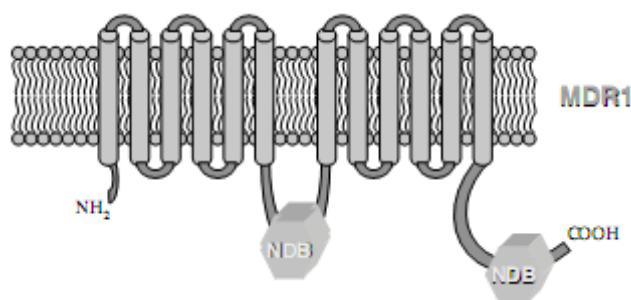


Figura 9: Estrutura esquemática base dos transportadores de fármacos ABC. Os transportadores MDR possuem 12 domínios transmembranares e dois domínios de ligação para nucleótidos (NBD) (Scotto, 2003).

A adição de novos domínios transmembranares à estrutura do transportador pode levar a um exporte dos fármacos que pode estar envolvido com a diminuição da sensibilidade das células tumorais à quimioterapia (Annereau *et al.*, 2004).

1.1.5. A membrana plasmática como barreira à entrada de peróxido de hidrogénio (H₂O₂)

A membrana plasmática de células de mamíferos pode ser considerada uma barreira de difusão que é suficientemente flexível, podendo sofrer alterações na sua forma através da regulação de elementos internos (Doherty & McMahon, 2008).

O peróxido de hidrogénio (H₂O₂) actua como molécula sinalizadora em vários processos celulares tanto autócrinos (intracelulares) como parácrinos (intercelulares). A sua concentração na célula é definida pelo influxo e pela sua formação intracelular, bem como pela sua remoção e efluxo (Bienert *et al.*, 2006).

Dado o seu papel como molécula sinalizadora, é necessário que, por vezes, esta seja transportada através da membrana plasmática. Inicialmente acreditava-se que o transporte de H₂O₂ ocorria livremente através da bicamada lipídica. No entanto, vários sistemas membranares têm mostrado ser menos permeáveis ao H₂O₂, sugerindo que a difusão pode ser regulada por variações na composição da membrana ou na pressão osmótica (Bienert *et al.*, 2006). A existência de canais de proteínas pode facilitar a difusão de H₂O₂ e a diferença na permeabilidade pode reflectir uma maior ou menor presença e/ou capacidade dos diferentes canais na membrana. Assim, a regulação da

permeabilidade ao H_2O_2 é um factor determinante para a concentração do H_2O_2 (Bienert *et al.*, 2006).

Uma das primeiras aproximações para estimar o gradiente de H_2O_2 através das biomembranas foi elaborada por Antunes & Cadenas, 2000. O conceito de latência enzimática diz-nos que a actividade de um enzima dentro de um compartimento é mais baixa do que quando o mesmo se encontra livre devido à barreira de permeabilidade exercida pelo compartimento (Antunes & Cadenas, 2000). A membrana torna-se assim uma barreira de permeabilidade e a difusão do substrato para o enzima pode ser medido através do tempo de demora da reacção. Através da medição da latência enzimática em células Jurkat T, Antunes & Cadenas conseguiram mostrar que se forma um gradiente de H_2O_2 quando as membranas separam o local de produção do local de consumo de H_2O_2 . A existência de um gradiente de H_2O_2 é importante uma vez que antecipa a protecção das membranas contra um elevado número de variações provenientes do *stress* oxidativo, uma vez que fornece uma limitação física à passagem de H_2O_2 para o interior da célula, podendo existir diferença entre a concentração interior e exterior da célula (Branco *et al.*, 2004). Neste mesmo estudo observou-se pela primeira vez que o H_2O_2 diminui a permeabilidade da membrana plasmática a si próprio. Este mecanismo constitui uma importante defesa contra o H_2O_2 extracelular.

Mais tarde, foi estudado o fluxo de H_2O_2 em células de *Escherichia coli*, onde se observou que as membranas das bactérias exibiam uma permeabilidade substancial mas limitada ao H_2O_2 , pois a inexistência do gradiente de concentração leva a um aumento de sensibilidade da membrana ao H_2O_2 , sugerindo que aqui as actividades enzimáticas dos enzimas que catalisam a redução de H_2O_2 não são suficientes para proteger as células no caso de o H_2O_2 entrar livremente nestas células (Seaver & Imlay, 2001). Em *Saccharomyces cerevisiae*, observou-se que as células possuem um mecanismo de adaptação ao *stress* oxidativo e podem sobreviver em ambientes com elevadas concentrações de H_2O_2 , se a pré-cultura for efectuada num meio livre de H_2O_2 (Bienert *et al.*, 2006). Assim, a composição da bicamada lipídica aparenta ser uma forma de regular o fluxo de H_2O_2 através das membranas, uma vez que a adaptação ao H_2O_2 inibe a sua permeabilidade (Branco *et al.*, 2004).

O mecanismo pelo qual o H_2O_2 diminui a sua permeabilidade não é conhecido em detalhe. Sabe-se que envolve um aumento da rigidez da membrana (Folmer *et al.*, 2008), alteração do metabolismo lipídico e composição lipídica (Pedroso, N. *et al.*, 2009), nomeadamente inibição da sintase dos ácidos gordos (Matias *et al.*, 2007). Deste modo põe-se a hipótese do H_2O_2 ao alterar as propriedades da membrana plasmática, nomeadamente tornando-a mais rígida pode levar à diminuição da entrada de fármacos anti-cancro na célula. O aumento da rigidez da membrana pode também promover o aumento do tempo de residência dos fármacos na membrana facilitando a actuação dos transportadores ABC aumentando, assim, a exportação destes compostos (Eytan *et al.*, 1996). Ambos os mecanismos resultam no aumento da resistência das células a uma dada concentração extracelular do fármaco anti-cancro.

1.2. Formação de espécies reactivas de oxigénio *in vivo* e stress oxidativo

Uma perturbação no balanço entre os oxidantes e os antioxidantes presentes na célula, a favor dos oxidantes, que potencia o aumento dos danos celulares é chamado *stress oxidativo* (Sies, 1997).

As espécies reactivas de oxigénio (ERO) são produzidas abundantemente em células aeróbias como produto da respiração mitocondrial, fosforilação oxidativa ou devido a processos de oxidação-redução (Forman & Torres, 2002 e Thannickal & Fanburg, 2000). As principais ERO produzidas *in vivo* são o radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e o radical hidroxilo (HO^{\bullet}) quando se encontram presentes metais de transição (Apel & Hirt, 2004, Giorgio *et al.*, 2007 e Thannickal & Fanburg, 2000). Em geral, são pequenas moléculas com electrões de valência desemparelhados, possuindo maior ou menor poder reactivo consoante a sua estabilidade (Thannickal & Fanburg, 2000). Para contrabalançar o aumento de ERO é activado um sistema de defesa antioxidante que contém tanto, mecanismos celulares enzimáticos como não enzimáticos (Apel & Hirt, 2004).

Em condições patológicas a produção de ERO aumenta, desempenhando um papel importante na patogénese de um elevado número de doenças (Rao & Clayton, 2002 e Sies, 1997). As ERO, ao desencadear eventos celulares como a proliferação,

crescimento, apoptose ou necrose, possuem um papel fisiológico importante na regulação redox (Antunes *et al.*, 2001). O stress oxidativo pode causar danos celulares nas proteínas (oxidação dos resíduos de aminoácidos das cadeias laterais), nos lípidos (peroxidação lipídica) ou no DNA (quebra de cadeias) (Giorgio *et al.*, 2007 e Thannickal & Fanburg, 2000). Estes danos nas macromoléculas, possuem a longo termo um papel importante numa variedade de doenças como o cancro, aterosclerose, diabetes tipo II ou na inflamação (Rao & Clayton, 2002).

I.2.2 Papel do H_2O_2 em sistemas biológicos

O H_2O_2 é a ERO mais abundante nos organismos e microrganismos, sendo continuamente produzida *in vivo* por diferentes fontes como, por exemplo, a partir da dismutação do $O_2^{\bullet-}$, formado no mitocôndrio como subproduto da respiração aeróbia por redução do O_2 pelo ubiquinol, no retículo endoplasmático, onde o $O_2^{\bullet-}$ é gerado no citocromo P450, pelo lipoxigenase, pelo xantina oxidase ou pelo ciclooxigenase. Existem também processos extracelulares capazes de gerar ERO como a radiação γ ou ultravioleta (Figura 9) (Kamata & Hirata, 1999).

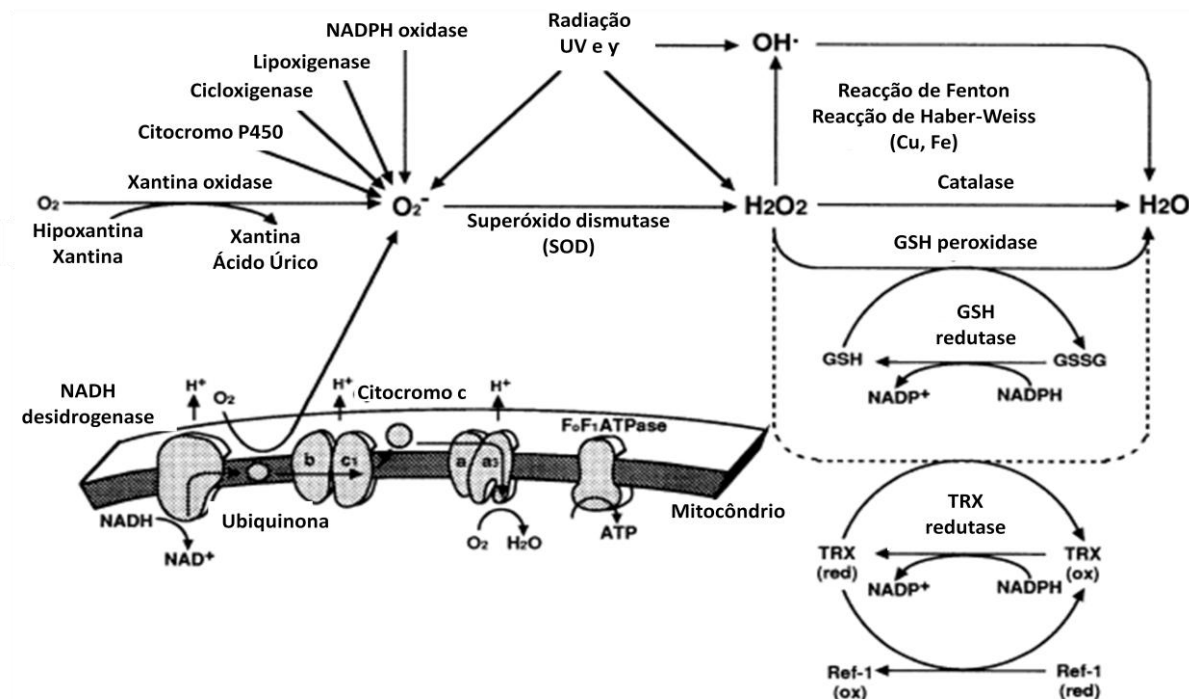
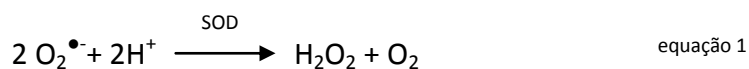


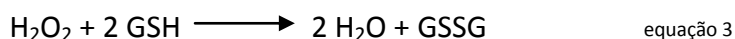
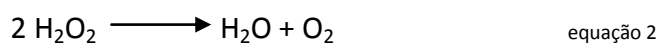
Figura 9: Representação esquemática das vias metabólicas de fonte e produção das espécies reativas de oxigênio, adaptado de Kamata & Hirata, 1999.

A principal fonte de H_2O_2 é a dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ catalisada pelo superóxido dismutase (SOD), descrita pela equação 1 (Forman & Torres, 2002):



Um aumento da concentração de SOD pode aumentar a resistência ao *stress* oxidativo e prolongar o tempo de vida da célula (Giorgio *et al.*, 2007).

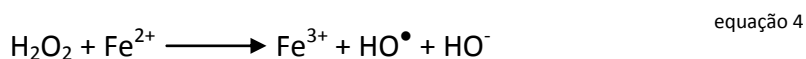
Os principais enzimas responsáveis pelo consumo de H_2O_2 *in vivo* são o catalase e o glutatióno peroxidase, que catalisam a dismutação do H_2O_2 e a redução do H_2O_2 pelo GSH segundo as equações 2 e 3, respectivamente (Forman & Torres, 2002 e Evans & Halliwell, 1999):



O catalase é um dos primeiros enzimas a actuar na remoção do H_2O_2 , pois este funciona como seu indutor (Imlay, 2008).

O glutatióno (GSH) é o principal redutor celular encontrado em células eucariotas (Kamata & Hirata, 1999). O quociente $(\text{GSSG})/(2(\text{GSH}))$ (glutatióno oxidado/glutatióno reduzido) é utilizado como indicador do estado redox da célula. Este quociente é dependente da velocidade de remoção do H_2O_2 catalisada pelos GSH peroxidases e da velocidade de redução do GSSG pelo NADPH catalisada pelo GSSG redutase. No entanto, os GSH peroxidases não são específicos para o H_2O_2 , uma vez que também catalisam a redução de outros hidroperóxidos pelo GSH (Forman & Torres, 2002).

Tanto o $\text{O}_2^{\bullet-}$ como o H_2O_2 são espécies moderadamente reactivas. Contudo, estas espécies são rapidamente convertidas em HO^{\bullet} que é um radical altamente reactivo. Este, na presença de iões de Fe ou Cu, através da reacção de Fenton descrita pela equação 4, induz sérios danos celulares, como a peroxidação lipídica e alterações no DNA (Kamata & Hirata, 1999).



No entanto, o ferro quando quelado, como no grupo heme presente em algumas proteínas como a hemoglobina e a transferrina, não participa na reacção de Fenton, sendo este um mecanismo de controlo *in vivo* da reacção de Fenton (Imlay, 2008).

Apesar de ser um oxidante fraco, o H_2O_2 possui uma grande reactividade com grupos sulfidrílo de proteínas, oxidando tióis (Le Moan *et al.*, 2006). Este encontra-se ainda envolvido na síntese de DNA, activação enzimática, transcrição de genes, regulação do ciclo celular (Thannickal & Fanburg, 2000) e em vias de sinalização que envolvem o estímulo da proliferação, diferenciação, migração ou apoptose (Veal *et al.*, 2007). É de referir que a concentração necessária de H_2O_2 para causar apoptose pode variar entre 1 a 20 vezes consoante a linha celular (Veal *et al.*, 2007). Estudos mostraram que o H_2O_2 foi identificado como regulador de proteínas fosfatases, como a fosfotirosinase fosfatase e a calcineurina (Meinhard & Grill, 2001). Em organismos unicelulares um importante mecanismo de resposta ao H_2O_2 é o aumento de produção de antioxidantes e a reparação de proteínas por adaptação a estas condições de *stress* oxidativo. Em *Schizosaccharomyces pombe* observa-se uma diferente capacidade de resposta consoante o nível de H_2O_2 seja baixo ou elevado (Veal *et al.*, 2007). Antunes & Cadenas (2001) sugeriram que directa ou indirectamente o H_2O_2 pode desempenhar um papel regulatório em diversos processos celulares, quando utilizado em baixas concentrações.

I.2.2. O estado estacionário de H_2O_2 como modelo biológico

O efeito do H_2O_2 na célula depende da sua concentração, sendo importante a manutenção dos seus níveis celulares aquando da realização das diferentes actividades experimentais.

A maior parte dos estudos do efeito sinalizador do H_2O_2 nas células publicados na literatura foram realizados por adição *bolus* de H_2O_2 ao meio. Aqui, as células são sujeitas a uma adição única de H_2O_2 à concentração desejada, a qual vai decrescendo ao longo do estudo à medida que este é consumido intracelularmente pelos peroxidases intracelulares, como é o caso do catalase ou dos glutathione peroxidases (Figura 10) (Antunes & Cadenas, 2000). Uma das desvantagens deste método é o facto

de se recorrer a altas concentrações de H_2O_2 iniciais devido a não existir reposição, concentrações essas que induzem danos na célula por alteração da homeostase ou produzindo modificações oxidativas severas não sendo possível distinguir se os efeitos observados são devido a estas elevadas concentrações ou devido a outros motivos, afastando-se das condições *in vivo* (Oliveira-Marques *et al.*, 2008). Assim, este método não é adequado ao estudo de efeitos do H_2O_2 a nível regulatório (Antunes *et al.*, 2001).

Um método alternativo, que permite expor as células a doses baixas de H_2O_2 e criar um estado estacionário de H_2O_2 , dependente do gradiente de H_2O_2 gerado aquando da exposição das células a uma fonte externa do mesmo, foi proposto por Antunes & Cadenas (2000). Aqui, o estado estacionário é obtido através da adição de uma fonte geradora de H_2O_2 , o enzima glucose oxidase (GO), que compensa o consumo pelos peroxidases intracelulares, através da utilização da glucose, presente no meio de cultura, como substrato (Figura 10) (Antunes *et al.*, 2001). Para além da adição de GO, procede-se ainda a uma adição inicial de H_2O_2 à concentração pretendida, de modo a garantir que a concentração de H_2O_2 é constante ao longo do tempo.

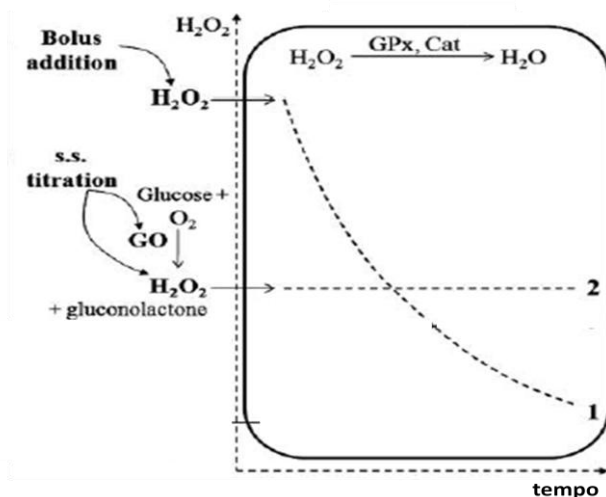


Figura 10: Comparação de uma adição em *bolus* com a exposição a um estado estacionário de H_2O_2 . Após a adição de H_2O_2 , este difunde-se para o interior da célula e é consumido devido à acção dos enzimas antioxidantes. Devido a este consumo na adição em *bolus* (1) é necessário o uso de concentrações iniciais elevadas de H_2O_2 , enquanto que quando a exposição é feita em estado estacionário (2) a concentração de H_2O_2 é mantida constante ao longo do ensaio devido à adição de GO, em simultâneo com a concentração inicial de H_2O_2 desejada (adaptado de Oliveira-Marques *et al.*, 2009).

Deste modo, o estado estacionário de H_2O_2 pode ser descrito pela equação 5:



onde v_{GO} diz respeito à velocidade de produção de H_2O_2 pelo GO e $v_{\text{H}_2\text{O}_2}$ representa a velocidade de consumo de H_2O_2 intracelular. É de referir que o gradiente de H_2O_2 entre o exterior e o interior da célula depende da velocidade de consumo intracelular de H_2O_2 , e que varia consoante o tipo de células e a densidade celular. Esta técnica produz condições mais semelhantes às condições *in vivo* que a adição em *bolus* convencional, uma vez que mimetiza a produção contínua endógena de H_2O_2 , mantém a concentração de H_2O_2 constante, permite a distinção entre respostas celulares consoante a concentração de H_2O_2 utilizada e permite controlar a concentração de H_2O_2 ao longo do ensaio, não causando alterações na homeostase celular (Antunes *et al.*, 2001).

I.3 Quimioterapia do Cancro

I.3.1 Espécies reactivas de oxigénio e o cancro

O cancro é uma doença genética que se caracteriza pela capacidade de proliferação autónoma e ilimitada das células infectadas (Tennant *et al.*, 2009). Estas células são conhecidas por serem metabolicamente activas. Quando comparadas com células normais, as células tumorais mostram um aumento do *stress* oxidativo associado com a transformação oncogénica, alterações na actividade metabólica e aumento da formação de ERO (Pelicano & Huang 2004 e Droge 2002).

De modo a sustentar a rápida proliferação dos tumores, as células necessitam de aumentar a velocidade das reacções metabólicas de modo a fornecer ATP, lípidos, nucleótidos e aminoácidos necessários à proliferação celular. No entanto, as células tumorais usam a glicólise como fonte de energia mesmo na presença de oxigénio (Tennant *et al.*, 2009).

O aumento de ERO em células tumorais pode possuir consequências significativas, como um aumento da proliferação descontrolado, desenvolvimento de

mutações, instabilidade genética, alterações na sensibilidade celular a agentes anti-cancro e disfunção da regulação metabólica. Este aumento em células do cancro leva a uma acumulação de produtos oxidados de DNA, proteínas e lípidos nos tecidos. Produtos da peroxidação lipídica têm vindo a ser encontrados em vários tecidos cancerosos, como é o caso do carcinoma de células renais, carcinoma mamário, adenocarcinoma colorectal e leucemia (Pelicano & Huang, 2004). Assim, especula-se que alterações bioquímicas e moleculares causadas pelas ERO podem contribuir para o desenvolvimento de uma população celular cancerosa heterogénea (Pelicano & Huang, 2004 e Del Rey *et al.*, 2010).

As ERO desempenham um papel importante num ambiente cancerígeno uma vez que promovem alterações na sensibilidade da sinalização redox das vias, mostrando que a disfunção das cascatas de sinalização pode contribuir para o processo de carcinogénese (Droge, 2002).

Estudos mostraram que a acumulação de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG), um derivado oxidado da desoxiguanosina e a expressão de hMTH1, uma molécula reparadora de DNA, aumentam em cancros cerebrais, sugerindo que o *stress* oxidativo possui um papel importante na progressão dos tumores (Iida *et al.*, 2001).

Uma vez que existem ERO, como é o caso do H₂O₂, que simultaneamente são importantes para o crescimento e sobrevivência celular mas também podem levar à apoptose ou necrose, sugere que estas desempenham um papel biológico múltiplo e não linear (Fang *et al.*, 2009). Na presença de *stress* oxidativo, não muito elevado, as células são capazes de regular uma variedade de mecanismos de adaptação, como por exemplo a regulação da expressão de enzimas antioxidantes como o SOD, catalase e peroxidase, eficazes na protecção da célula contra o aumento de ERO (Pelicano & Huang, 2004).

Uma vez que as ERO são quimicamente activas e podem provocar severos danos celulares e as células tumorais estão sob um aumento de *stress* pelas ROS intrínsecas, esta pode ser uma oportunidade de diminuir as células malignas com base na sua vulnerabilidade a adições agravadas de ERO, podendo esta característica bioquímica ter implicações significantes ao nível terapêutico (Pelicano & Huang, 2004).

I.3.2 Fármacos utilizados na terapia

A selectividade terapêutica e a resistência aos fármacos são as duas principais questões na quimioterapia do cancro. Têm vindo a ser desenvolvidas estratégias para melhorar a selectividade terapêutica destes, mas para esta selectividade ocorrer é necessário um conhecimento elevado das diferenças entre as células normais e as células tumorais e a existência de agentes terapêuticos que reconheçam essas diferenças. No entanto, a possibilidade de existir uma população heterogénea de células tumorais leva à possibilidade de existir aumento da resistência das células aos fármacos durante a progressão da doença (Pelicano *et al.*, 2004).

A cisplastina é um dos fármacos anti-cancro mais utilizados, efectivo em vários tipos de cancro, embora o seu mecanismo de morte ainda não seja totalmente compreendido. A sua actividade anti-tumoral aparenta ser mediada por modificações nas bases do DNA através da formação de ligações cruzadas (Akaboshi *et al.*, 1992).

A doxorubicina também é frequentemente utilizada na quimioterapia do cancro. No entanto, os seus efeitos anti-proliferativos e a sua acção como indutora de morte em células tumorais têm vindo a ser discutidos. O seu modo de acção envolve a intercalação com o DNA, a inibição da topoisomerase II, a geração de ERO e danos na permeabilidade e fluidez da membrana (Bien *et al.*, 2010).

Existe a possibilidade das células adquirirem resistência à quimioterapia, através de diminuição da acumulação do fármaco ou aumento da sua desintoxicação, por moléculas que possuem grupos tióis, ou reparação do DNA (Yokomizo *et al.*, 1995). Estudos mostraram que altos níveis de *stress* oxidativo levam a uma inibição da proliferação e a morte celular por apoptose ou necrose. Assim, a exposição de células tumorais a um elevado *stress* oxidativo torna-as vulneráveis à morte, sendo este o princípio da terapia de oxidação no tratamento do cancro. Muitos dos fármacos anti-cancerígenos vulgarmente utilizados na terapia, como a doxorubicina e a cisplatina, são capazes de gerar ERO levando a célula tumoral a um *stress* oxidativo tão elevado que pode originar a sua morte (Fang *et al.*, 2009). Estudos em células NIH 3T3 demonstram que a transformação oncogénica aumenta a produção de ERO e a sensibilidade das células ao efeito da cisplatina (Pelicano *et al.*, 2004). Em células MCF-

7 foi observado que estas possuem um aumento de resistência à doxorubicina, devido a uma diminuição da formação de HO^\bullet na presença deste fármaco, implicando que a formação de ERO proveniente da doxorubicina pode ser responsável pelo efeito citotóxico em células tumorais (Dusre *et al.*, 1989).

II. OBJECTIVOS

A membrana plasmática é uma barreira que separa fisicamente o interior do exterior da célula, controlando a entrada e a saída de compostos. Quando sujeita a condições adversas a célula reorganiza-se provocando modificações na membrana plasmática.

Este trabalho tem como objectivo elucidar o papel do H_2O_2 , o principal oxidante celular, na alteração das biomembranas e testar a possibilidade das células tumorais adaptadas ao H_2O_2 adquirirem resistência à terapia química. Como hipótese de trabalho propõe-se que a presença de H_2O_2 promove alterações na organização das biomembranas, nomeadamente nas jangadas lipídicas e nos domínios *caveolae*, o que pode levar a um aumento da resistência das células aos fármacos.

No trabalho experimental elaborado utilizou-se como modelo biológico a linha celular HeLa, provenientes de um adenocarcinoma do epitélio cervical humano, e recorreu-se ao uso de técnicas com abordagem quantitativa e qualitativa, de modo a responder ao objectivo proposto, que se dividiu em quatro etapas:

- (a) Determinação da dose e do tempo de exposição, necessários, para adquirir adaptação ao H_2O_2 ;
- (b) Estudo do efeito do H_2O_2 nas jangadas lipídicas por microscopia de fluorescência utilizando CTxB-FITC em células controlo e células submetidas a doses adaptativas de H_2O_2 ;
- (c) Estudo do efeito do H_2O_2 nos domínios *caveolae* por imunocitoquímica e *Western blotting*, utilizando anticorpo anti-caveolina-1 e anticorpo anti-caveolina-1 fosforilada, em células controlo e células submetidas a doses adaptativas de H_2O_2 ;
- (d) Estudo da sobrevivência celular utilizando os fármacos anti-cancro, cisplatina e doxorrubicina, em células controlo e células submetidas a doses adaptativas de H_2O_2 .

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Reagentes

O peróxido de hidrogénio foi obtido na Merck (Whitehouse, NJ). O catalase (de fígado bovino, EC. 1.11.1.6), o glucose oxidase (de *Aspergillus niger*, EC. 1.1.3.4), o reagente de Bradford, o ácido tiobarbitúrico (TBA), a cisplatina, o 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), a albumina de soro bovino (BSA), a toxina da cólera (CTxB), o Nonidet-P40 (NP40), o malondialdeído (MDA) e os inibidores de proteases benzamidina, leupeptina, pepstatina A, o fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) foram obtidos na Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). As soluções de penicilina, estreptomicina, L-glutamina, o soro bovino fetal (FBS) e o meio RPMI - 1640 Medium foram obtidos na HyClone, Thermo scientific. O tripsina foi obtido na Biowhittaker®. O alamar blue foi obtido na GIBCO™, Invitrogen. O SDS foi obtido na Calbiochem®. A doxorubicina foi obtida na Pharmacia®. O leite magro desnatado em pó foi adquirido na Molico Nestlé®. O N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED) foi obtido na Promega. Os anticorpos utilizados foram o anti-caveolina-1 (sc894) e o anti-rabitt (sc2004) foram obtidos através da Santa Cruz Biotechnology, o anti-rabitt Alexa Fluor 488 foram adquiridos na Molecular Probes e o anti-caveolina-1 (fosfo Tyr14) (EPR2288Y) obtido na Novus Biologicals. A membrana de nitrocelulose (PROTAN 0,45µm) foi obtida na Schleicher & Schuell e o papel de filtro 3MM na Whatman. Na Kodak foram adquiridas as chapas autoradiográficas, o reagente revelador e reagente fixador. O *kit* de detecção ECL (kit Enhanced Chemiluminescence, Amersham) e os marcadores do gel (*low molecular weight*) foram obtidos na GE Healthcare®. Todos os outros reagentes eram pro-análise ou do maior grau de pureza existente no mercado.

III.2. Material biológico

Durante o decorrer da actividade experimental foram utilizadas células HeLa. Esta é uma linha celular transformada proveniente do adenocarcinoma do epitélio

cervical humano e apresenta um crescimento aderente. A sua aquisição foi feita através da *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA.

III.3. Métodos experimentais

III.3.1 Condições de cultura celular

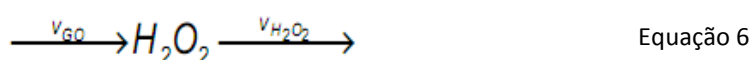
O crescimento da cultura foi realizado segundo o método descrito em Oliveira-Marques *et al.*, 2007. O meio utilizado foi RPMI complementado com soro bovino fetal (FBS) a 10% (v/v), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL. As células foram mantidas numa estufa de atmosfera húmida com 5% CO₂ Snijders CO190TC-20 a 37° C. O seu crescimento ocorre em monocamadas subconfluentes, sendo passadas a cada 2-3 dias, consoante a confluência. O *stock* de células foi renovado a cada 3 meses.

Uma vez que a linha celular utilizada, durante o decorrer das actividades experimentais, tem um crescimento aderente à superfície de cultura, antes de cada ensaio experimental foi necessária uma preparação prévia da linha, com 48 h de antecedência. Inicialmente, sujeitaram-se as células à acção de tripsina, para soltar as células da superfície de crescimento, de modo a ficarem em suspensão. De seguida, estas foram centrifugadas 5 min a 181 g, contadas num hemocitómetro e distribuídas pelas diferentes superfícies de ensaio a uma densidade de 50 000 células/cm². O período de espera entre a sementeira e a actividade experimental é importante na medida em que permite às células voltarem a aderir à superfície e a adquirirem a sua forma normal. Igualmente importante é a manutenção constante da densidade celular, uma vez que a obtenção do estado estacionário de H₂O₂ depende deste factor.

No dia da experiência, substituíam-se o meio da cultura de células por meio fresco, previamente aquecido e equilibrado com CO₂ na estufa de atmosfera húmida, de modo a aproximar as condições experimentais nas diferentes placas.

III.3.2 Adaptação das células a 12,5 ou 25 μM de H_2O_2 em estado estacionário

O método utilizado para o tratamento das células HeLa com um estado estacionário de H_2O_2 consiste numa adaptação do método descrito por Antunes & Cadenas, 2001. O estado estacionário de H_2O_2 é obtido pela adição de glucose oxidase e H_2O_2 na concentração final pretendida ao meio de cultura. O glucose oxidase é adicionado numa quantidade tal que leve à formação extracelular de uma quantidade de H_2O_2 que compense o consumo intracelular do H_2O_2 pelas células:



Assim, de acordo com a equação 6, depois de definida a concentração de H_2O_2 e conhecida a constante de velocidade de produção do glucose oxidase e o consumo intracelular de H_2O_2 pelas células determinou-se a quantidade de enzima necessária a adicionar ao sistema para estabelecer o estado estacionário.

A determinação da concentração de H_2O_2 presente em cada ensaio foi feita através do uso de um eléctrodo de oxigénio Oxygraph (Hansatech Instruments, UK). A linha de base foi obtida por estabilização do eléctrodo em água destilada e a curva padrão foi efectuada com concentrações conhecidas e crescentes de H_2O_2 (5, 10, 15, 20, 25 e 30 μM). Estas foram obtidas por diluições em água de uma solução mãe de H_2O_2 quantificada espectrofotometricamente a 240 nm ($\epsilon_{240\text{nm}} = 43,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). De modo a traçar a curva padrão, adicionou-se à câmara do eléctrodo 1 mL de cada solução de H_2O_2 seguido de 10 μL de catalase a 1 mg/mL, de modo a converter o H_2O_2 em O_2 e este ser detectado pelo eléctrodo de oxigénio. Para os diferentes ensaios realizados, o procedimento de leitura foi semelhante ao descrito para a curva de calibração. Por interpolação na curva-padrão obteve-se a concentração de H_2O_2 presente no ensaio.

A adaptação das células ao H_2O_2 foi induzida por exposição destas a uma dose sub-letal de 12,5 ou 25 μM de H_2O_2 em estado estacionário, durante 15, 30, 60, 120, 180 ou 360 min consoante o ensaio pretendido. A adaptação iniciou-se após ocorrer confluência da cultura (50 000 células/ cm^2 , 48 h após a sementeira). A quantificação

do H_2O_2 presente nas culturas ao longo do tempo de adaptação foi efectuada com recurso ao eléctrodo de oxigénio, de modo a controlar se o estado estacionário de H_2O_2 se mantinha à concentração de H_2O_2 pretendida.

Idealmente a titulação do estado estacionário permite a manutenção do nível de H_2O_2 constante (Antunes & Cadenas, 2000). Contudo, nem sempre foi possível obter uma concentração constante de 12,5 ou 25 μM de H_2O_2 ao longo do tempo em que decorre a exposição das células ao H_2O_2 , considerando-se válido um desvio de 15% à concentração pretendida. Assim, foram efectuadas leituras intermédias, no caso de o estado estacionário ser durante 2 ou 6 h de modo a minimizar o erro e aumentar a reprodutibilidade dos ensaios.

III.3.3 Detecção de jangadas lipídicas na membrana plasmática

A detecção das jangadas lipídicas na membrana plasmática foi efectuada por adaptação ao método descrito por Kenworthy *et al.*, 2000. Iniciou-se com 48 h de antecedência o crescimento das células (50 000 células/ cm^2), em lamelas, renovando o meio da caixa no dia da actividade experimental. Após 1 h de incubação em meio fresco, adicionaram-se glucose oxidase e H_2O_2 de modo a obter um estado estacionário de 12,5 μM durante 15, 30, 60, 120 e 360 min. No fim do estado estacionário, removeu-se o meio e lavou-se três vezes com PBS. Incubou-se 40 μL de toxina da cólera 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (diluída em PBS) durante 15 min a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas 2-3x com PBS e fixas com paraformaldeído a 4% (m/v) durante 30 min à temperatura ambiente. A montagem das lamelas foi feita com glicerol, tendo sido posteriormente observadas num microscópio confocal Leica SPE, na objectiva 63 x a óleo com uma ampliação digital 1,5 x.

As imagens obtidas através foram analisadas através do programa *Image J* (Abramoff *et al.*, 2004 e Rasband, 1997).

III.3.4 Identificação de domínios *Caveolae* - Imunofluorescência

A localização dos domínios *caveolae* em células HeLa, foi realizada por microscopia de imunofluorescência, tendo por base uma adaptação ao protocolo descrito por Engelman & Wykoff, 1997.

As células foram cultivadas em lamelas de vidro, 50 000 células/cm², 48 h antes da experiência. O meio foi renovado no dia da experiência e após 1 h, as células foram expostas a um estado estacionário de H₂O₂ 12,5 µM durante 15, 30, 60, 120, 180 e 360 min. De seguida, lavaram-se as células com PBS. Estas foram fixas com paraformaldeído a 4% (m/v) durante 20 min. Posteriormente, a permeabilização das células foi efectuada com triton X-100 a 0,1% (v/v) e BSA a 0,5% (m/v) durante 10 min. As células foram novamente lavadas com PBS e incubadas durante 10 min com NH₄Cl 25 mM. Este último foi removido por lavagem com PBS, sendo as células incubadas com o anticorpo primário na diluição indicada no quadro 1 com BSA a 0,5% (m/v) durante 1 h. Lavaram-se as lamelas 3 vezes com PBS durante 5 min e incubou-se o anti-corpo secundário na diluição indicada no quadro 1 durante 1 h. Por fim, as células foram lavadas 3 vezes com PBS durante 5 min. A montagem da lamela sob a lâmina de vidro foi efectuada com glicerol e posteriormente foram observadas no microscópio confocal Leica SPE, na objectiva 63 x a óleo com uma ampliação digital 1,5 x.

A marcação dos núcleos de modo a corroborar a especificidade do anticorpo secundário foi feita com DAPI diluído 1:1000 (v/v) em água, durante 1 min à temperatura ambiente, seguida de lavagem abundante com PBS. Neste caso, como o microscópio confocal não permite ver a marcação com DAPI as células foram observadas num microscópio *Olympus BX41*, na objectiva de 40 x e a recolha de imagens foi efectuada com uma máquina fotográfica *Olympus Digital Camera Camedia C-4040 ZOOM*, CCD 4 100 000 Pixels.

O processamento das imagens obtidas foi realizado no programa *Image J* (Abramoff *et al.*, 2004 e Rasband, 1997).

Quadro 1: Diluições dos anticorpos primários e secundários utilizados para análise por microscopia de imunofluorescência.

Anticorpos	Referência	Animal de produção	Diluição
Primário			
Anti-Caveolina-1	Santa Cruz, sc894	Coelho	1:400
Anti-Fosfocaveolina	Novus Biologicals, EPR2288Y	Coelho	1:200
Secundário			
Anti-coelho Alexa 488	Molecular Probes	Cabra	1:500

III.3.5 Ensaios de sobrevivência celular

A sobrevivência das células após exposição a concentrações crescentes de H_2O_2 ou fármacos anti-cancro foi determinada usando uma adaptação ao método descrito por Iida & Takara (2001).

A cultura de células HeLa foi previamente preparada de modo a obter $1,5 \times 10^6$ células por placa de Petri de 100 mm. No dia da actividade experimental o meio foi substituído por meio fresco e, após 1 h de incubação, as células foram submetidas a um estado estacionário de H_2O_2 25 μM durante 2 h ou 12,5 μM durante 6 h. Terminado este período, o meio foi removido, as células lavadas com PBS e em seguida sujeitas a tripsina. A reacção com a tripsina foi interrompida por adição de meio e uma centrifugação durante 5 min a 181 g , as células foram ressuspensas e semeadas em placas de 96 poços. Esperou-se 1 h e adicionaram-se concentrações crescentes de H_2O_2 , doxorubicina ou cisplatina às células previamente tratadas e às células controlo. Após 20 h, adicionou-se alamar blue e aguardou-se 3 h. No fim, observaram-se os resultados num leitor de microplacas Spectra Max Gemini usando os comprimentos de onda Ex 560 nm/Em 590 nm.

III.3.6 Medição dos níveis da peroxidação lipídica com ácido tiobarbitúrico

Os níveis da peroxidação lípida da membrana plasmática foram medidos usando ácido tiobarbitúrico (TBA) recorrendo a uma adaptação do método descrito por Ohkawa & Ohishi, 1978.

Cultivaram-se células HeLa de modo a conter $1,5 \times 10^6$ células em cada caixa de Petri de 100 mm, ao fim de 2 dias. No dia da actividade experimental o meio foi previamente trocado e após 1 h de incubação submeteram-se as células a um estado estacionário de H_2O_2 12,5 μ M durante 6 h. Guardou-se o meio utilizado num tubo de 15 mL e lavaram-se as células com PBS. Removeu-se o PBS e colocou-se o tripsina. A inactivação da tripsina ocorreu por adição do meio armazenado (de modo a diminuir a perda de células), seguindo-se uma centrifugação durante 5 min a 181 g. Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em PBS, repetindo-se a centrifugação. O precipitado foi ressuspendido em PBS e foi efectuada uma contagem de células no hemocitómetro. Retirou-se o volume de suspensão equivalente a 3×10^6 células, sendo o restante utilizado para quantificação proteica. A suspensão foi centrifugada nas condições anteriores e o precipitado foi ressuspendido em PBS. A suspensão foi colocada num tubo *ependorf* e adicionou-se SDS 2,7% (m/v), ácido acético 20% (m/v) a pH 3,5 e ácido tiobarbitúrico 0,8% (m/v). Incubou-se a amostra a 95°C durante 1 h. Centrifugaram-se os tubos durante 10 min a 3584 g e transferiu-se o sobrenadante para uma placa de 96 poços. A leitura de fluorescência foi efectuada no leitor de microplacas Spectra Max Gemini usando os comprimentos de onda Ex 530 nm/ Em 550 nm. Foi feita uma curva padrão com malondialdeído diluído em água em concentrações no intervalo 0,01; 0,1; 1; 5; 10 e 25 μ M.

III.3.7 Preparação de extractos proteicos totais

Os extractos proteicos totais foram preparados por adaptação do método descrito em Luo & Doshi, 2004. Iniciou-se a exposição das células ao H_2O_2 em estado estacionário, em placas de Petri com 100 mm de diâmetro contendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células, para os tempos desejados (15, 30, 60 e 120 min). Quando terminado o estado estacionário, o meio das placas de Petri é removido, as

placas são colocadas em gelo e as células lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, as células são congeladas com azoto líquido e armazenadas a -80°C.

No dia da análise proteica, raspam-se as células com PBS e centrifugou-se a 5000 *g*, 5 min a 4°C. O precipitado foi resuspendido em 500 µL de tampão RIPA [Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 1% (v/v) e desoxicolato de sódio 0,25% (m/v)] complementado no próprio dia com um *cocktail* de inibidores de proteases (0,0015 mg/mL benzamidina, 0,01 mg/mL leupeptina, 0,001 mg/mL pepstatina A, 1 mM PMSF e 2 mM DTT) e colocado a 4°C durante 10 min. Posteriormente centrifugou-se a amostra a 1400 *g*, 15 min a 4°C. Recolheu-se o sobrenadante e quantificou-se a quantidade de proteína da amostra pelo método de Bradford.

III.3.8 Quantificação proteica pelo método de Bradford

A quantificação proteica foi feita pelo método de Bradford descrito em Bradford, 1976. Prepararam-se diferentes concentrações de BSA (1-10 µg), para um volume final de 100 µL, sendo estas soluções usadas para efectuar a curva de calibração do método em estudo. De seguida, as amostras obtidas foram diluídas em PBS, para o doseamento pelo método do TBA entre 1/20 e 1/50 e as amostras dos extractos proteicos de 1/40, de modo a estarem complementadas dentro da curva de calibração. Todas as diluições foram feitas em água. A cada amostra adicionou-se 1 mL de reagente de Bradford. Transferiram-se 200 µL de cada amostra para uma microplaca e incubou-se durante 10 min à temperatura ambiente. A leitura de absorvência a 595 nm foi efectuada num leitor de microplacas Tecan Sunrise acoplado ao software RdrOle4. A quantificação proteica realizou-se para normalizar os dados relativos à peroxidação lipídica e imediatamente antes de analisar as amostras em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), de modo a adicionar a mesma quantidade de proteína em cada poço.

III.3.9 Electroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

A electroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida foi realizada segundo a técnica de Laemmli, descrita em Laemmli, 1970. A separação dos extractos proteicos por SDS-PAGE foi efectuada num gel de resolução de poliacrilamida a 15% (v/v) [acrilamida/bisacrilamida; 30:0,8 % (m/m)], com um gel de concentração de poliacrilamida a 5% (v/v). Ambos os géis possuíam uma espessura de 1,5 mm e foram preparados pelo método descrito em Sambrook & Russel, 2001.

Consoante os resultados no doseamento da proteína (ver III.4.8. Extractos proteicos totais), normalizou-se a quantidade de proteína a aplicar, sendo aplicada igual quantidade em todos os poços do gel. O volume da quantidade de proteína a aplicar, de cada extracto, foi complementado com água e tampão de amostra para um volume final de 50 µL. As amostras foram fervidas a 95°C durante 5 min antes de serem aplicadas no gel e foi utilizada uma mistura de proteínas de massa molecular conhecida (marcadores), de modo a localizar a proteína de interesse. A separação das proteínas na electroforese foi efectuada em aparelhos de mini-gel BIORAD Mini-Protean II, utilizando tampão de electroforese [Tris base 0,025 M pH 8,3; glicina 0,102 M; SDS 0,1% (p/v)], a 25 mA por cada gel analisado, até o azul de bromofenol atingir o fim do gel. Finda a electroforese, procedeu-se à electrotransferência das proteínas separadas no gel para uma membrana de nitrocelulose.

III.3.10 Electrotransferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose

A electrotransfrência das proteínas separadas na electroforese para uma membrana de nitrocelulose num aparelho de transferência semi-seco (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell Bio-Rad) utilizando uma fonte de tensão Amersham Pharmacia Biotech EPS601, foi efectuada segundo o método descrito por Bjerrum & Schafer-Nielsen, 1986. Tanto o gel de poliacrilamida, como a membrana de nitrocelulose, foram equilibrados durante 30 min, numa solução tampão de transferência [Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v), SDS 0,0375% (m/v)]. De seguida, dois grupos de 6 folhas de papel de filtro 3MM foram saturados na mesma solução e montou-se o

sistema mostrada na figura 11. Este consiste em colocar o papel de filtro nos topos, em contacto com os eléctrodos e no meio a membrana sobreposta com o gel (Figura 11).

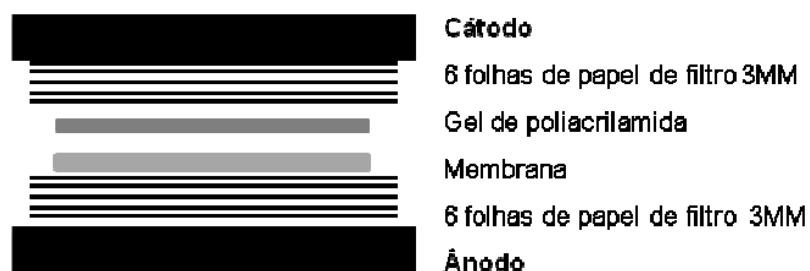


Figura 11: Esquema de montagem da transferência de proteínas de um gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose, num sistema semi-seco. O sistema é composto por: Ânodo – 6 folhas de papel de filtro – membrana de nitrocelulose – gel – 6 folhas de papel de filtro – Cátodo, de acordo com a representação da figura.

A electrotransferência de proteínas realizou-se durante 1 h a uma corrente constante de $0,8 \text{ mA/cm}^2$ de membrana, a uma voltagem nunca superior a 25 V.

O sucesso da transferência foi observado através da coloração reversível da membrana de nitrocelulose com uma solução Ponceau S (Ponceau S 0,2 g; ácido tricloroacético 3 g; ácido sulfosalicílico 3 g e água destilada até um volume final de 100 mL). O excesso de corante foi removido através de lavagens com água destilada.

III.3.11 *Western blotting*

O *Western blotting* foi realizado por adaptação do protocolo descrito em Gershoni & Palade, 1983. Após a imobilização das proteínas na membrana de nitrocelulose, a membrana foi bloqueada com leite magro desnatado a 5% (m/v) em PBS, durante 1 h à temperatura ambiente com agitação orbital. De seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário, de acordo com as diluições indicadas no Quadro 2, durante 1 h à temperatura ambiente com agitação orbital. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes durante 10 min com Tween-20 0,1 % (v/v) em PBS e incubada com o anticorpo secundário, em solução de bloqueamento, durante 1 h à temperatura ambiente com agitação orbital. No fim, o excesso de

anticorpo secundário é removido lavando a membrana 3 vezes com PBS durante 10 min, com agitação orbital.

Quadro 2: Diluições dos anticorpos primários e secundários utilizados para análise por *Western blotting*. Estas diluições foram efectuadas em solução de bloqueamento 5% (m/v) de leite magro desnatado em PBS.

Anticorpos	Referência	Animal de produção	Diluição
Primário			
Anti-Caveolina-1	Santa Cruz, sc894	Coelho	1:1000
Anti-Fosfocaveolina	Novus Biologicals, EPR2288Y	Coelho	1:500
Secundário			
Anti-IgG coelho	Santa Cruz, sc2004	Cabra	1:5000

A utilização de um substrato quimioluminescente permitiu visualizar a reacção do antigénio, tendo-se recorrido ao uso do *kit Enhanced Chemiluminescence* (GE Healthcare®). A membrana foi incubada 1 min com a solução de detecção e posteriormente exposta a uma chapa autoradiográfica que, após o tempo desejado, foi revelada e fixa com os devidos reagentes.

O tratamento das imagens obtidas foi realizado utilizando o programa *Image J* (Abramoff *et al.*, 2004 e Rasband, 1997).

III.3.12 Análise estatística

Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de n experiências independentes. A comparação de resultados entre dois grupos distintos foi feita realizando o teste t de *Student* bilateral, assumindo variâncias iguais entre os grupos. Consideraram-se significativos os resultados em que o valor de $p < 0,05$. O programa utilizado foi o Excel do Microsoft Office® 2007 ou o Sigma Stat 3.5.

IV. RESULTADOS

IV.I. Análise da influência do estado estacionário de H_2O_2 na sobrevivência celular

Um dos aspectos mais importantes de resposta das células à presença de H_2O_2 é a sua capacidade de adaptação a exposições externas deste agente adquirindo resistência. Esta adaptação reflecte-se num aumento da sobrevivência aquando da exposição das células pré-expostas a uma concentração letal de H_2O_2 ou outros agentes. Estudos mostraram que a permeabilidade do H_2O_2 através da membrana plasmática é regulada pelo H_2O_2 durante a adaptação de células *Saccharomyces cerevisiae* a este agente e que estas alterações ocorrem para processos de adaptação curtos acompanhados por um aumento da anisotropia de fluorescência, indicado que a fluidez da membrana diminuiu (Pedroso, N. *et al.*, 2009). Em células HA-1 (derivadas de ovários de hamster) foi observado que após adição *bolus* de H_2O_2 entre 150-300 μM durante 18 h, mostraram que nas células tratadas com H_2O_2 ocorre inibição do crescimento e divisão celular, diminuindo a sobrevivência celular. No entanto, para uma concentração entre 3-15 μM de H_2O_2 , durante o mesmo período de tempo, observou-se um estímulo do crescimento e divisão celular. A utilização de uma baixa concentração de H_2O_2 pode causar assim uma resposta adaptativa, diminuindo a toxicidade do H_2O_2 quando estas células são expostas a concentrações letais deste agente (Wiese *et al.*, 1995). Foi demonstrado que para baixas concentrações de H_2O_2 a presença de este induz pelo menos a síntese de 20 novas proteínas necessárias à adaptação celular (Lee & Um, 1999).

Assim, sabendo que nas células HA-1 a presença de H_2O_2 a baixas concentrações promove adaptação celular e um aumento da sobrevivência aquando da exposição a doses letais de H_2O_2 , levou a que segundo estas informações fossem estabelecidas as condições ideais para ocorrer adaptação celular em células HeLa.

Os estudos de adaptação das células HeLa ao H_2O_2 foram realizados através de um estado estacionário de 2 h a 25 μM de H_2O_2 . De seguida as células foram expostas a doses crescentes de H_2O_2 , com o intuito de observar se um aumento da

concentração de H_2O_2 leva ao aumento de sobrevivência nas células pré-expostas relativamente às células controlo (Figura 12).

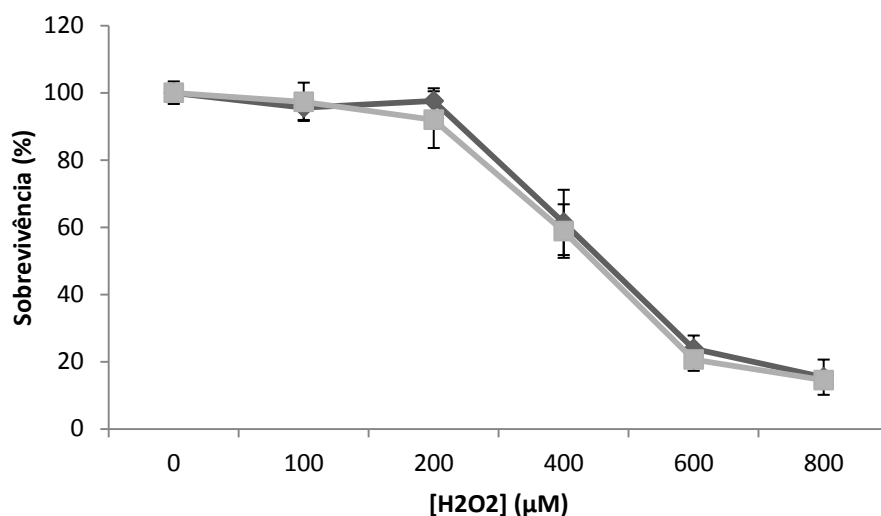


Figura 12: Análise do efeito de doses letais de H_2O_2 na sobrevivência celular de células HeLa controlo (◆) e pré-submetidas a estado estacionário de H_2O_2 (■). As células HeLa foram expostas a um estado estacionário de H_2O_2 25 μM durante 2 h e posteriormente sujeitas a doses crescentes deste agente. Os resultados apresentados são a média \pm desvio padrão, de um total de $n = 4$ experiências independentes.

Através da figura 12 observa-se que não existem diferenças significativas na sobrevivência celular a concentrações letais de H_2O_2 entre as células controlo e as células pré-expostas a um estado estacionário de 25 μM de H_2O_2 . Existe uma diminuição gradual da sobrevivência celular com o aumento da dose de H_2O_2 mas este fenómeno tanto ocorre nas células controlo como nas células sujeitas a um estado estacionário de 25 μM de H_2O_2 durante 2 h.

Sabe-se da literatura que células HeLa expostas a um estado estacionário de 12,5 μM durante 6 h, apresentam uma modelação da expressão génica mais elevada do que células sujeitas a um estado estacionário de 25 μM durante 1 h (Oliveira-Marques & Antunes, 2007). Tendo em conta estes resultados, levantou-se a hipótese de 2 h não serem suficientes para promover as alterações que levem à aquisição de resistência em células pré-expostas a um estado estacionário de H_2O_2 . Assim, alterou-se o procedimento experimental onde em vez de submeter as células a um estado

estacionário de H_2O_2 a $25\ \mu\text{M}$ durante 2 h, as células foram sujeitas a um estado estacionário de $12,5\ \mu\text{M}$ H_2O_2 durante 6 h (Figura 13).

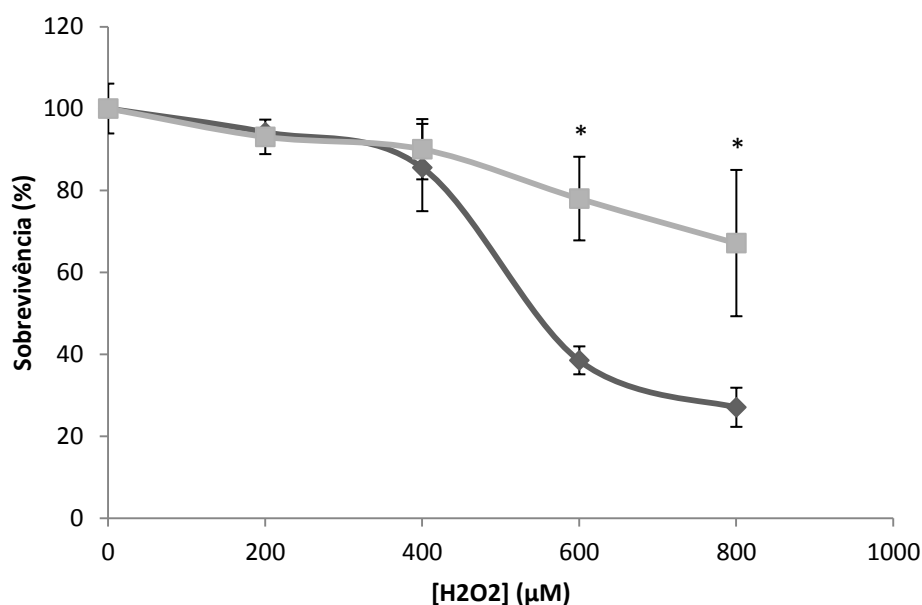


Figura 13: Adaptação de células HeLa ao H_2O_2 . Análise do efeito de doses letais de H_2O_2 na sobrevivência celular de células HeLa controle (◆) e pré-submetidas a um estado estacionário de H_2O_2 $12,5\ \mu\text{M}$ durante 6 h (■). Os resultados apresentados são a média \pm desvio padrão, de um total de $n = 4$ experiências independentes. * $p < 0,05$.

Na figura 13 observa-se que para concentrações de H_2O_2 inferiores a $400\ \mu\text{M}$ não existem diferenças significativas na sobrevivência entre as células controle e as células pré-expostas a um estado estacionário de $12,5\ \mu\text{M}$ de H_2O_2 durante 6 h. No entanto, para concentrações de H_2O_2 superiores a $600\ \mu\text{M}$ ocorre um aumento de sobrevivência nas células sujeitas a um estado estacionário de $12,5\ \mu\text{M}$ de H_2O_2 durante 6 h em comparação com as células controle. Isto indica que as células HeLa pré-submetidas a H_2O_2 $12,5\ \mu\text{M}$ durante 6 h se adaptaram ao H_2O_2 pois apresentam maior resistência a doses letais de H_2O_2 que as células controle.

Tendo em conta os resultados anteriores, os estudos subsequentes foram realizados em estado estacionário a $12,5\ \mu\text{M}$.

IV.II. Análise da influência do H₂O₂ na alteração de propriedades da membrana plasmática em células HeLa

V.II.1 Análise da influência do H₂O₂ na peroxidação lipídica

A presença de H₂O₂ no meio pode provocar a peroxidação dos lípidos das membranas. Dado que as condições de adaptação implicaram uma exposição relativamente prolongada no tempo (6 h) começou-se por analisar os efeitos do H₂O₂ na alteração das propriedades das membranas, medindo a peroxidação lipídica. Este processo consiste numa reacção em cadeia de oxidação de lípidos por radicais livres, promovendo danos celulares. Afecta principalmente ácidos gordos polinsaturados devido à existência de ligações duplas (Giorgio *et al.*, 2007). Para esta determinação recorreu-se a um ensaio com o ácido tiobarbitúrico que a pH ácido, ao reagir com o malonaldeído, um produto secundário da peroxidação lipídica, produz um composto corado possível de medir por espectrofotometricamente e também por fluorimetria (Figura 14) (Ohkawa & Ohishi, 1978).

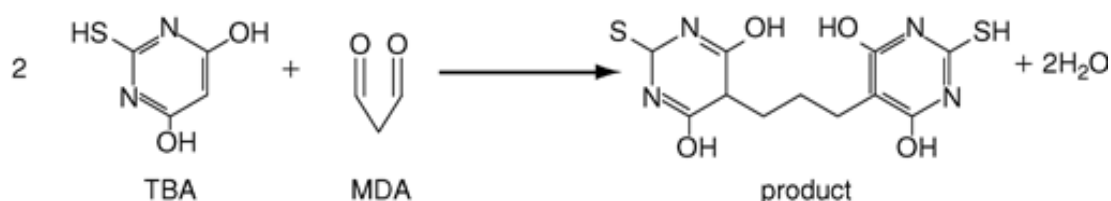


Figura 14: Representação esquemática da reacção do ácido tiobarbitúrico com o malonaldeído e consequentes produtos da reacção.

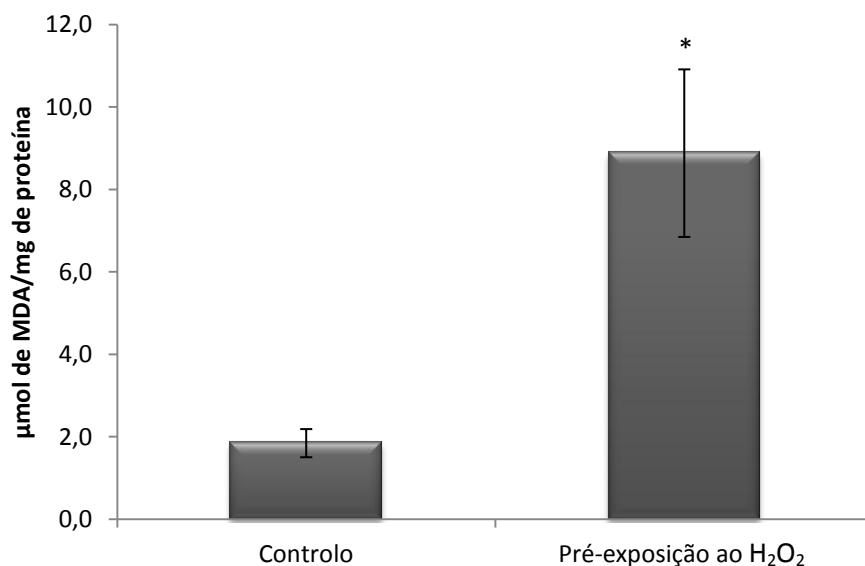


Figura 15: A exposição de células HeLa ao H₂O₂ leva a um aumento da peroxidação lipídica. As células HeLa foram expostas a um estado estacionário de 12,5 μM H₂O₂ durante 6 h. As determinações fluorimétricas foram feitas usando os comprimentos de onda Ex 530 nm/ Em 550 nm. Os resultados apresentados são a média ± desvio padrão, de um total de n = 4 experiências independentes. *p < 0,05

Como se pode observar na figura 15, a exposição de células HeLa a um estado estacionário de 12,5 μM de H₂O₂ durante 6 h leva a um aumento de aproximadamente 4 vezes na peroxidação lípidica da membrana em relação às células controlo. No entanto, este resultado é relevante pois indica que, apesar de não haver perda de viabilidade, processos oxidativos que danificam a membrana são aumentados pela adaptação ao H₂O₂.

IV.II.2 Análise da influência do H₂O₂ nas jangadas lipídicas

De modo a observar se um estado estacionário de H₂O₂ promove alterações nas jangadas lipídicas da membrana celular, foi realizada uma marcação fluorescente destes domínios recorrendo à CTxB que se liga especificamente aos receptores GM1,

para diferentes tempos de exposição a 12,5 μM de H_2O_2 em estado estacionário.

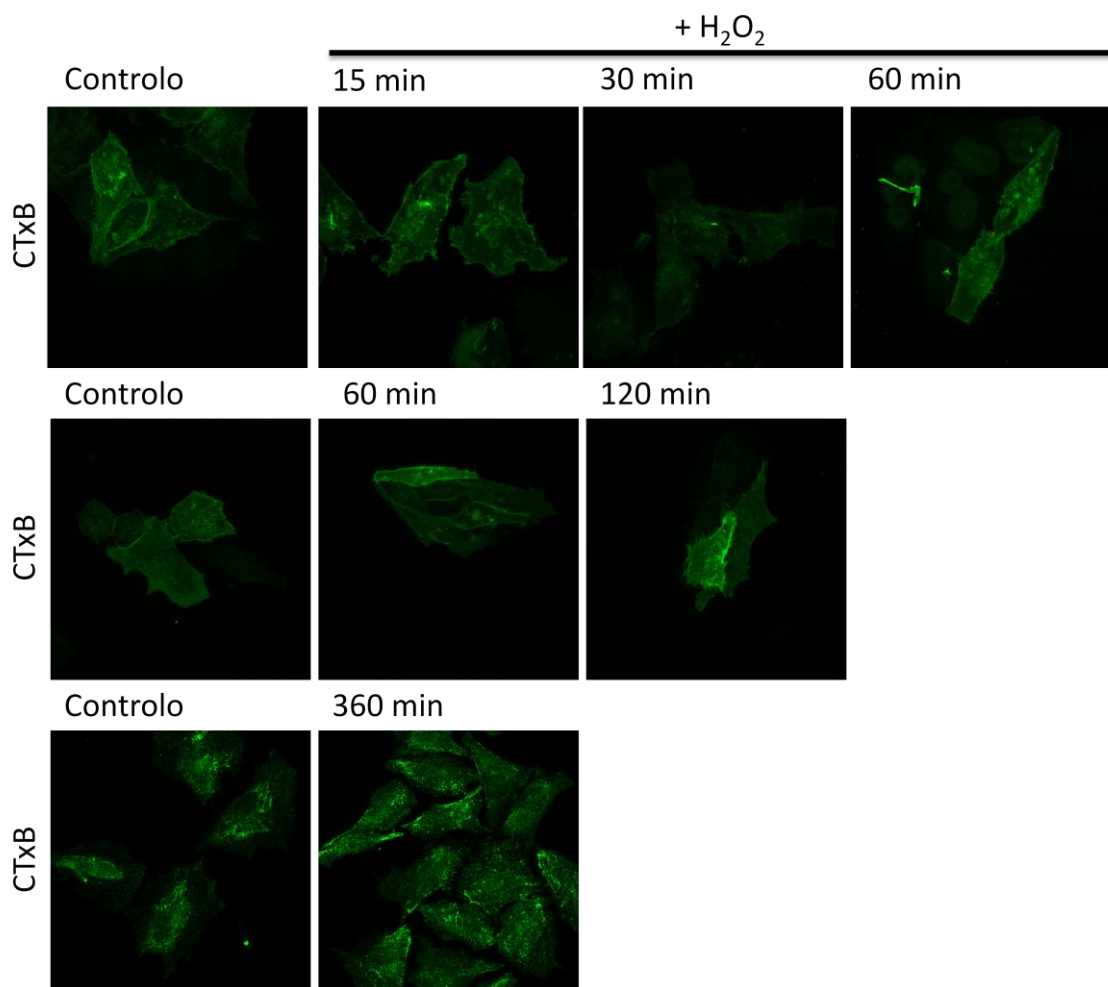


Figura 16: Análise por microscopia confocal do efeito do H_2O_2 nas jangadas lípidicas, por marcação com CTxB, em células HeLa. As células foram expostas a um estado estacionário a 12,5 μM de H_2O_2 durante os diferentes tempos indicados. As imagens são uma projecção em Z das diferentes fatias obtidas através da microscopia confocal. Estes resultados são representativos de um total de $n = 4$ experiências independentes.

A pré-exposição a um estado estacionário de H_2O_2 não aparenta modificar a membrana plasmática ou a quantidade de proteína internalizada em comparação com o controlo excepto para os tempos de exposição de 30 e 360 min (Figura 16). Ao fim de 30 min de exposição a intensidade de fluorescência parece menor do que a fluorescência presente em células controlo e ao fim de 360 min em algumas células ocorre uma acumulação de proteína na membrana plasmática.

No entanto, através deste método apenas é efectuada uma análise qualitativa sendo necessário mais estudos de modo a testar se ocorrem de facto estas diferenças e a quantificá-las, caso existam. Algumas abordagens que podem ser utilizadas são, por exemplo a quantificação do colesterol, uma vez que se encontra presente em grande quantidade nestes domínios (Wolf *et al.*, 2002) ou através da medição dos níveis de endocitose da CTxB (Torgersen *et al.*, 2001).

IV.II.2 Análise da Influência do H₂O₂ nos domínios *caveolae*

Com o intuito de observar se a pré-exposição ao H₂O₂ em estado estacionário, promove alterações nos domínios *caveolae* da célula, quer na sua localização quer a nível de expressão da caveolina-1, foi realizada uma imunocitoquímica, para diferentes tempos de exposição a 12,5 µM de H₂O₂ em estado estacionário.

Em experiências preliminares e de modo a comprovar a especificidade do anticorpo secundário, foram utilizadas células controlo na presença e ausência de anticorpo primário (anti-caveolina-1) posteriormente marcadas com DAPI (Figura 17).

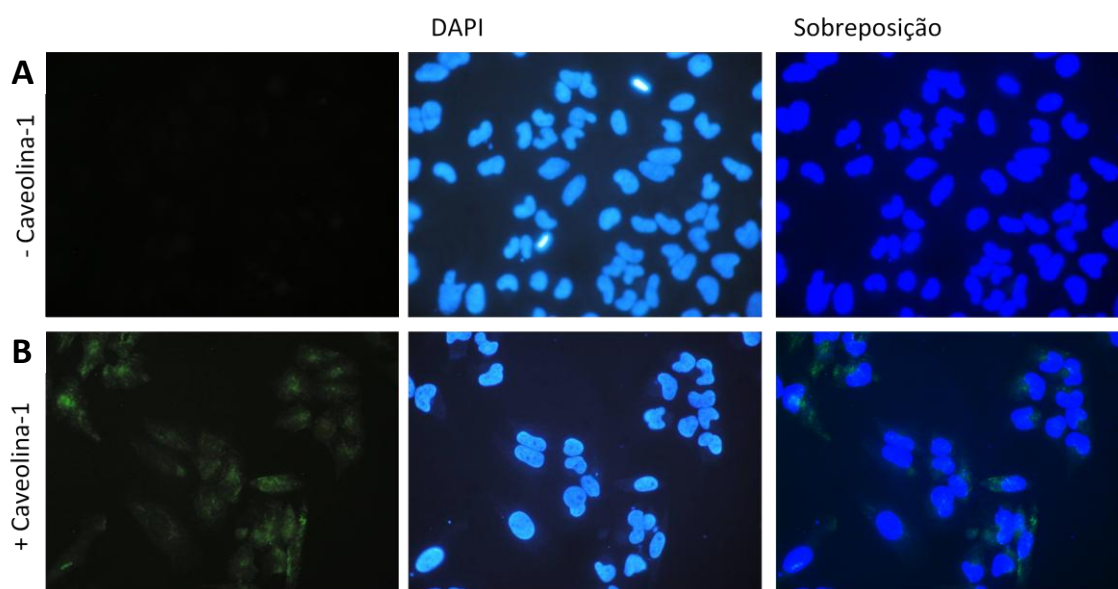


Figura 17: Análise por microscopia de fluorescência da especificidade do anticorpo secundário. (A) Células controlo na ausência de anticorpo anti-caveolina-1 e (B) Células controlo na presença de anticorpo anti-caveolina-1. Em ambos os casos o DNA encontra-se marcado com DAPI. Estes resultados são representativos de um total de n = 3 experiências independentes.

A partir dos resultados da figura 17, observa-se que na ausência de anticorpo primário (anti-caveolina-1) não é visível nenhuma marcação para além da marcação nuclear (azul), enquanto na presença de anticorpo primário, para além da marcação nuclear (azul), existe a marcação da proteína caveolina-1 (verde). Assim, como o anticorpo secundário não promove a formação de ligações inespecíficas na célula foi utilizado nos estudos subsequentes da proteína caveolina-1.

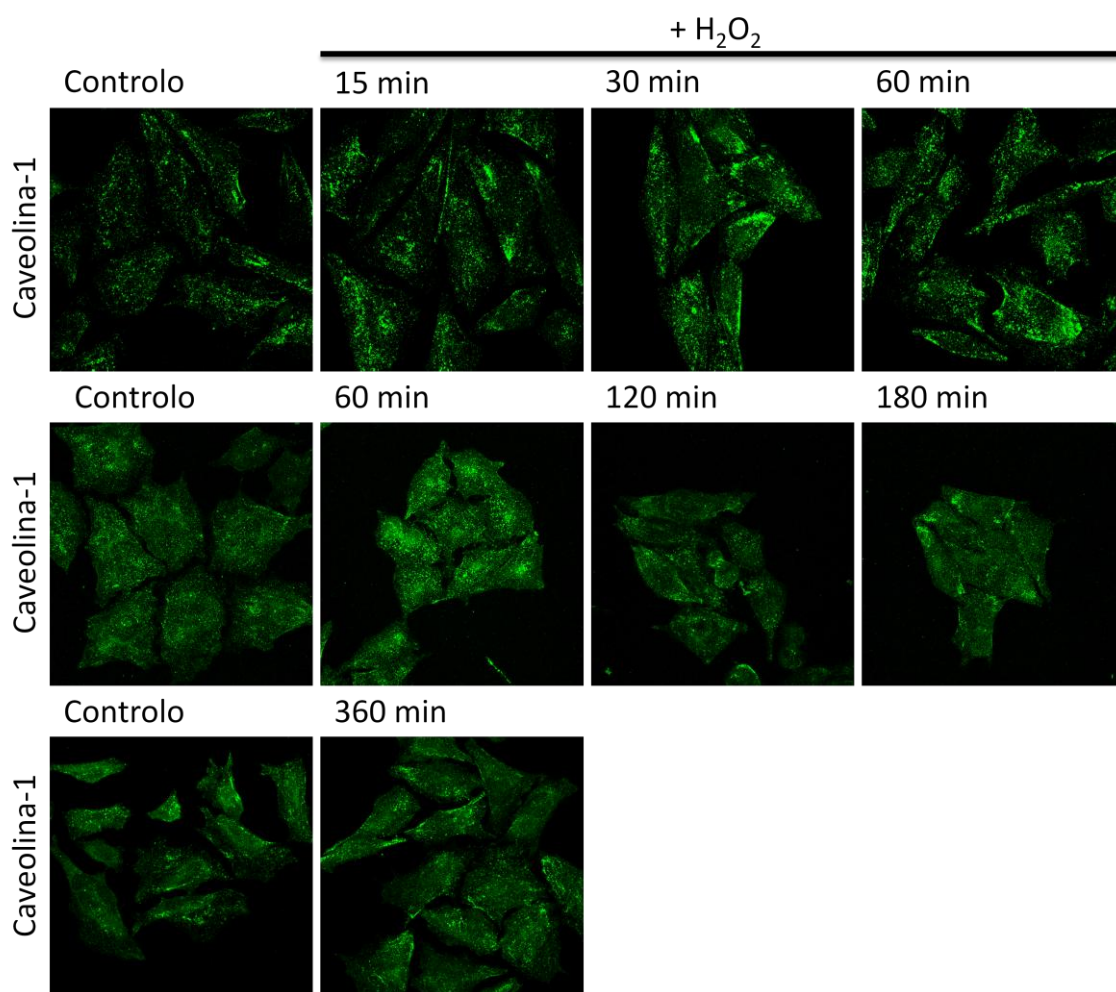


Figura 18: Análise por microscopia confocal do efeito do H_2O_2 na proteína caveolina-1 nos domínios caveolae em células HeLa. As células foram expostas a um estado estacionário a $12,5 \mu M$ de H_2O_2 durante os diferentes tempos indicados. As imagens são uma projecção em Z das diferentes fatias obtidas através da microscopia confocal. Estes resultados são representativos de um total de $n = 4$ experiências independentes.

A figura 18 sugere que a presença de H_2O_2 leva a um aumento de expressão dos níveis de caveolina-1, uma vez que se observa um aumento da fluorescência das células expostas ao H_2O_2 em estado estacionário em comparação com células controlo. No entanto, esse aumento da intensidade de fluorescência parece ser variável ao longo tempo de exposição. Já ao nível de variações na membrana plasmática, caso ocorram, não são tão visíveis por este método. Para tempos curtos (15 e 30 min) existem células que aparentam possuir um maior aglomerado de caveolina-1 na membrana plasmática mas não é um facto observado em todas as células da mesma experiência. Contudo, através da metodologia adoptada não é possível concluir com clareza variações da caveolina-1, quer na membrana plasmática quer a nível da sua expressão. Deste modo, foi feita em paralelo uma determinação da proteína caveolina-1 em células HeLa expostas a $12,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em estado estacionário por *Western blotting* (Figura 19).

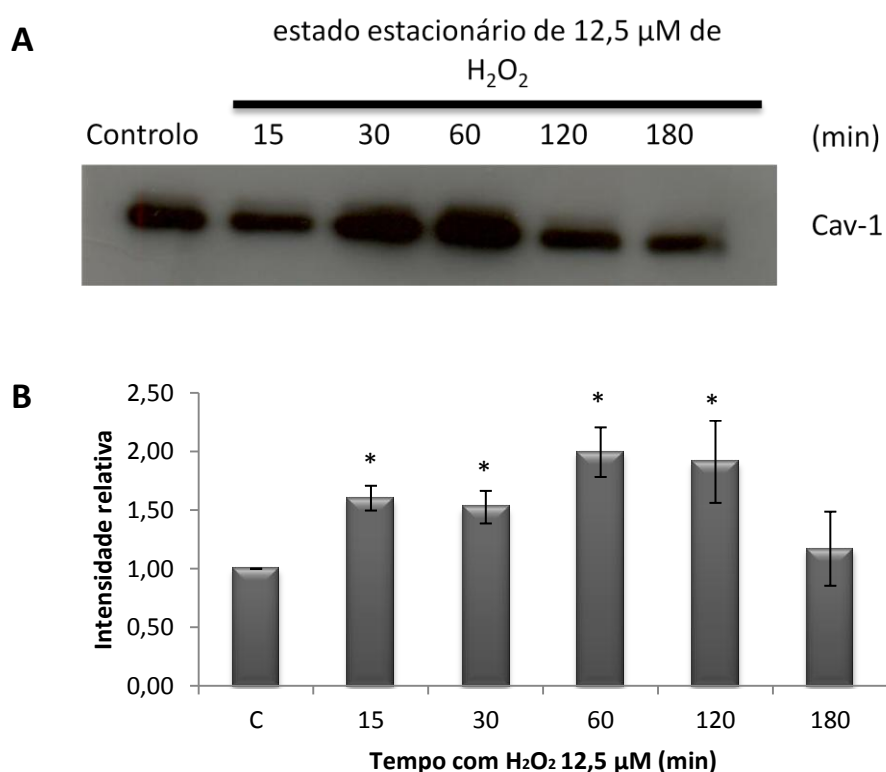


Figura 19: Análise por *Western blotting* do efeito do H_2O_2 nos níveis da proteína caveolina-1 em células HeLa. As células foram expostas a $12,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em estado estacionário a diferentes tempos (0, 15, 30, 60, 120 e 180 min). Foram preparados extractos proteicos totais com cerca de $60 \mu\text{g}$ de proteína e analisados num gel SDS-PAGE 15% (m/v). Seguiu-se a variação dos níveis da proteína caveolina-1 por *Western blotting* utilizando um anticorpo contra a mesma. (a) *Western blotting* representativo das várias experiências realizadas (b) gráfico relativo à quantificação da caveolina-1 nos extractos totais

normalizados ao *Ponceau S red*. Os resultados a média \pm SD de um total de $n = 3$ experiências independentes. * $p < 0,05$ vs controlo

Após normalização dos dados, na figura 19, observa-se que a presença de H_2O_2 promove, em geral, um aumento de expressão de caveolina-1. Para tempos curtos de exposição (15 e 30 min) ao H_2O_2 em estado estacionário, observa-se nas células tratadas com H_2O_2 um aumento do nível de caveolina-1 relativamente às células controlo de aproximadamente 50% ($1,60 \pm 0,11$ e $1,53 \pm 0,14$, respectivamente), sendo o seu máximo atingido ao fim de 60 min de exposição, onde os níveis atingem o dobro da concentração inicial ($1,99 \pm 0,21$). Nas células expostas ao H_2O_2 em estado estacionário durante 180 min, os níveis de caveolina-1 parecem diminuir para os níveis nas células controlo.

O *Western blotting* veio assim confirmar os resultados obtidos através da imunocitoquímica, onde era sugerido que após uma pré-exposição das células ao H_2O_2 ocorria um aumento dos níveis de caveolina-1.

A caveolina-1 foi identificada como a maior proteína fosforilada em células de sarcoma transformadas com vírus (Parat *et al.*, 2002). A fosforilação ocorre na tirosina 14 (Tyr¹⁴) e é o principal alvo da cinase Src. As consequências da fosforilação da caveolina-1 ainda não são totalmente conhecidas mas podem promover alterações em regiões próximas de locais de adesão, levar à transformação celular, progressão do tumor ou apoptose, consoante a composição dos domínios *caveolae* (Patel *et al.*, 2009). A fosforilação desta proteína pode ser estimulada por factores de crescimento ou através de *stress* oxidativo. Estudos em células NIH 3T3 e células endoteliais tratadas com H_2O_2 mostraram um aumento da fosforilação da Tyr¹⁴ (Parat *et al.*, 2002). Estes resultados levantaram a hipótese de que, tal como acontece para a proteína normal, a proteína fosforilada poderia sofrer alterações na sua localização ou ao nível da fosforilação por pré-exposição a um estado estacionário de H_2O_2 . Assim, realizou-se uma imunocitoquímica, com um anticorpo anti-caveolina-1 fosforilada, para diferentes tempos de exposição a 12,5 μ M de H_2O_2 em estado estacionário (Figura 20). Uma vez que o anticorpo secundário utilizado foi o mesmo que no ensaio da caveolina-1 não foi necessário voltar a testar a sua especificidade.

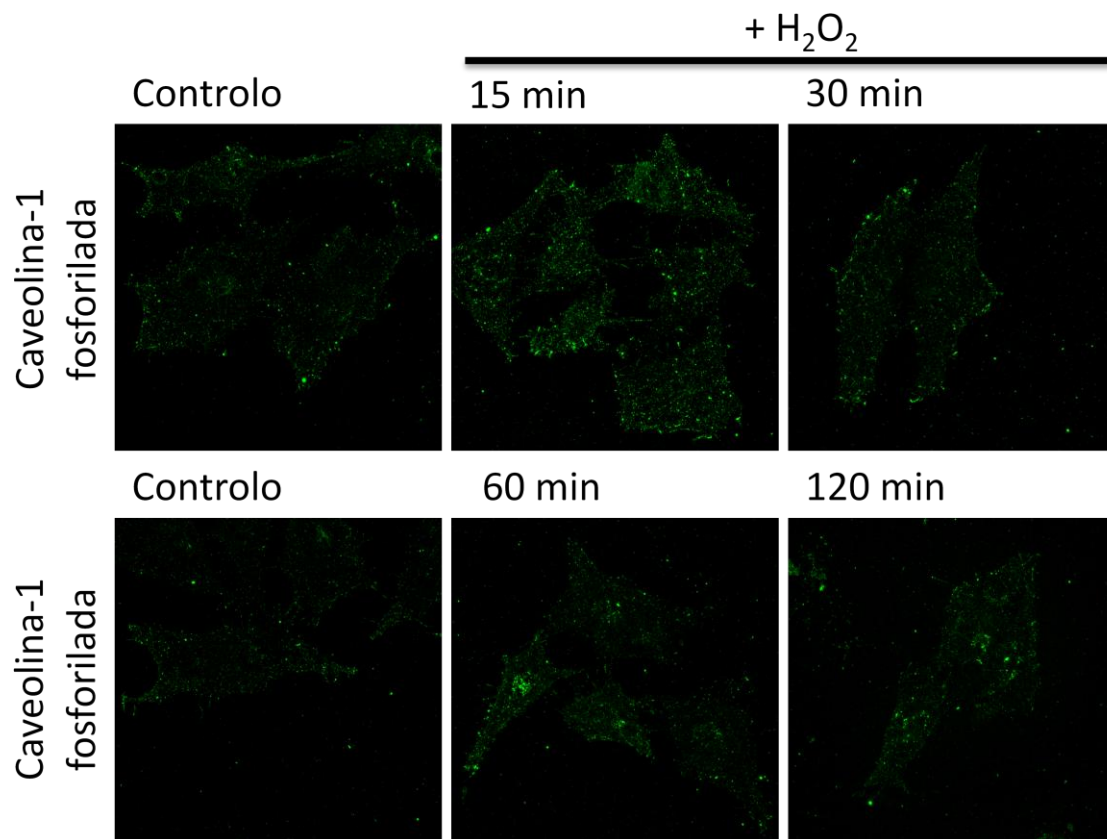


Figura 20: Análise por microscopia confocal do efeito do H_2O_2 na proteína caveolina-1 fosforilada nos domínios caveolae em células HeLa. As células foram expostas a um estado estacionário a $12,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 aos diferentes tempos de exposição indicados. As imagens são uma projecção em Z das diferentes fatias obtidas através da microscopia confocal. Estes resultados são representativos de um total de $n = 4$ experiências independentes.

O sinal para a proteína caveolina-1 fosforilada é baixo, quer nas células controlo quer nas células sujeitas a uma pré-exposição ao H_2O_2 (Figura 20). A exposição ao H_2O_2 em estado estacionário parece aumentar ligeiramente os níveis da proteína, uma vez que as células se encontram ligeiramente mais marcadas do que as células controlo.

No caso da caveolina-1 fosforilada, a figura 21 mostra um ensaio único e preliminar. Foram utilizados extractos totais de proteína, de células HeLa expostas a $12,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em estado estacionário, a diferentes tempos de exposição.

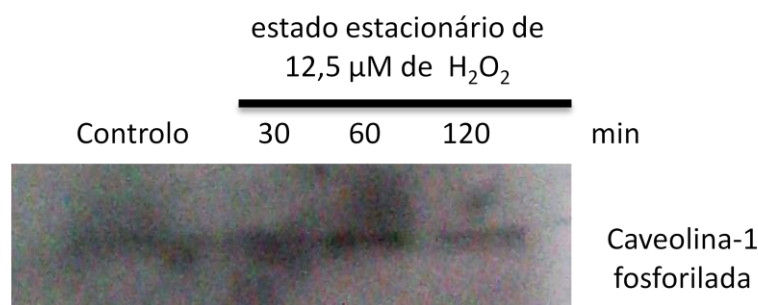


Figura 21: Análise preliminar por *Western blotting* do efeito do H_2O_2 na proteína caveolina-1 fosforilada em células HeLa. As células foram expostas a 12,5 μM de H_2O_2 em estado estacionário a diferentes tempos (0, 60, 120 e 180 min). Foram preparados extractos totais com cerca de 60 μg de proteína e analisados num gel SDS-PAGE 15% (m/v). Seguiu-se a variação dos níveis da proteína caveolina-1 por *Western blotting* utilizando um anticorpo contra a mesma (n=1).

Como é possível observar na figura 21, os níveis de proteína caveolina-1 fosforilada são muito baixos não permitindo uma quantificação. No entanto, visualmente observa-se um aumento dos níveis de caveolina-1 fosforilada com o aumento do tempo de exposição ao H_2O_2 , embora sejam necessários mais estudos para corroborar este aumento.

Em resumo, ambos os estudos, tanto a imunocitoquímica como o *Western blotting*, mostram resultados coincidentes, ou seja, o H_2O_2 afecta tanto os níveis de caveolina-1 como de caveolina-1 fosforilada, aumentando a sua quantidade na célula.

IV.III. Análise da Influência do estado estacionário de H_2O_2 na resistência a fármacos utilizados na terapia química em células HeLa

Os resultados anteriores mostram que as células HeLa adaptam-se ao H_2O_2 quando pré-expostas ao H_2O_2 em estado estacionário a 12,5 μM durante 6 h uma vez que esta pré-exposição ao H_2O_2 torna as células tumorais mais resistentes aquando da sua exposição a concentrações letais de H_2O_2 , tornando-as menos vulneráveis à morte causada por este composto. Foi mostrado também que ocorrem modificações a nível da membrana, nomeadamente peroxidação lipídica e alteração dos níveis de

caveolina. Na terapia do cancro alguns tratamentos baseiam-se no princípio de que as células tumorais, expostas a um elevado stress oxidativo se tornam mais vulneráveis à morte que as células não tumorais. No entanto, ao longo do tempo as células tumorais adquirem resistência aos fármacos deixando estes de ter efeito terapêutico. A hipótese deste trabalho é que a pré-exposição das células tumorais ao H_2O_2 tornar as células mais resistentes à acção destes fármacos impedindo a sua actuação e a consequente morte celular das células tumorais. De modo a testar esta hipótese as células HeLa foram adaptadas ao H_2O_2 e, posteriormente, submetidas a doses crescentes dos fármacos, cisplatina (Figura 22) ou doxorrubicina (Figura 23). Caso a hipótese estivesse certa dever-se-ia observar que as células tumorais pré-expostas ao H_2O_2 seriam mais resistentes à morte celular induzida por doses crescentes de fármaco que as células controlo.

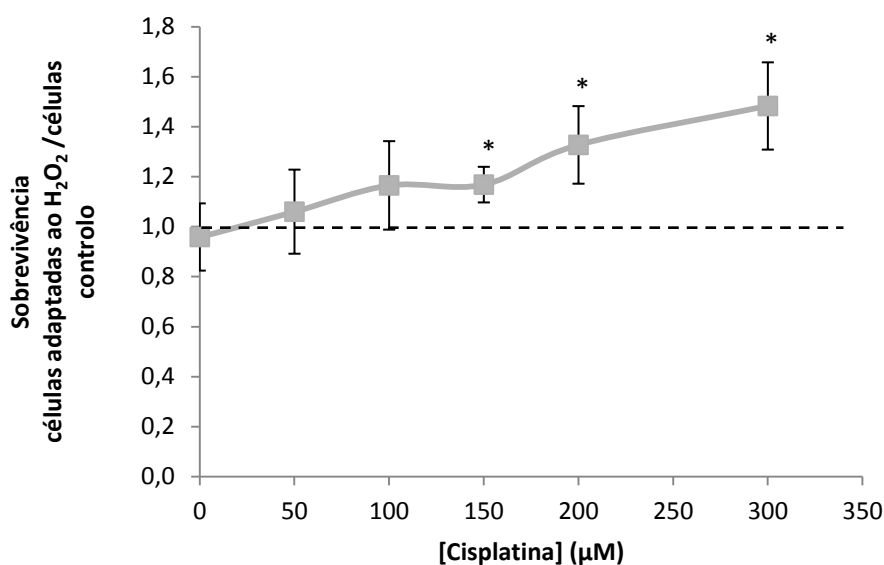


Figura 22: As células adaptadas ao H_2O_2 tornam-se mais resistentes a uma exposição subsequente à cisplatina. Determinou-se a sobrevivência celular em células HeLa controlo e submetidas a estado estacionário de 12,5 μM de H_2O_2 durante 6 h e posteriormente sujeitas a doses crescentes de cisplatina. Os resultados apresentados são a média \pm desvio padrão do quociente das sobrevivências entre as células sujeitas ao estado estacionário e as células controlo, de um total de $n = 4$ experiências independentes. * $p < 0,05$ vs controlo

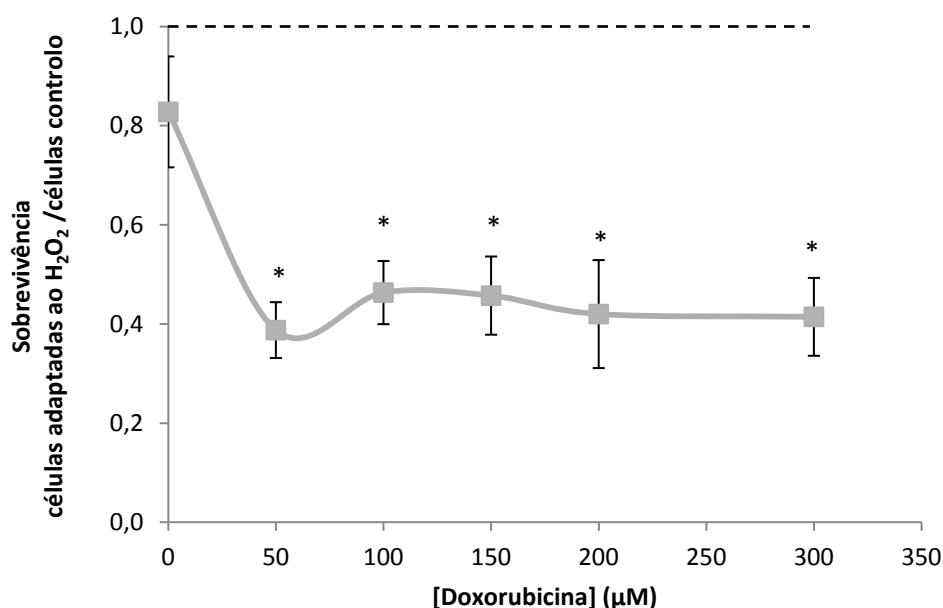


Figura 23: As células adaptadas ao H₂O₂ tornam-se menos resistentes a doses letais de doxorubicina. Determinou-se a sobrevivência celular em células HeLa controle e submetidas a estado estacionário de 12,5 μM de H₂O₂ durante 6 h e posteriormente sujeitas a doses crescentes de doxorubicina. Os resultados apresentados são a média ± desvio padrão do quociente das sobrevivências entre as células sujeitas ao estado estacionário e as células controle, de um total de n = 3 experiências independentes. *p < 0,05 vs controle

No caso da cisplatina (Figura 22), é apresentado o quociente entre a sobrevivência das células adaptadas ao H₂O₂ e as células controle, e sempre que este é superior a 1 as células sujeitas ao estado estacionário de H₂O₂ sobreviveram mais do que as células controle. Contudo, devido ao desvio padrão associado não existem diferenças significativas entre as sobrevivências das células controle e as células adaptadas ao H₂O₂ para concentrações de cisplatina inferiores a 100 μM, mas para concentrações superiores a 150 μM, inclusive, ocorre um aumento significativo da sobrevivência nas células adaptadas ao H₂O₂.

Contrariamente ao que se passa com a cisplatina, na presença de concentrações crescentes de doxorubicina (Figura 23) ocorre um aumento de sensibilidade das células adaptadas ao H₂O₂ quando comparadas com as células controle. Aqui também é apresentado o quociente entre a sobrevivência das células adaptadas ao H₂O₂ e as células controle, e sempre que este é inferior a 1 as células

sujeitas ao estado estacionário de H_2O_2 sobreviveram menos do que as células controle, apresentando as células pré-expostas ao H_2O_2 uma mortalidade celular muito superior.

Os resultados anteriores indicam que as células tumorais adaptadas ao H_2O_2 nem sempre adquirem resistência aos fármacos. Para a cisplatina é visível um aumento da sobrevivência para concentrações crescentes deste fármaco mas para a doxorrubicina, nas mesmas condições, observa-se mais sensibilidade das células adaptadas do que as células controle, diminuindo a sua sobrevivência.

V. DISCUSSÃO

O objectivo do presente trabalho centrou-se no estudo do papel do H_2O_2 na alteração das biomembranas (jangadas lipídicas e domínios *caveolae*) e na possibilidade das células tumorais adaptadas ao H_2O_2 adquirirem resistência à terapia química, a fármacos como a cisplatina e a doxorubicina.

Quando as células HeLa foram expostas a 12,5 μM de H_2O_2 em estado estacionário, observou-se que a morfologia das células controlo e as células sujeitas a uma pré-exposição ao H_2O_2 era semelhante entre si. No entanto, Volante *et al.*, observaram que a indução de stress oxidativo em células NIH 3T3, através de uma adição *bolus* de 150 μM de H_2O_2 induziu deformações, alterando por completo a sua morfologia, as células pré-expostas ao H_2O_2 atingiram sensivelmente o dobro do tamanho das células controlo. Este resultado apoia a escolha do método do estado estacionário, em detrimento da adição *bolus*, uma vez que se revela ser menos perturbador para a estabilidade da célula, mantendo esta a sua morfologia normal, devido ao uso de concentrações mais baixas e constantes de H_2O_2 ao longo do tempo (Figura 16, 18 e 20).

A presença de níveis baixos de ERO é indispensável em diversos processos bioquímicos, incluindo sinalização celular, apoptose e defesa contra microrganismos. Contudo, altas doses de ERO resultam em *stress* oxidativo, que pode causar malformações metabólicas e danos nas macromoléculas biológicas. A ocorrência natural de antioxidantes protege a célula da oxidação, diminuindo processos como a peroxidação lipídica. Um aumento da peroxidação lipídica e diminuição da protecção antioxidante produz epóxidos que podem reagir espontaneamente com centros nucleófilicos da célula (DNA, RNA e proteínas). A ocorrência de eventos oxidantes possui também um papel importante no mecanismo de acção dos lípidos e pode contribuir para a sensibilidade das células aos fármacos (Matés *et al.*, 1999). Através da figura 15 observa-se que a exposição das células a um estado estacionário de 12,5 μM de H_2O_2 aumenta a sua peroxidação lipídica comparativamente às células controlo, sem ocorrer perca de viabilidade celular.

Volante *et al.*, mostraram ainda que a expressão da caveolina-1 em células NIH 3T3 depende da exposição ao H₂O₂ (adição *bolus* de 1, 5, 15, 50 ou 150 µM de H₂O₂ durante 2 h). Aqui, observaram que um aumento da concentração de H₂O₂ aumentava os níveis de expressão da caveolina-1 e para a concentração de 15 µM de H₂O₂ a expressão de caveolina-1 era significativamente regulada. No presente trabalho, recorrendo ao uso de um estado estacionário de H₂O₂, a uma concentração aproximada da indicada por Volante *et al.* como possível reguladora da expressão de caveolina-1, observou-se que em células HeLa expostas ao H₂O₂ também ocorre um aumento da expressão da caveolina-1. Contudo, é de salientar que a medição dos níveis de caveolina-1 foi efectuada a diferentes tempos, incluindo as 2 h estudadas pelos autores, e neste trabalho foi observado que o aumento da expressão da caveolina-1 na presença de H₂O₂ ocorre passados apenas 15 min de exposição a este agente em estado estacionário. Como já foi referido, a caveolina-1 é uma proteína integral de membrana, que forma pequenas invaginações membranares (Fingelman *et al.*, 1997). A internalização da caveolina-1 pode ser estimulada por esfingolípídeos, integrinas e alguns vírus (Jansen *et al.*, 2008) e a endocitose caveolar é o principal mecanismo de internalização da membrana plasmática, regulando assim a composição lipídica da membrana (Singh *et al.*, 2003). Os resultados sugerem que a presença de H₂O₂ aumenta a endocitose celular, uma vez que através da figura 18 observa-se um aumento da marcação em células pré-expostas ao H₂O₂ comparativamente a células controlo, resultado comprovado por *Western blotting* (Figura 19). Assim, infere-se que o H₂O₂ possui uma acção rápida e específica na célula, visto que o aumento de expressão e de endocitose de caveolina-1 ocorre para concentrações baixas e a tempos curtos de exposição (15 min) ao H₂O₂ em estado estacionário.

A caveolina-1 é uma proteína passível de sofrer fosforilação (na tirosina 14), o que altera as suas propriedades, pode levar à transformação celular, progressão do tumor ou apoptose, consoante a linha celular (Patel *et al.*, 2009). Sabe-se que a fosforilação da proteína pode ser estimulada pela presença de *stress* oxidativo, pois estudos em células NIH 3T3 tratadas com uma dose muito elevada de H₂O₂, 5 mM durante 20 min, mostraram um aumento da fosforilação da Tyr¹⁴ (Parat *et al.*, 2002). No presente trabalho, os resultados obtidos para a caveolina-1 fosforilada são ainda preliminares, uma vez que a marcação por imunocitoquímica apenas fornece uma

análise qualitativa e o *Western blotting* corresponde a um ensaio único, mas ambos os resultados sugerem que ocorreu um aumento da fosforilação da caveolina-1 em células expostas a 12,5 μM de H_2O_2 em estado estacionário, a diferentes tempos. Sun *et al.*, em 2009 observaram que a exposição ao H_2O_2 induzia a fosforilação da caveolina-1, sendo que quanto maior a concentração de H_2O_2 maior a fosforilação desta. No entanto, neste ensaio as células foram tratadas através de uma adição *bolus* de H_2O_2 e as concentrações de H_2O_2 utilizadas nesta experiência são muito superiores às concentrações fisiológicas (0,01 até 0,8 mM durante 30 min) e a diferença entre as células tratadas e o controlo é mais evidente para as concentrações de H_2O_2 mais elevadas. O presente estudo, mostra que a fosforilação da caveolina-1 aumenta para concentrações constantes e muito inferiores de H_2O_2 (mais próximas da concentração fisiológica), num processo menos lesivo para a célula. Joshi *et al.*, utilizando linhas celulares de tumores humanos, como as MCF-7, observaram que a caveolina-1 fosforilada está associada com um aumento de Rho (um pequeno GTP-ase), e da migração e invasão do tumor.

Os resultados obtidos indicam que na presença de H_2O_2 ocorre um aumento da expressão da caveolina-1 bem como um aumento da sua fosforilação, para tempos curtos de exposição ao H_2O_2 e para baixas concentrações deste agente em estado estacionário. Estes fenómenos demonstram que a célula responde rapidamente à presença de H_2O_2 no meio, através do aumento de expressão desta proteína e através de alterações na membrana plasmática, podendo resultar no aumento da sua endocitose. A fosforilação da caveolina-1 também sofre um aumento o que pode levar à migração e progressão do tumor, tornando mais difícil o efeito da terapia química ou então originar apoptose, facilitando este processo, sendo necessários mais estudos para confirmar qual dos dois processos ocorre nesta linha celular

Quanto às jangadas lipídicas não foram encontrados na literatura estudos que relacionem a marcação com a CTxB e a pré-exposição das células ao H_2O_2 . Aqui, as observações são apenas qualitativas mas consoante o tempo de exposição ao H_2O_2 parece ocorrer maior (360 min) ou menor (30 min) internalização da proteína pela célula. Para 360 min de exposição em estado estacionário ao H_2O_2 as imagens de microscopia confocal sugerem um acumular de CTxB na membrana, sendo necessários

mais estudos para confirmar estes resultados, como por exemplo a medição dos níveis de colesterol ou a quantificação da internalização da CTxB.

Os resultados anteriores validam assim parte da hipótese de trabalho, onde era proposto que a presença de H_2O_2 promove alterações dos domínios de membrana *caveolae* e nas jangadas lipídicas, tendo sido atingido os objectivos propostos para esta etapa.

A segunda parte da hipótese de trabalho consistia na possibilidade das células tumorais adaptadas ao H_2O_2 adquirirem resistência à terapia química com fármacos como a cisplatina e a doxorrubicina.

Yeh *et al.*, observaram que células SiHa tratadas durante 1 h com 10 μM de 2-amino-3-metoxiflavonóide, um inibidor selectivo da via MEK-ERK (do inglês *Extracellular-Regulated Kinase*), são mais resistentes que as células controlo à cisplatina, mas no caso de ser utilizado doxorrubicina as diferenças entre as células pré-expostas ao inibidor e as células controlo já não são significativas. Os resultados obtidos no decorrer deste trabalho mostraram que enquanto a pré-exposição ao H_2O_2 em estado estacionário promove um aumento de resistência nas células expostas a concentrações crescentes de cisplatina, aumentando a sua sobrevivência, no caso da doxorrubicina, para as mesmas condições ocorre um aumento de sensibilidade diminuindo a sobrevivência celular. A activação de ERK pode induzir a apoptose ou estar relacionada com a sensibilidade das células aos tumores. A resistência à cisplatina nas células SiHa tratadas com 2-amino-3-metoxiflavonóide tem origem na indução da activação do factor de transcrição NF- κB pelo fármaco por supressão da via MEK-ERK (Yeh *et al.*, 2002). O H_2O_2 é um modulador e activador fraco do NF- κB , sendo este activado para concentrações na ordem dos μM de H_2O_2 (Schmidt *et al.*, 1995). No presente trabalho, embora as linhas celulares e as condições de adaptação não sejam iguais ao presente trabalho, aqui também é observada uma diferença entre a resposta celular aos fármacos cisplatina e doxorrubicina e a concentração de H_2O_2 utilizada no estado estacionário encontra-se na mesma ordem de grandeza que a concentração necessária para activar o NF- κB , podendo ser de posterior interesse observar se esta via também se encontra relacionada com a resistência adquirida aos fármacos através da pré-exposição ao H_2O_2 em estado estacionário.

Estudos em células CLV98, pré-expostas ao H_2O_2 através de uma adição *bolus* de 200 μM durante 30 min e posteriormente expostas a concentrações crescentes de doxorubicina, mostraram que não ocorre um aumento de sobrevivência destas células em comparação com o controlo (Anuszewka *et al.*, 1997). A exposição das células durante 30 min ao H_2O_2 não aparenta ser suficiente para promover alterações nestas que levem a uma diferença de resposta entre as células sujeitas ao H_2O_2 por adição *bolus* e as células controlo mesmo para concentrações elevadas de H_2O_2 (200 μM). No presente trabalho, em que se prolongou o tempo de exposição e se expôs as células a uma concentração mais baixa mas constante de H_2O_2 são observadas diferenças na resposta celular, existindo uma diminuição da sobrevivência para as células pré-expostas ao H_2O_2 em estado estacionário. Aqui, observa-se que consoante o fármaco utilizado a resposta das células pré-expostas ao H_2O_2 varia, não sendo válida a hipótese de trabalho para todos os fármacos em geral.

O mecanismo responsável pela diferente capacidade de resposta celular à doxorubicina e à cisplatina não é claro. No entanto, pode dever-se à capacidade da doxorubicina ter um maior número de alvos do que a cisplatina, causando a quebra da dupla cadeia de DNA e *stress* oxidativo nas células (Yeh *et al.*, 2002), enquanto o mecanismo de actuação da cisplatina envolve essencialmente modificações nas bases do DNA através da formação de ligações cruzadas (Akaboshi *et al.*, 1992).

A dependência dos resultados obtidos consoante o agente terapêutico investigado lança um alerta sobre a suplementação com antioxidantes durante a quimioterapia. Embora não exista uma opinião consensual na comunidade médica sobre esta questão, muito pacientes suplementam a sua dieta com antioxidantes, por iniciativa própria. De acordo com os resultados obtidos, isso poderá ser benéfico à terapia no caso de um fármaco que tenha uma resposta semelhante à da cisplatina, pois o antioxidante ao remover o H_2O_2 elimina resistência conferida por este às células tumorais. O inverso pode ocorrer no caso de um fármaco com uma actuação semelhante à da doxorubicina.

VI. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos durante o trabalho experimental revelaram-se importantes para a compreensão da resposta adaptativa das células HeLa ao H_2O_2 , nomeadamente ao nível de modificações na membrana plasmática e resistência adquirida aos fármacos após exposição a um estado estacionário de H_2O_2 . No entanto, é necessário complementar estes estudos, da resposta celular ao H_2O_2 em estado estacionário, de modo a integrar e compreender melhor as variações que são passíveis de ocorrer, assim como as suas consequências. Deste modo deverão futuramente ser analisados novos aspectos, dos quais são exemplo os seguintes:

- (a) Análise da influência de antioxidantes, como o α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno, entre outros, em células pré-expostas ao H_2O_2 em estado estacionário de modo a observar se a presença de antioxidantes promove alterações na resposta da célula aos agentes terapêuticos e se pode diminuir a peroxidação lipídica,
- (b) Medição dos níveis de colesterol ou quantificação da endocitose da CTxB. O colesterol é uma macromolécula muito presente nas jangadas lipídicas o que pode tornar interessante o seu estudo, com o intuito de observar se a presença de H_2O_2 em estado estacionário promove variações nos seus níveis. A quantificação da endocitose da CTxB leva a um complemento da análise qualitativa efectuada, de modo a observar se o H_2O_2 possui influências nas jangadas lipídicas da membrana,
- (c) Optimização do *Western blotting* para a caveolina-1 fosforilada, uma vez que o sinal apresentado é fraco, podem pequenos ajustes ao método torná-la mais detectável e assim ser possível quantificar as alterações desta na presença de H_2O_2 e ao longo do tempo,
- (d) Medição dos níveis de apoptose, com o intuito de observar se a caveolina-1 fosforilada nesta linha celular favorece ou não o crescimento do tumor,
- (e) Estudos que permitam avaliar a diferente capacidade de resposta aos fármacos, através da medição da captação do fármaco pela célula ou exportação do fármaco pela célula através dos transportadores ABC,

- (f) Estudo da via MEK-ERK, de modo a observar esta se encontra relacionada com a resistência celular observada aquando do uso da cisplatina, facto observado noutra linha celular.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramoff, M., Magalhães, P., and Ram, S. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 11, 36-42.

Akaboshi, M., Kawai, K., Maki, H., Akuta, K., Ujeno, Y. and Miyahara, T. (1992). The number of platinum atoms binding to DNA, RNA and protein molecules of HeLa cells treated with cisplatin at its mean lethal concentration. *J. Cancer Res.* 83, 522-526.

Annereau, J., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K., Reinhold, W., and Guo, Y. (2004). Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cell*. 6, 129-137.

Antunes, F., & Cadenas, E. (2000). Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* 475, 121-126.

Antunes, F., & Cadenas E. (2001). Cellular titration of apoptosis with steady state induce apoptosis through fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Science*. 30, 1008-1018.

Antunes, F., Cadenas, E., and Brunk, U. (2001). Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem. J.* 555, 549-555.

Anuszewska, E. L., Gruber, B. M., and Kozirowska, J. H. (1997). Studies on adaptation to adriamycin in cells pretreated with hydrogen peroxide. *Biochem. Pharmacol.* 54, 597-603.

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biology*. 55, 373-399.

Atkinson, P., & Summers, D. (1971). Purification and properties of HeLa cell plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 246, 5162-5175.

Beyers, E., Comfurius, P., Dekkers, D., and Zwaal, R. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Cardiovascular Research*. 1439, 317-330.

Bien, S., Rimmbach, C., Neumann, H., Niessen, J., Reimer, E., Ritter, C., and Roskopf, D. (2010). Doxorubicin-induced cell death requires cathepsin B in HeLa cells. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1466-1477.

Bienert, G., Schjoerring, J., and Jahn, T. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758, 994-1003.

Bjerrum, O. & Schafer-Nielsen C. (1986). Analytical Electrophoresis. *Verlag Chemie*. Weinheim, 315.

Borst, P., Zelcer, N., and Helvoort, A. (2000). ABC transporters in lipid transport. *Science*. 1486, 128-144.

Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Branco, M. R., Marinho, H. S., Cyrne, L., and Antunes, F. (2004). Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 6501-6506.

Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*. 42, 1007-1017.

Del Rey, J., Prat, E., Ponsa, I., Lloreta, J., Gelabert, A., Algaba, F., and Camps, J. (2010). Centrosome clustering and cyclin D1 gene amplification in double minutes are common events in chromosomal unstable bladder tumors. *BMC cancer*. 10, 280.

Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2008). Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Ann. Rev. Biophys.*, 37, 65-95.

Droge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.

Dusre, L., Mimnaugh, E. G., Myers, C. E., and Birandra, K. S. (1989). Potentiation of doxorubicin cytotoxicity by buthionine sulfoximine in multidrug-resistant human breast tumor cells. *Cancer Res.* 49, 511-515.

Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*. 438, 578-580.

Engelman, J., Wykoff, C. C., Yasuhara, S., Song, K. S., Okamoto, T., and Lisanti, M. P. (1997). Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J. Biol. Chem.* 272, 16374-16381.

Evans P., Halliwell B. (1999). Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann. NY Acad. Sci.* 884, 19-40.

Eytan G. D., Regev, R., Oren, G., and Assaraf, Y. G. (1996) The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation. *J. Biol. Chem.* 271, 12897-12902

Fang, J., Seki, T., and Maeda, H. (2009). Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv. Drug Del. Rev.* 61, 290-302.

Fishman, P. H., & Atikkan, E. E. (1980). Mechanism of action of cholera toxin: Effect of receptor density and multivalent binding on activation of adenylatecyclase. *J. Memb. Biol.* 54, 51-60.

Foerg, C., Ziegler, U., Fernandez-Carneado, J., Giralto, E., Rennert, R., Beck-Sickinger, and A. G. (2005). Decoding the entry of two novel cell-penetrating peptides in HeLa cells: lipid raft-mediated endocytosis and endosomal escape. *Biochem. J.* 44, 72-81.

Folmer, V., Pedroso, N., Matias, A. C., Lopes, S. C. D. N., Antunes, F., and Cyrne, L., (2008). H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778, 1141–1147.

Forman, H. J., & Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling respiratory burst in macrophage signaling. *Critical Care Medicine.* 166, 54-58.

Gabel, B. R., Elwell, C., Ijzendoorn, S. & Engel, J. N. (2004). Lipid raft-mediated entry is not required for chlamydia trachomatis infection of cultured epithelial cells. *Biochem. J.* 72, 7367-7373.

Gershoni, J., Palade, G. (1983). Protein *blotting*: principles and applications. *Anal. Biochem.* 131, 1-15.

Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., and Pelicci, P. G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature.* 8, 722-728.

Higgins, C. F. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism -an overview. *Research in Microbiology.* 152, 205-210.

Iida, T., Furuta, A., Kawashima, M., Nishida, J., Nakabeppu, Y., and Iwaki, T. (2001). Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors. *Neuro-oncology.* 3, 73-81.

Iida, N., Takara, K., Ohmoto, N., Nakamura, T., Kimura, T., and Wada, A. (2001). Reversal effects of antifungal drugs on multidrug resistance in MDR1-overexpressing HeLa cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 24, 1032-1036.

Imlay, J. A. (2011). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Ann. Rev. of Biochem.*. 217, 755-776.

Jansen, M., Pietiäinen, V. M., Pölönen, H., Rasilainen, L., Koivusalo, M., and Ruotsalainen, U.(2008). Cholesterol substitution increases the structural heterogeneity of caveolae. *J. Biol. Chem.*. 283, 14610-14618.

Joshi, B., Strugnell, S. S., Goetz, J. G., Kojic, L. D., Cox, M. E., Griffith, O. L., Chan, S. K., Jones, S., Leung, S. P., Masoudi, H., Leung, S., Wiseman, S. M., and Nabi, I. (2008). Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer Res.*. 68, 8210-8220.

Kamata, H., & Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Science*. 11, 1-14.

Kenworthy, K., Petranova, N., and Edidin, M. (2000). High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol. Cell Biol.*. 11, 1645-1655.

Kuziemko, G. M., Stroh, M., and Stevens, R. C. (1996). Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. *Biochem. J.*. 35, 6375-6384.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

Le Moan, N., Clement, G., and Maout, S. L. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols – Contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 10420-10430.

Lee, B. R., & Um, H. D. (1999). Hydrogen peroxide suppresses U937 cell death by two different mechanisms depending on its concentration. *Exp. Cell Res.* 248, 430-438.

Luo, L., Li, D.-Q., Doshi, A., Farley, W., Corrales, R. M., and Pflugfelder, S. C. (2004). Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 45, 4293-4301.

Marguet, D., Lenne, P. F., Rigneault, H., and He, H. T. (2006). Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *The EMBO J.* 25, 3446-3457.

Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., and Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 32, 595-603.

Matias, A. C., Pedroso, N., Teodoro, N., Marinho, H. S., Antunes, F., and Nogueira, J. M., (2007). Down-regulation of fatty acid synthase increases the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells to H₂O₂. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 1458–1465.

Meinhard, M., & Grill, E. (2001). Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS letters*. 508, 443-446.

Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1978). Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *Journal of Lipid Research*. 19, 1053-1057.

Oliveira-Marques, V. (2008). Redox regulation of NF- κ B activation by hydrogen peroxide and effects on gene expression. Tese de doutoramento, FCUL, Lisboa

Oliveira-Marques, V., Cyrne, L., Marinho, H. S. and Antunes, F. (2007). A quantitative study of NF- κ B activation by H₂O₂: Relevance in inflammation and synergy with TNF- α . *J. Immun.* 20, 3894-3902.

Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., Antunes, F. (2009). Role of hydrogen peroxide in NF- κ B activation: From inducer to modulator. *Antioxidants & Redox Signaling*. 11, 2223-2243.

Parat, M., Stachowicz, R. Z., and Fox, P. L. (2002). Oxidative stress inhibits caveolin-1 palmitoylation and trafficking in endothelial cells. *Biochem. J.* 688, 681-688.

Patel, H. H., & Insel, P. A. (2009). Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 11, 1357-1372.

Pedroso, N., Matias, A. C., Cyrne, L., Antunes, F., Borges, C., Malhó, R., de Almeida, R. F. M. and Marinho H.S. (2009). Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 289-298.

Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*. 7, 97-110.

Pelkmans, L., Bu, T., Zerial, M., and Helenius, A. (2004). Caveolin stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*. 118, 767-780.

Qi, R., Mullen, D. G., Baker, J. R., and Holl, M. M. B. (2010). The mechanism of polyplex internalization into cells: testing the GM1/caveolin-1 lipid raft mediated endocytosis pathway. *Molecular Pharmaceutics*. 7, 267-279.

Rao, R. K., & Clayton, L. W. (2002). Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Proteins*. 293, 610-616.

Rasband, W. S. (1997). ImageJ. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

Sambrook J, Russell D (2001). Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed.). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Schmidt, K. N., Amstad, P., Cerutti, P., and Baeuerle, P. (1995). The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chemistry & biology*. 2, 13-22.

Schmitt, L., & Tampé, R. (2002). Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology*. 754-760.

Schütz, G. J., Schindler, H., and Schmidt, T. (1997). Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophysical Journal*. 73, 1073-80.

Scotto, K. W. (2003). Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene*. 22, 7496-74511.

Seaver, L. C. and Imlay, J. A. (2001). Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing Escherichia coli. *J. Bacteriol.*. 183, 7182-7189.

Shi, J., Yang, T., Kataoka, S., Zhang, Y., Diaz, A. J., and Cremer, P. S. (2007). GM1 clustering inhibits cholera toxin binding in supported phospholipid membranes. *J. Amer. Chem. Soc.*. 129, 5954-5961.

Sies, H. (1996). Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*. 82, 291-295.

Simons, K., & Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 597-603.

Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387, 569-572.

Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175, 720-731.

Singh, R. D., Puri, V., Valiyaveetil, J. T., Marks, D. L., Bittman, R., and Pagano, R. E. (2003). Selective caveolin-1 – dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol. Cell Biol.* 14, 3254-3265.

Spector, A. A., & Yorek, M. A. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of Lipid Research*. 26, 1015-1035.

Sun, Y., Hu, G., Zhang, X., and Minshall, R. D. (2009). Phosphorylation of caveolin-1 regulates oxidant-induced pulmonary vascular permeability via paracellular and transcellular pathways. *Circulation Research*. 105, 676-85.

Tennant, D. A., Durán, R. V., Boulahbel, H., and Gottlieb, E. (2009). Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis*. 30, 1269-1280.

Thannickal, V. J., Fanburg, B. L., Erickson, J. R., He, B. J., Grumbach, I. M., and Anderson, M. E. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Critical Care*. 279, 1005-1028.

Torgersen, M. L., Skretting, G., Van Deurs, B., and Sandvig, K. (2001). Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *Journal of Cell Science*. 114, 3737-3747.

Veal, E. a, Day, A. M., & Morgan, B. a. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cel Biol.*. 26, 1-14.

Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M. P., and Galbiati, F. (2002). Expression of Caveolin-1 Induces Premature Cellular Senescence in Primary Cultures of Murine Fibroblasts Stress-Induced Premature Senescence Upregulates the Expression of Endogenous Caveolin-1. *Mol. Cell Biol.*. 13, 2502-2517.

Wiese, A., G., Pacifici, R. E. and Davies, K. (1995). Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 318, 231-240.

Wilson, B. S., Steinberg, S. L., Liederman, K., Pfeiffer, J. R., Surviladze, Z., and Zhang, J. (2004). Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol. Cell Biol.*. 15, 2580-2592.

Wolf, A., Fujinaga, Y., and Lencer, W. I. (2002). Uncoupling of the cholera toxin-(GM1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *J. Biol. Chem.*. 277, 16249-16256.

Yeh, P. Y., Chuang, S. E., Yeh, K. H., Song, Y. C., Ea, C. K., and Cheng, A. L. (2002). Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochem. Pharmacol.*. 63, 1423-1430.

Yokomizo, A., Ono, M., Nanri, H., and Mitomycin, C. (1995). Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide advances in brief cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin. *Cancer Res.*. 55, 4293-4296.



Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA