

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR NA PROTEÇÃO CONTRA A TOXICIDADE DO TRATAMENTO COM DOXORRUBICINA

CINTHIA GUIZO DA CUNHA COUTO

**Tese apresentada à Fundação Antonio
Prudente para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Vilma Regina Martins

Co-Orientador: Prof. Dra. Beatriz de Camargo

São Paulo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Couto, Cinthia Guiso Da Cunha

Avaliação da participação da proteína prion celular na proteção contra a toxicidade do tratamento com doxorrubicina / Cinthia Guiso da Cunha Couto – São Paulo, 2008.

115p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Vilma Regina Martins.

Descritores:1. PRION. 2. DOXORRUBICINA. 3. TOXICIDADE.

DEDICATÓRIA

Ao Leo, meu marido, meu amigo, meu
conselheiro e meu suporte em todos os momentos dessa fase de nossas
vidas, em que uma etapa se encerra e outra, mágica, se inicia.

AGRADECIMENTOS

Essa sempre é a parte mais difícil...Espero não esquecer de ninguém, afinal, todos foram e são importantes nessa etapa da minha vida.

Agradeço...

A Deus em primeiro lugar, por me proporcionar condições de lutar pelos meus objetivos e ideais.

A Dra Vilma Martins, minha orientadora, por permitir que eu me juntasse a um grupo de ponta em pesquisa sobre prion celular, o que me proporcionou um grande aprofundamento de meu conhecimento acadêmico e trabalho em grupo.

À Prof. Dra. Beatriz de Camargo, ao Dr. Julio Santin, Luis Sakamoto, Marcell Cominato e Hernani Neto, pela ajuda com os pacientes deste estudo.

Ao Dr Luis Fernando Lima Reis, pela excelente orientação frente à Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente e pela oportunidade que me deu.

Aos meus pais, Manuel e Lazara, por serem meus pilares na vida e me ensinarem sobre como ser uma pessoa melhor e justa.

Ao meu marido Leonardo, por me ajudar a ver o lado positivo de tudo, por estar comigo ao longo de tantos anos, por me amar como sou e por ter iniciado comigo essa família maravilhosa, com a chegada de nosso bem mais valioso, a Ana.

Aos meus sogros, Renato e Marilza, por serem sempre muito amigos e queridos.

Aos meus irmãos “pekis” “zazás” lindos, Fábio e Raquel, que sempre foram amigos-irmãos!!!

Às minhas avós Ana e Odette, por serem exemplos de mulheres fortes e guerreiras, amáveis e decididas.

Ao meu avô Júlio, que há uma década olha por nós. Ao meu avô Ângelo, que agora também olha por nós, pela infância maravilhosa que me proporcionou e os infindáveis biscoitos do “Seu” Mendes.

A todos os meus amigos de Niterói que deixei por lá, mas que ainda fazem e sempre farão parte da minha vida.

À Michele obrigada pela amizade e pelo carinho, sempre me ajudando no que podia e me oferecendo um ombro amigo quando as coisas apertavam. Amigos não se compram, não se bajulam... Conquistam-se.

Aos amigos do BCM – Cleiton, Marilene, Gláucia, Flávio, Tiago, Camila, Nicolle, Pamela e Zanith, pela presença nesses anos; Eliane, por toda ajuda “burocrática” e pela companhia.

Aos Bioteristas Wanderley, Éder e Oraci.

Ao Carlinhos, Severino e Sueli pelo apoio técnico.

Aos funcionários da Administração, serviços gerais e manutenção pela eficiência.

Aos demais pesquisadores e colegas do Instituto Ludwig por todos estes quatro anos de convivência.

À Dra. Karina pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao pessoal da pós-graduação e da Biblioteca, especialmente a Sueli pelo suporte com a TESE.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e ao Hospital do Câncer por todo o suporte técnico durante os últimos 4 anos.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Couto CGC. **Avaliação da participação da proteína prion celular na proteção contra a toxicidade do tratamento com doxorrubicina.** São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Prions são partículas exclusivamente protéicas responsáveis por doenças infecciosas e neurodegenerativas, denominadas encefalopatias espongiformes. O agente infeccioso das doenças neurodegenerativas é uma isoforma da proteína prion celular (PrP^{C}), a *scrapie* PrP^{Sc} , cuja diferença com PrP^{C} reside apenas em mudança conformacional da proteína. A PrP^{C} é uma proteína celular de membrana ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI), altamente expressa em neurônios, associada a adesão, diferenciação, sobrevivência e sinalização celulares. A PrP^{C} contém uma região de octapeptídeos repetidos que liga ions cobre e é responsável pela proteção celular contra o estresse oxidativo. Esta região é polimórfica, com cerca de 10% da população humana normal apresentando quatro repetições e o restante cinco repetições. Acredita-se que polimorfismos nessa região possam indicar maior ou menor susceptibilidade ao estresse oxidativo. PrP^{C} também é encontrada em diversos outros órgãos inclusive no coração. Sabe-se que o aumento do estresse oxidativo está implicado na cardiotoxicidade do agente anti-tumoral Doxorrubicina, sendo esse um dos fatores limitantes do seu uso. Entretanto, este efeito é variável e depende de cada indivíduo. Neste trabalho, pesquisamos a presença de polimorfismos na região de octapeptídeos repetidos e no códon 129 do gene de PrP^{C} (*PRNP*) em 162 pacientes previamente tratados com doxorrubicina, correlacionando-os com possíveis alterações nas funções cardíacas causadas pelo uso de doxorrubicina. Verificamos que a presença da deleção de octapeptídeos juntamente com o aminoácido metionina em homozigose no códon 129 (M129Mdel) pode estar associada a uma maior sensibilidade à lesão cardíaca por doxorrubicina. Na tentativa de avaliar este evento *in vitro*,

foram estabelecidas linhagens celulares expressando as proteínas PrP^C com os diferentes polimorfismos associados a região de octapeptídeos repetidos e ao codon 129. Estas células serão uma ferramenta muito importante para confirmar os achados em pacientes. Experimentos foram ainda conduzidos *in vivo* em animais tipo selvagem, nocaute e que têm expressão aumentada de PrP^C (*ZPrnp*^{0/0}, *ZPrnp*^{+/+} e Tg20 respectivamente). Os resultados apontam que a ausência de expressão de PrP^C causa uma maior sensibilidade à toxicidade de doxorrubicina enquanto sua super expressão leva a uma alta resistência à droga. Desta forma, a proteína PrP^C funciona como fator protetor na toxicidade à doxorrubicina e polimorfismos presentes nesta proteína podem indicar maior susceptibilidade à cardiotoxicidade em pacientes tratados com esta droga.

SUMMARY

Couto CGC. **[Evaluation of the cellular prion protein participation in the protection against oxidative stress caused by doxorubicin treatment]**. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Prions are exclusively proteinaceous particles responsible for infectious and neurodegenerative diseases, named spongiform encephalopathies. The infectious agent of the neurodegenerative diseases is an isoform of the cellular prion protein (PrP^{C}), the *scrapie* PrP^{Sc} and the only difference among them is a conformational change. PrP^{C} is a membrane glycosilphosphatidilinositol (GPI)-anchored cellular protein, highly expressed in neurons, associated with cellular adhesion, differentiation, survival and signaling. PrP^{C} presents an octapeptide repeat region that binds copper ions and is responsible for cellular protection against oxidative stress. This region is polymorphic, where 10% of the human population presents 4 repeats and the rest presents 5 repeats. It is believed that polymorphisms within this domain can indicate higher or lesser susceptibility to oxidative stress. PrP^{C} is also found in other organs including the heart. It is known that the increase in the oxidative stress is responsible for the cardiotoxicity of the anti-tumoral drug doxorubicin, which is one of the major limitations on its use. However, this counter effect is variable and depends on each patient. In this work, we evaluated the polymorphisms at the octapeptide repeats and at codon 129 of the PrP^{C} gene (*PRNP*) in 162 patients with cancer that were previously treated with doxorubicin, correlating them with possible cardiac failures caused by doxorubicin treatment. We verified that the deletion polymorphism together with the methionine amino acid in homozygosis at position 129 (M129Mdel) can be associated with a higher sensitivity to cardiac lesions induced by doxorubicin. Trying to evaluate this event *in vitro*, we established cell cultures expressing PrP^{C} proteins with different polymorphisms within the octarepeat region and at the 129 codon. These cells will be an important tool

to confirm data obtained with the patients. We also conducted experiments *in vivo* in wild type, knockout and transgenic mice overexpressing PrP^C (*ZPrnp*^{0/0}, *ZPrnp*^{+/+} and Tg20, respectively). The results point to the fact that the lack of PrP^C expression causes a higher doxorubicin toxicity sensibility whereas its higher expression leads to an elevated drug resistance. Therefore, our data indicate that PrP^C is a protector factor to doxorubicin toxicity and polymorphisms present within this protein can indicate a higher susceptibility to this drug.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura tridimensional proposta para PrP ^C e PrP ^{SC}	2
Figura 2	Estrutura de PrP ^C baseada em NMR (ressonância nuclear magnética) modelada com oligossacarídeos (representação compacta).....	5
Figura 3	Fórmula estrutural da doxorrubicina (C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁)(PM= 543.52).....	12
Figura 4	Esquema das etapas de construção da variante alélica 129Vdel utilizando a técnica de PCR recombinante.....	32
Figura 5	Plasmídeo pEGFP-C1.....	35
Figura 6	Esquema de acasalamentos dos animais <i>ZPrnp</i> ^{0/0} , <i>ZPrnp</i> ^{+/+} e Tg20.....	48
Figura 7	Esquema de acasalamentos dos animais <i>Eprnp</i> ^{-/-} , <i>EPrnp</i> ^{+/+} e <i>Eprnp</i> ^{+/-}	49
Figura 8	Distribuição dos tipos de tumores apresentados pelos pacientes do estudo.....	53
Figura 9	Histograma de faixa de dose cumulativa de antracíclicos dos 162 pacientes do estudo.....	54
Figura 10	Perfil cromatográfico de DHPLC para o DNA protótipo de <i>PRNP</i> (A) e para a deleção de um octapeptídeo repetido (B)...	55
Figura 11	Perfil de distribuição do polimorfismo na região de octapeptídeos repetidos encontrados e 162 pacientes.....	56
Figura 12	Perfil cromatográfico de DHPLC para o <i>PRNP</i> com o polimorfismo A117A e M129V.....	57
Figura 13	Perfil cromatográfico de DHPLC para a homozigossidade no códon 129 de <i>PRNP</i> (A) e após a mistura com DNA protótipo M129M (B)	58
Figura 14	Gráfico de fluorescência dos cardiomiócitos tipo selvagem <i>ZPrnp</i> ^{+/+} após tratamento com cálcio extracelular.....	62
Figura 15	Curva dose-resposta de toxicidade de doxorrubicina em células H9c2 tratadas por 24 horas.....	63

Figura 16	Tratamento com G ₄₁₈ nas doses indicadas após 4 dias de cultura.....	65
Figura 17	Expressão das proteínas GFP-PrP129M, GFP-PrP129V e GFP em H9c2 após 48 horas de transfecção.....	67
Figura 18	Expressão das proteínas GFP-PrP129M, GFP-PrP129V, GFP-PrP129Mdel e GFP-PrP129Vdel em células H9c2.....	69
Figura 19	Expressão das proteínas GFP-PrP129M, GFP-PrP129Mdel e GFP-PrP129V em células H9c2.....	70
Figura 20	<i>Western Blot</i> dos pools celulares transfectados com os construtos de pEGFP-PrPC.....	72
Figura 21	Microscopia de confocal dos clones celulares de HEK293 transfectados com os construtos de pEGFP-PrPC.....	74
Figura 22	Histograma de intensidade de fluorescência dos clones celulares de HEK293 transfectadas com os construtos de pEGFP-PrPC após separação por <i>cell sorting</i>	75
Figura 23	Curva de sobrevida dos animais <i>ZPrnp</i> ^{+/+} , <i>ZPrnp</i> ^{0/0} e Tg20 com 30 mg/kg de doxorrubicina.....	77
Figura 24	Curva de sobrevida dos animais <i>ZPrnp</i> ^{+/+} , <i>ZPrnp</i> ^{0/0} e Tg20 com 20 mg/kg de doxorrubicina.....	78
Figura 25	Curva de sobrevida dos animais <i>ZPrnp</i> ^{+/+} , <i>ZPrnp</i> ^{0/0} e Tg20 com 15 mg/kg de doxorrubicina.....	79
Figura 26	Curva de sobrevida dos animais <i>ZPrnp</i> ^{+/+} , <i>ZPrnp</i> ^{0/0} e Tg20 com 10 mg/kg de doxorrubicina.....	80
Figura 27	Curva de sobrevida dos animais <i>EPrnp</i> ^{+/+} , <i>EPrnp</i> ^{-/-} e <i>EPrnp</i> ^{+/-} com 15 mg/kg de doxorrubicina.....	81
Figura 28	Curva de sobrevida dos animais <i>EPrnp</i> ^{+/+} , <i>EPrnp</i> ^{-/-} e <i>EPrnp</i> ^{+/-} com 10 mg/kg de doxorrubicina.....	82
Figura 29	Cortes histológicos de coração de camundongos após tratamento com doxorrubicina.....	83
Figura 30	Marcação de núcleos apoptóticos em tecido cardíaco de animais tratados com doxorrubicina por 42 dias.....	85
Figura 31	Contagem da porcentagem de núcleos apoptóticos no tecido cardíaco dos animais tratados com 15 mg/kg de doxorrubicina	86

Figura 32 Quantificação dos níveis de caspase 12 ativada nos camundongos ZPrnp ^{+/+} , ZPrnp ^{0/0} e Tg20 antes e depois do tratamento com doxorubicina por 42 dias.....	88
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Construtos produzidos.....	30
Tabela 2	Iniciadores sintetizados para a subclonagem do <i>PRNP</i>	31
Tabela 3	Distribuição dos polimorfismos e alterações na FEVE.....	59
Tabela 4	Comparação entre a presença de polimorfismos no <i>PRNP</i> e alterações na FEVE.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina
Ca⁺²	íon cálcio
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
cDNA	DNA complementar
CJD	Doença de Creutzfeld-Jakob
CWD	Doença Crônica Debilitante
Da	Dáltons
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DHPLC	Cromatografia Líquida de Fase Reversa Denaturante
DMEM	Dulbecco's Modified eagle medium
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Dinucleotídeos fosfatados
DOX	Doxorrubicina
ECM	Matriz Extracelular
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSS	Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
IFF	Insônia Familiar Fatal
IG	Imunoglobulina
IP₃	Inositol trifosfato
K⁺	íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
kDa	KiloDalton
LN	Laminina
MAPK	Preoteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEM	Modified eagle medium
MgCl₂	Cloreto de Magnésio

Min	Minutos
Na⁺	íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
Neo	Neomicina
NMR	Ressonância Nuclear Magnética
pb	Pares de Bases
PBS	Phosphate buffered saline (tampão salina-fosfato)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PI3K	Fosfatidil-Inositol-3 Quinase
PKA	Proteína Quinase dependente de AMP cíclico
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio
PM	Peso molecular
<i>Prnp</i>	Gene que codifica para a proteína Prion Celular em camundongos
<i>PRNP</i>	Gene que codifica para a proteína Prion Celular em humanos
PrP^C	Proteína Prion Celular
PrP^{Sc}	Proteína Prion Scrapie
RB	Retinoblastoma
SBF	soro bovino fetal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
STI1	Stress Inducible Protein 1
TBE	Tampão Tris - Borato - Edta
TSE	Encefalopatias Espngiformes Transmissíveis
vCJD	Nova variante da Doença de Creutzfeld-Jakob

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Prions	1
1.2.	Estrutura da PrP ^C	3
1.3.	Funções Celulares de PrP ^C	5
1.4	Estresse oxidativo	8
1.5	Câncer e Doxorrubicina	10
1.6	PrP ^C , Doxorrubicina e Proteção contra Estresse Oxidativo	17
2	OBJETIVOS	20
3	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS I - Pacientes	21
3.I.1	Pacientes	21
3.I.2	Exame Ecocardiográfico	22
3.I.3	Purificação de DNA de leucócitos	23
3.I.4	Sequenciamento do <i>PRNP</i>	24
3.I.5	Cromatografia Líquida de Fase Reversa Denaturante (DHPLC)	27
3.I.6	Análise estatística	29
3.I.7	Clonagem	29
3	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS II – Cultura de Células	38
3.II.1	Cultura primária de cardiomiócitos de camundongo	38
3.II.2	Marcação de culturas primárias com indicador fluorescente de Ca ²⁺ Fluo-3 AM	39
3.II.3	Transfecção das linhagens celulares H9c2 (provenientes de cardiomiócitos de rato) e HEK293	40
3.II.4	<i>Western Blot</i>	41
3.II.5	Tratamento <i>in vitro</i> com doxorrubicina	42
3.II.6	Citometria de Fluxo	43
3.II.7	<i>Cell sorting</i>	44

3	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS III – Modelo animal	45
3.III.1	Animais	45
3.III.2	Animais tratados com doxorubicina	50
3.III.3	Análise Estatística	51
3.III.4	Avaliação das lesões cardíacas	51
4	RESULTADOS PARTE I – Pacientes	52
4.I.1	Estudo de polimorfismos em pacientes tratados com doxorubicina através da técnica de DHPLC	52
	PARTE II – Cultura de Células	61
4.II.1	Isolamento de cardiomiócitos obtidos a partir de culturas primárias de corações isolados de camundongos tipo selvagem (<i>ZPrnp^{+/+}</i>) e <i>ZPrnp^{0/0}</i>	61
4.II.2	Linhagem celular H9c2	63
4.II.3	Linhagem celular HEK293	72
	PARTE III – Modelo Animal	76
4.III.1	Animais tratados com doxorubicina	77
4.III.2	Avaliação do tecido cardíaco dos camundongos tratados com doxorubicina	82
5	DISCUSSÃO	89
6	CONCLUSÃO	98
7	PERSPECTIVAS	99
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1 INTRODUÇÃO

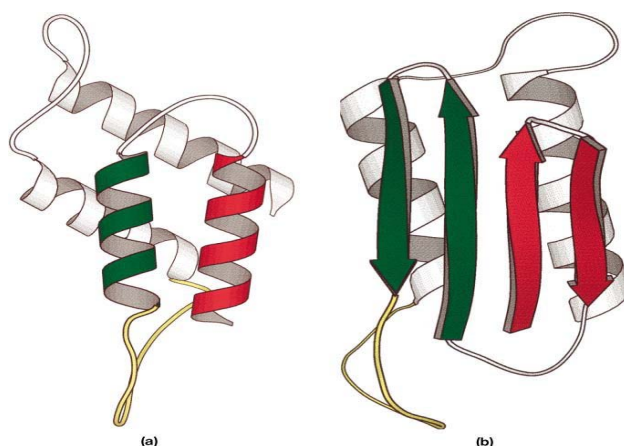
1.1 PRIONS

Prions são partículas infecciosas exclusivamente protéicas e que foram primeiramente identificadas em experimentos onde se procurava o agente responsável por doenças infecciosas e neurodegenerativas, denominadas encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs), como a encefalopatia espongiforme bovina ou doença da vaca louca (BSE), a síndrome de Creutzfeldt-Jakob (CJD), kuru, Insônia familiar fatal (FFI) e a doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) em humanos (PRUSINER 1998; AGUZZI e POLYMENIDOU 2004; KACHEL et al. 2006). Durante as décadas de 80 e 90, a BSE foi a TSE mais alarmante, pois foi a responsável pelo surgimento na nova variante de CJD (vCJD) em humanos, onde os indivíduos foram contaminados devido à ingestão de derivados de carne bovina contaminada (AGUZZI 1996; BUTLER 1996). Sendo assim, as doenças de príons tornaram-se um problema econômico mundial e de saúde pública.

As TSEs são caracterizadas por demência progressiva, ataxia, associada por degeneração espongiforme do cérebro com eventual deposição de material amilóide no sistema nervoso central (revisado por MALLUCCI e COLLINGE 2004). Embora a etiologia das TSEs tenha permanecido obscura durante muitos anos, sendo atribuída a uma infecção

por vírus de ação lenta ou viróides, sabe-se hoje que elas são causadas pelo acúmulo intracerebral progressivo da proteína prion ou PrP^{Sc} (Revisado por PRUSINER 1991, 1997 e 1998).

O sequenciamento de uma fração proteica de 27 a 30 Kda (PrP 27-30), produzida por uma proteólise da PrP^{Sc} permitiu a identificação do gene *Prnp*, que codifica a proteína prion celular (PrP^C) (BOLTON et al. 1984; PRUSINER et al. 1984). Tanto a PrP^{Sc} quanto a PrP^C têm a mesma sequência de aminoácidos, onde PrP^C é composta de 40% de conformação estrutural em folha α -hélice, enquanto a PrP^{Sc} é composta de 50% de folhas β -pregueadas e 20% de α -hélice (PAN et al. 1993) (**Figura 1**), o que explica a tendência da PrP^{Sc} em formar agregados proteicos compactos e resistentes à protease, que então se acumulam no cérebro (ROSS et al. 2004). A infecção se dá pela interação da PrP^C com a PrP^{Sc}, que causa conversão da proteína normal em infecciosa, e novas moléculas de PrP^{Sc} são geradas exponencialmente (revisado em MARTINS 1999).



Legenda: A estrutura da PrP^C (à esquerda) é caracterizada por 4 regiões em α -hélice. A forma infecciosa, PrP^{Sc} (à direita), possui maior quantidade de folhas β -pregueadas quando comparada a PrP^C.

Fonte: PRUSINER (1999)

Figura 1 - Estrutura tridimensional proposta para PrP^C e PrP^{Sc}.

Como ambas as moléculas são codificadas pelo mesmo gene e diferem somente em sua conformação estrutural, acredita-se que as propriedades distintas entre ambas seja decorrente de modificações pós-traduacionais da proteína, levando vários grupos de pesquisa ao redor do mundo a tentar entender o mecanismo pelo qual ocorre a conversão da PrP^C na PrP^{Sc}.

1.2. ESTRUTURA DA PrP^C

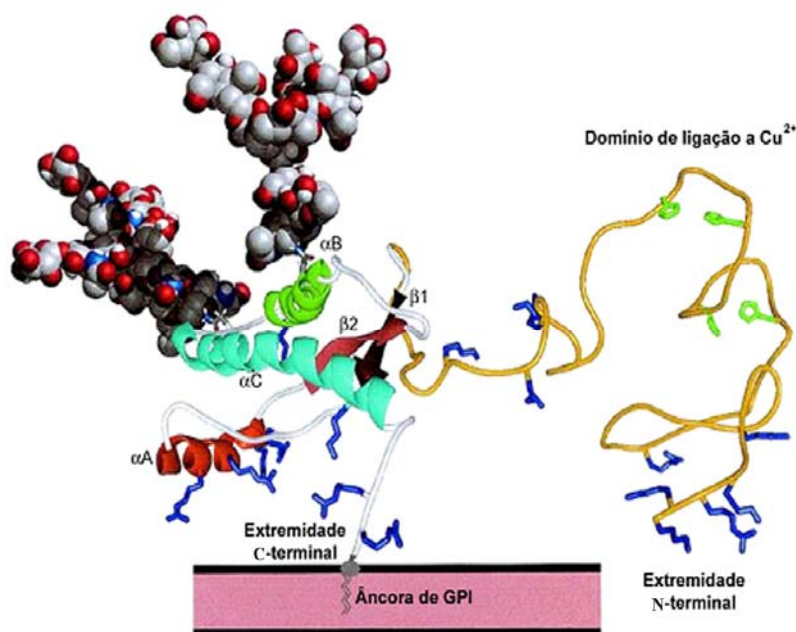
Há pelo menos duas décadas os genes que codificam a proteína prion celular no homem, hamster, camundongo, rato, cabra e galinha foram seqüenciados (BASLER et al. 1986; KRETZSCHMAR et al. 1986; LOCHT et al. 1986; WESTAWAY e PRUSINER 1986; LIAO et al. 1987; HARRIS et al. 1991), sendo o gene de PrP^C humano denominado de *PRNP* e o de camundongo *Prnp*. Extremamente conservado entre as espécies, todos codificam proteínas de aproximadamente 250 aminoácidos, e 27kDa com um peptídeo sinalizador de 22 aminoácidos na extremidade amino-terminal e um peptídeo hidrofóbico de 23 aminoácidos na porção carboxi-terminal.

PrP^C é sintetizado no retículo endoplasmático rugoso, encaminhado para o Golgi e transportado até a superfície celular (revisado por HARRIS 1999). Após a clivagem dos 22 aminoácidos (aa) do peptídeo sinal, a maior parte da PrP^C de mamíferos é exportada para a superfície celular como uma proteína de 208-209 aa N-glicosilada e ancorada à GPI (glicosil-fosfatidilinositol) (STAHL et al. 1987).

Na membrana plasmática, PrP^C encontra-se em microdomínios ricos em colesterol, denominados de *rafts* (KESHET et al. 2000), mas a PrP^C pode também ser encontrada em outras organelas celulares como no complexo de Golgi e em endossomos de reciclagem (LEE et al. 2001), ou no compartimento citoplasmático, uma vez que esta sofre ubiquitinação e degradação pelo sistema de proteassoma (MA e LINDQUIST 2001).

A estrutura tridimensional de PrP^C em mamíferos foi determinada por ressonância nuclear magnética em pH ácido (RIEK et al. 1996, 1997; LOPÉZ-GARCIA et al. 2000; ZAHN et al. 2000; HORNEMANN et al. 2004; CALZOLAI et al. 2005; LYSEK et al. 2005). Os resultados obtidos mostraram que PrP^C contém uma porção N-terminal flexível com uma sequência de cerca de 100 aa em *random coil*, e uma porção C-terminal globular de outros 100 aa. A porção globular da PrP^C está estruturada em três α -hélices (que compreendem os aa 144 ao 154, 173 ao 194 e 200 ao 228), intercaladas por duas folhas β pregueadas nos resíduos 128 ao 131 e 161 ao 164 (revisado em LINDEN et al. 2008). PrP^C sofre ainda outras modificações pós-traducionais como adição de oligossacarídeos N-ligados em regiões consenso e formação de uma ponte de dissulfeto intramolecular entre os resíduos de cisteína 179 e 214 (CAUGHEY et al. 1989; RUDD et al. 2002). **(Figura 2).**

Além disso, o domínio N-terminal de PrP^C (dos aa 59 ao 91) contém 4 ou 5 repetições de oito resíduos de aa (PHGGGWGQ) que se ligam ao Cu⁺² (HORNSHAW et al. 1995a e b; BROWN et al. 1997b).



Legenda: A porção N-terminal (resíduos 23-124) aparece como *random coil* (em amarelo) e a âncora de GPI em cinza. Estrutura secundária: hélice A (αA ; resíduos 144-154; vermelho), hélice B (αB ; resíduos 173-194; verde), hélice C (αC ; resíduos 200-228; azul claro), folhas- β $\beta 1$ (resíduos 128-131; vermelho) e $\beta 2$ (resíduos 161-164; vermelho escuro). Cadeias laterais de histidina envolvidas com a ligação de cobre são mostradas em verde. Resíduos de lisina e arginina representados como palitos em azul.

Fonte: Adaptado de BENNION e DAGGETT (2002).

Figura 2 - Estrutura de PrP^C baseada em NMR (ressonância magnética nuclear) modelados com oligossacarídeos (representação compacta).

1.3 FUNÇÕES CELULARES DA PrP^C

Dentre as várias funções já demonstradas de PrP^C estão a sua participação em adesão, diferenciação e sinalização celulares (revisado por MARTINS et al. 2002). Alguns estudos sugerem que as doenças priônicas

são causadas por ganho de função da proteína prion celular que se torna neurotóxica ao se transformar na forma infecciosa. Entretanto, é possível que a patogênese destas doenças possa também estar relacionada à perda de função de PrP^C (SAMAIA e BRENTANI 1998; MARTINS et al. 2002; HETZ et al. 2003; SOTO e CASTILLA 2004). Sendo assim, tornou-se essencial o entendimento das funções de PrP^C e sua relevância biológica.

Nosso grupo demonstrou que PrP^C pode se ligar a três proteínas: proteína 1 de estresse (STI1, do inglês stress inducible protein 1), Vitronectina (VN) e Laminina (LN). A ligação entre PrP^C e STI1 é específica e de alta afinidade no sítio que compreende os aminoácidos 113-128 da molécula de PrP^C e nos resíduos 230-245 de STI1. A interação entre as duas proteínas desencadeia sinais de sobrevivência celular dependentes da via de PKA em neurônios retinianos (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002) e promove crescimento neurítico, além de proteger neurônios hipocámpais da morte celular induzida por estaurosporina (LOPES et al. 2005). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a interseção PrP^C-STI1 promove formação e consolidação de memória em ratos (COITINHO et al. 2007).

A interação da PrP^C com vitronectina ocorre através de uma ligação de alta afinidade entre os resíduos 105 a 119 da molécula de PrP^C e os resíduos 309-322 na molécula de vitronectina. Esta interação promove crescimento axonal de gânglios da raiz dorsal (HAJJ et al. 2007).

A ligação de PP^C à laminina induz adesão neuronal, extensão e manutenção neurítica. Seu sítio de ligação está em um peptídeo carboxi-

terminal da cadeia gama-1 da laminina (LN- γ 1), que é muito conservado em todos os tipos de laminina (GRANER et al. 2000), o que indica que a interação laminina-PrP^C pode ser relevante em outros tecidos além do cérebro. Já foi demonstrado que a interação entre laminina e PrP^C no hipocampo auxilia na consolidação da memória via PKA (proteína quinase A) e ERK1/2 (proteína quinase reguladora de sinal extracelular 1 e 2) (COITINHO et al. 2006).

A região N-terminal da PrP^C contém uma região de octapeptídeos repetidos, que está envolvida na ligação de íons de metais divalentes, particularmente o cobre. Foi sugerido que a PrP^C estaria envolvida com o transporte do cobre e seu metabolismo em mecanismos de defesa neuronal contra o estresse oxidativo. Este mecanismo protetor poderia envolver a regulação da atividade intracelular da enzima CuZn superóxido dismutase (Cu/Zn SOD) ou através de uma atividade *SOD-like* da PrP^C (revisado em BROWN 2001). A expressão de PrP^C em murinos aumenta várias vezes a atividade de enzimas antioxidantes e os níveis de glutathiona. Sendo assim, a PrP^C pode ser um sensor de estresse sensível ao cobre e capaz de iniciar, após ligação a este metal, um processo de transdução de sinal intracelular nos sistemas anti-oxidantes para melhorar as defesas celulares (RACHIDI et al. 2003) e pode ainda participar na modulação da ativação de plasminogênio tecidual de maneira dependente de íons cobre (ELLIS et al. 2002).

Como a PrP^C é reciclada da membrana para o compartimento intracelular e este evento é induzido pela ligação ao cobre, é também

possível que os mecanismos de internalização deste metal permitam a troca de sinais celulares (revisado em MARTINS e BRENTANI 2002).

Animais que tiveram o gene que codifica PrP^C removido, possuem 20 vezes menos cobre no cérebro que animais normais, indicando que a associação é fisiológica (BROWN et al. 1997b). Além disso, células de cerebelo de animais que não expressam PrP^C são mais sensíveis a radicais livres que células normais (BROWN et al. 1997a). Uma vez que a ligação a cobre é importante para a atividade catalítica de muitas enzimas envolvidas com o estresse oxidativo, incluindo a superóxido dismutase (BROWN et al. 1999), foi sugerido que PrP^C possa atuar como um depósito de íons cobre destinado à ligação a enzimas que previnem o estresse oxidativo (BROWN et al. 1997c; BROWN et al. 1999).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo em organismos vivos ocorre quando há um desbalanço entre a produção de radicais livres e as defesas anti-oxidantes da célula, o que provoca dano tecidual através da modificação de biomoléculas essenciais (HALLIWELL e GUTTERIDGE 1999). Algumas evidências sugerem que o estresse oxidativo exerce uma função na disfunção cardíaca e endotelial sob uma variedade de condições patológicas e fisiológicas, tais como isquemia/ reperfusão, aterosclerose, hipertrofias e falhas cardíacas, hipertensão, falhas renais, cardiomiopatias induzidas por catecolamina, por antracíclicos e diabética e fibrilação atrial (HALLIWELL e

GUTTERIDGE 1999; DHALLA et al. 2000; KORANTZOPOULOS et al. 2003).

A PrP^C tem uma expressão particularmente alta no sistema nervoso, mas sua expressão pôde ser detectada em vários órgãos e tecidos. Particularmente, sua expressão em culturas de mioblastos e miócitos de camundongos sugere que PrP^C possa ter um papel fisiológico em músculo cardíaco, pois quando os miotubos se diferenciam a partir de mioblastos, a expressão da proteína prion celular é aumentada assim como a regulação da enzima Cu/Zn superóxido-dismutase (SOD-1) (BROWN et al. 1998). Células musculares derivadas de camundongos deficientes em PrP^C têm um pequeno aumento na quantidade de SOD-1 após a diferenciação dos mioblastos em miotubos quando comparados aos animais do tipo selvagem. Além disso, mioblastos de animais normais são mais resistentes a um peptídeo da proteína prion (PrP106–126), que agrega e compete pelo sítio de ligação à STI-1, do que as mesmas células de animais “nocautes” desta proteína (BROWN et al. 1998). Em tecidos que expressam normalmente PrP^C em concentrações de moderada a alta, a retirada da proteína prion celular resultou em diminuição no número de mitocôndrias, além destas apresentarem uma morfologia anormal e atividade elevada de enzima antioxidante mitocondrial superóxido dismutase dependente de manganês (Mn/SOD) (MIELE et al. 2002).

Como muitas enzimas anti-oxidantes dependem do cobre como, por exemplo, a Cu/Zn SOD, suas funções podem ser afetadas pelas doenças por prions. KLAMT et al (2001) demonstraram que, na ausência de PrP^C, há

um aumento na peroxidação de lipídios e proteínas em diversas estruturas periféricas, como nos músculos quadríceps e paravertebral, em órgãos como o fígado e o coração e em diferentes regiões do SNC (córtex parietal e entorinal, cerebelo e hipocampo), sugerindo que uma das funções fisiológicas de PrP^C esteja relacionada a defesas celulares anti-oxidantes (KLAMT et al. 2001).

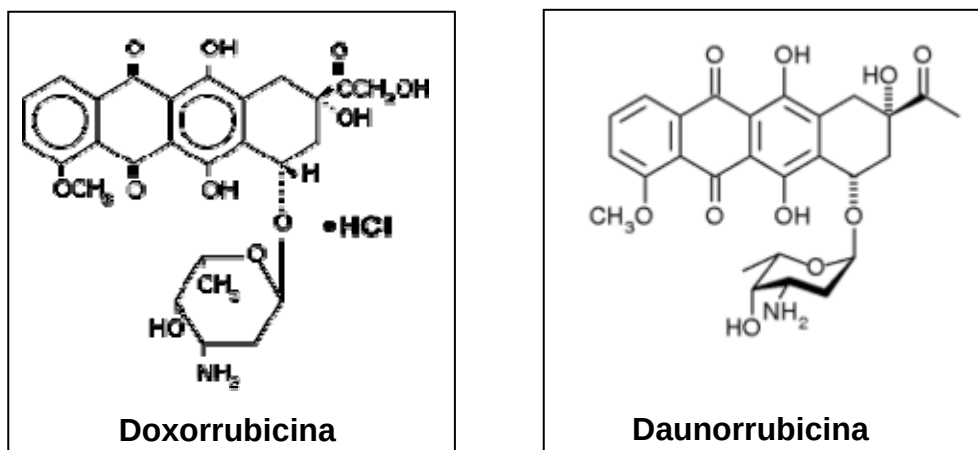
1.5 CÂNCER E DOXORRUBICINA

A história da doxorubicina pode ser rastreada até a década de 1950, quando uma empresa de investigação italiana, Farmitalia Research Laboratories, começou a organizar um esforço para encontrar compostos anticancerígenos à base de microrganismos do solo. Uma nova cepa de *Streptomyces peucetius* que produzia um pigmento vermelho brilhante foi isolada e um antibiótico foi produzido a partir desta bactéria, pois tinha uma boa atividade contra tumores murinos. Na mesma época, pesquisadores franceses também descobriram os mesmos compostos, e as duas equipes nomearam o composto de Daunorubicina (**Figura 3**), combinando o nome *Daunii*, uma tribo pré-romana que ocupou a área da Itália onde o composto foi isolado, com a palavra francesa para rubi, *rubis*, descrevendo a cor vermelha (revisado em WEISS 1992).

Os ensaios clínicos começaram na década de 1960, já que a droga obteve sucesso no tratamento de leucemias agudas e linfomas. No entanto,

em 1967, foi reconhecido que a daunorubicina poderia produzir toxicidade cardíaca fatal (TAN et al. 1967).

Pesquisadores logo descobriram que mudanças na atividade biológica poderiam ser feitas através de pequenas alterações na estrutura do composto. A cepa de *Streptomyces* foi mutada usando N-nitroso-N-metil uretano e esta nova cepa produziu um antibiótico diferente, de cor vermelha que apenas difere do anterior pela presença de um grupo hidroxil (**Figura 3**). Eles nomearam este novo composto de Adriamicina (em homenagem ao Mar Adriático), e o nome foi alterado posteriormente para doxorubicina conforme o estabelecido pela nomenclatura (ARCAMONE et al. 1969). A doxorubicina mostrou melhor atividade do que a daunorubicina contra tumores murinos, especialmente tumores sólidos. Ela também demonstrou um índice terapêutico relativamente melhor, mas a cardiotoxicidade permaneceu (DI MARCO et al. 1969).



Legenda: A Doxorubicina consiste de um núcleo de naftacenequinona ligado através de uma ligação glicosídica no átomo 7 do anel tetracíclico, à um açúcar amino, a daunosamina. O anel antracíclico é lipofílico, mas a porção saturada do anel contém muitos grupos hidroxil adjacentes ao açúcar amino, produzindo um centro hidrofílico. A molécula é anfotérica, contendo funções ácidas nos anéis fenólicos e funções básicas no grupamento amino. Ela se liga tanto a membranas celulares quanto à proteínas plasmáticas. A Doxorubicina é um análogo 14 vezes hidroxilado da Daunorubicina, seu precursor.

Figura 3 - Fórmula estrutural da Doxorubicina ($C_{27}H_{29}NO_{11}$) (PM= 543.52) e da Daunorubicina ($C_{27}H_{29}NO_{10}$) (PM=527,52)

O mecanismo exato de ação da doxorubicina é complexo e ainda pouco claro, porém ela pode ter atividade de intercalante de DNA (FORNARI et al. 1994) e inibição da biossíntese macromolecular (MOMPARLER et al. 1976), inibindo a enzima topoisomerase II, que desenrola o DNA para replicação. A Doxorubicina estabiliza o complexo topoisomerase II após este ter quebrado a cadeia de replicação do DNA, impedindo que a dupla hélice de DNA seja liberada e o processo de replicação pare.

A Doxorubicina é um quimioterápico comumente usado para tratar tanto tumores sólidos quanto tumores hematopoiéticos. Seu uso é limitado

devido a seu maior efeito colateral: a cardiotoxicidade (SINGAL e ILISKOVIC 1998), que não tem sido eficientemente prevenida com drogas cardioprotetoras (GHARIB e BURNETT 2002). Efeitos colaterais agudos da doxorubicina podem incluir náuseas, vômitos e arritmias cardíacas. Ela também pode causar neutropenia, bem como a completa alopecia. Quando a dose cumulativa de doxorubicina chega a 550mg/m², os riscos de desenvolvimento de efeitos secundários cardíacos, incluindo insuficiência cardíaca congestiva, cardiomiopatia dilatada e morte, aumentam drasticamente (revisado em WEISS 1992).

A cardiotoxicidade causada pela Doxorubicina é dose-dependente, com declínio na fosforilação oxidativa mitocondrial. Espécies reativas de oxigênio, gerados pela interação de doxorubicina com ferro, podem danificar os miócitos, causando perda miofibrilar e vacuolização citoplasmática.

O mecanismo pelo qual a doxorubicina e seus metabólitos causam a cardiomiopatia crônica ainda não é totalmente compreendida. Hipóteses de como ocorre a cardiotoxicidade incluem mudanças na homeostase de cálcio, geração de radicais livres de oxigênio, disfunção mitocondrial e danos à membranas celulares (MORDENTE et al. 2001).

Várias alternativas foram propostas para evitar a cardiotoxicidade da doxorubicina, tais como formulações especiais ou infusões, desenvolvimento de análogos e o uso de cardioprotetores (revisado por ROBERT 2007).

Uma redução progressiva da fração de ejeção do ventrículo esquerdo ocorre em cerca de 10% dos pacientes tratados com doxorubicina quando recebem uma dose cumulativa maior que 550 mg/m^2 de área corpórea. Pediatras estão especialmente cientes da possibilidade de ocorrerem falhas cardíacas vários anos após a cura de leucemias e tumores sólidos em crianças (STEINHERZ et al. 1992; LEANDRO et al. 1994).

Animais tratados intravenosamente com doxorubicina, tanto com uma única dose de 10 mg/kg quanto com uma dose cumulativa de até 30 mg/kg , em três injeções, apresentaram degenerações no tecido cardíaco quando observados por microscopia ótica e eletrônica (DELL'AQUA et al. 1999).

Várias estratégias para redução da cardiotoxicidade dos antracíclicos já foram propostas e um número de potenciais cardioprotetores já foram citados para serem desenvolvidos, tais como N-acetilcisteína (VILLANI et al. 1990), α -tocoferol (JULICHER et al. 1986), dexrazoxane (HERMAN e FERRANS 1986) e, mais recentemente, vários flavonóides (VAN ACKER et al. 2001). Existem estudos com drogas encapsuladas com lipossoma reduzindo a toxicidade cardíaca dos antracíclicos através da redução do acúmulo da droga no miocárdio (SAFRA et al. 2000; revisado em EWER et al. 2004).

Além do estresse oxidativo, o uso da doxorubicina é também responsável pela desregulação do óxido nítrico, que leva a produção de peroxinitrito, um oxidante altamente reativo responsável por várias formas de injúrias cardíacas. Camundongos que receberam uma única injeção de

doxorrubicina (25mg/kg IP), após 5 dias, tinham sua performance ventricular esquerda significativamente diminuída, e era verificada alta taxa de mortalidade (PACHER et al. 2003)

Estudos preliminares demonstraram que a doxorrubicina inibe a síntese do DNA e do RNA levando a uma atividade anti-oxidante diminuída resultante da expressão inibida do gene da metalotioneína. Após tratamento com uma dose única de doxorrubicina (15mg/kg IP), tanto as concentrações do mRNA quanto da proteína metalotioneína aumentaram no coração, o que sugere que há uma *up-regulation* da expressão deste gene cuja proteína tem ação antioxidante em resposta à doxorrubicina (YIN et al. 1998).

Observações preliminares de que a doxorrubicina interagiu com o citocromo c oxidase (COX) mitocondrial e suprimia sua atividade enzimática levaram a investigação da ação desta droga nas funções cardíacas e na morfologia mitocondrial em miócitos de camundongos Balb-c tratados intraperitonealmente com doxorrubicina por várias semanas (PAPADOPOULOU et al. 1999). Foi observado que o tratamento dos camundongos com doxorrubicina causou arritmias cardiovasculares caracterizadas por bradicardia, extensão do tempo de despolarização ventricular (tQRS), e falha no QRS em altas concentrações da droga (10–14mg/kg, em doses cumulativas). As mitocôndrias de células cardíacas sofreram retração, fusão, dissolução e/ou ruptura de sua crista após várias semanas de tratamento. Tais anormalidades não foram observadas nas mitocôndrias do fígado. Entre os três genes de COX examinados, apenas a expressão do COXII foi suprimida pelo tratamento com a doxorrubicina, principalmente após 8

semanas tanto no coração quanto no fígado. Os efeitos deteriorantes da doxorubicina nas funções cardiovasculares envolvem incapacidade estrutural e funcional da mitocôndria (PAPADOPOULOU et al. 1999).

Camundongos heterozigotos para a enzima carbonil redutase 1 (CBR1) cardíaca, que cataliza a redução da doxorubicina a doxorubicinol, o metabólito tóxico envolvido na toxicidade cardíaca crônica (LICATA et al. 2000) são protegidos dos efeitos cardiotoxícos da doxorubicina após serem tratados com 20 mg/kg intraperitonealmente quando comparados a animais tipo selvagem (OLSON et al. 2003), o que demonstra que baixos níveis dessa enzima poderiam levar a uma diminuição na cardiotoxicidade causada pela doxorubicina.

Portanto, o tratamento com doxorubicina parece ter como maior efeito colateral a lesão cardíaca por radicais livres. Isto pode significar uma séria consequência em um número cada vez maior de pacientes tratados e curados de câncer.

É sabido que a resposta cardiotoxica à doxorubicina em pacientes com câncer é variável e depende de cada indivíduo (SINGAL e ILISKOVIC 1998; JENSEN et al. 2002). Além disso, vários relatos da literatura mostram que polimorfismos de determinados genes podem estar envolvidos na susceptibilidade individual às drogas (revisado em SAKAEDA et al. 2002; SHI 2002), como no caso de um aumento na atividade transcripcional do gene de multi-resistência a drogas (MDR-1).

1.6 PrP^C, DOXORRUBICINA E PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO

O gene *PRNP*, que codifica a proteína PrP^C humana está localizado no braço curto do cromossomo 20 e é composto por 2 exons, sendo que a fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) está contida no segundo exon, que é composto por 737 pares de base. O *PRNP* apresenta vários polimorfismos que, em alguns casos, podem determinar a susceptibilidade à infecção por prions (MEAD et al. 2003).

Existem na literatura 55 mutações no gene *PRNP* associadas a doenças priônicas genéticas: sendo 27 mutações por inserção, 24 mutações *missenses* (tradução da proteína com troca de aminoácidos), 2 mutações por depleção, 2 mutações *nonsense* (tradução de proteína truncada) e 16 polimorfismos identificados em humanos. Destes polimorfismos, 12 são silenciosos (não resultam em modificação do aminoácido) e quatro levam à modificação do aminoácido (PARCHI et al. 1996; PRUSINER 1997; JACKSON e COLLINGE 2001).

Recentemente uma mutação autossômica dominante no códon H187R foi descrita em uma família com desordens neuropsiquiátricas e posterior demência (HALL et al. 2005). Além disso, sabemos que uma mutação no códon 178 do gene de PrP^C (*PRNP*) está ligada tanto à Insônia Familiar Fatal (IFF), como ao GSS, mas quem determina o tipo de doença acompanhada por essa mutação é um polimorfismo presente no códon 129 (GOLDFARB et al. 1992). Esse mesmo polimorfismo no códon 129 tem

papel na expressão fenotípica de outras doenças por prions, sejam elas esporádicas, genéticas ou iatrogênicas (GOLDFARB et al. 1992; MONTAGNA et al. 1998; ALPEROVITCH et al. 1999; WILL et al. 2000).

O polimorfismo no códon 129 de *PRNP* está presente em heterozigose (Met/Val) em cerca de 49% dos indivíduos caucasianos, em homozigose para metionina (M129M) em 43%, e 8% em homozigose para Valina (V129V). Na população japonesa e chinesa a distribuição é bem diferente, sendo que os japoneses apresentam apenas 8% dos indivíduos com genótipo M129V, 92% M129M e 0% V129V; e os chineses 97% M129M, 3% M129V e 0% V129V (DOH-URA et al. 1991; TSAI et al. 2001; WALZ et al. 2003)).

Portanto, o códon 129 parece ter um papel importante na estrutura da molécula de PrP^C e estudos mostram uma maior propensão a formação de folha β -pregueada quando metionina está nesta posição (PETCHANIKOW et al. 2001). A presença de metionina neste códon está associada a maior susceptibilidade a doenças por prion esporádicas bem como a nova variante de CJD (WADSWORTH et al. 2004). Sendo assim, pode-se admitir que a presença de um ou outro aminoácido neste códon possa interferir não só com a patologia das doenças de prion, mas também com a função fisiológica de PrP^C.

Variantes alélicas do códon 129 já foram associadas com melhor desempenho cognitivo em pacientes idosos, em indivíduos com síndrome de Down, com doença de Alzheimer (RUJESCU et al. 2003; DEL BO et al. 2003 e 2006; GACIA et al. 2006).

Além disso, este polimorfismo pode influenciar o aparecimento de sintomas neurológicos e hepáticos na Doença de Wilson (GRUBENBECHER et al. 2006). Uma melhor memória de longa duração foi ainda associada com o alelo 129 metionina em adultos jovens normais (PAPASSOTIROPOULOS et al. 2005).

Interessantemente, um outro polimorfismo está caracterizado na região de octapeptídeos repetidos, que é justamente o domínio da proteína relacionado à proteção contra estresse oxidativo. Cerca de 90% da população humana apresenta 5 octapeptídeos repetidos e 10% 4 octapeptídeos repetidos (PERRY et al. 1995). Esta região da PrP^C se liga a íons cobre e confere à PrP^C sua característica de semelhança à enzima SODCu/Zn, que é responsável pela proteção contra o estresse oxidativo. No entanto, a presença de três ou mais que 7 octapeptídeos repetidos está associada a doenças por prion (GOLDFARB et al. 1993).

Entretanto, não há na literatura descrição deste ou de outro polimorfismo de PrP^C estar relacionado a maior ou menor proteção contra estresse oxidativo, principalmente em condições não fisiológicas.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo determinar o papel de PrP^C na proteção contra o estresse oxidativo desencadeado pelo uso de doxorubicina em pacientes oncológicos que foram tratados com doxorubicina, em culturas de células cardíacas e em modelos animais.

2 OBJETIVOS

- ✓ Determinar a frequência das variantes alélicas relacionadas à deleção de uma região de octapeptídeos repetidos (4 ou 5 repetições) e do códon 129 (M129M, M129V e V129V) de *PRNP* em pacientes tratados com o quimioterápico doxorrubicina e correlacionar esses dados com o grau de lesão cardíaca tardia presente neste indivíduos.
- ✓ Avaliar o papel das diferentes variantes alélicas relacionadas à deleção de uma região de octapeptídeos repetidos (4 ou 5 repetições) e do códon 129 (M129M, M129V e V129V) de *PRNP* na proteção contra o estresse oxidativo induzido por doxorrubicina em cultura primária e em linhagem celular de cardiomiócitos.
- ✓ Avaliar o papel da PrP^C na sensibilidade aos efeitos tóxicos da doxorrubicina usando modelos animais de camundongos “nocaute” e que têm expressão aumentada da proteína PrP^C e compará-los com seus respectivos controles tipo selvagem.
- ✓ Correlacionar a toxicidade causada pela doxorrubicina através da expressão de enzimas relacionadas com o estresse oxidativo com a expressão de PrP^C, usando modelos animais de camundongos “nocaute” e que têm expressão aumentada da proteína PrP^C e compará-los com seus respectivos controles tipo selvagem.

3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

PARTE I – PACIENTES

3.1.1 Pacientes

No presente trabalho foram estudados pacientes do Hospital A. C. Camargo, curados de algum tipo de câncer e que receberam tratamento com doxorubicina. Estes pacientes estavam fora de tratamento quimioterápico há pelo menos três anos e não receberam qualquer tipo de tratamento radioterápico mediastinal ou torácico, já que a radiação sabidamente pode causar alterações cardíacas. Eles fazem parte do Grupo de Estudos Pediátricos dos Efeitos Tardios da Terapia Oncológica (GEPETTO), do Departamento de Pediatria, e estão em constante avaliação ambulatorial. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (número 527/03).

Um termo de consentimento pós-informado foi preenchido e assinado pelos pacientes quando da coleta do sangue periférico. Estes concordaram no uso de seu DNA para este estudo. No presente estudo foram avaliados um total de 162 pacientes.

Paralelamente, foi feito o levantamento de prontuário dos pacientes pelos alunos de Iniciação Científica do programa PIBIC/CNPq Hernani O. Marinho Neto e Marcell Cairão Cominato sob supervisão do médico residente Dr. Luiz Sakamoto. O médico cardiologista Dr. Júlio Santin avaliou por ecocardiografia a função cardíaca destes pacientes.

3.1.2 Exame Ecocardiográfico

Todos os registros ecocardiográficos e a análise dos dados foram realizadas por um único examinador (Dr. Julio Santin), no setor de Imagem do Hospital A.C. Camargo.

O aparelho utilizado para a realização dos exames ecocardiográficos foi o modelo Logic 500 da marca GE. Utilizou-se um transdutor multifrequencial eletrônico de 2,5 a 3,75 MHz. Os pacientes foram monitorizados com eletrocardiograma durante o registro ecocardiográfico. Os exames foram realizados com os pacientes em decúbito lateral esquerdo, sendo obtidas imagens nos cortes paraesternal longitudinal e transversal e apicais com quatro e duas câmaras. As medidas do modo-M e do modo bidimensional foram obtidas segundo as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN et al. 1978; TAJIK et al. 1978). Todos os exames foram gravados em fita de vídeo (VHS) para posterior análise do observador. Os dados foram coletados e registrados em um banco de dados (SPSS versão 13.0).

Foram considerados indivíduos com alteração na Fração de Ejeção Ventricular Esquerda (FEVE) aqueles que apresentaram FEVE menor ou igual a 55%, e foram considerados com FEVE não alterada aqueles que apresentaram FEVE maior que 55% (Santin 2007).

Todas as medidas e cálculos foram realizadas utilizando-se sistema de vídeo e “software” cardiológico do aparelho HDI-5000.

3.1.3 Purificação de DNA de Leucócitos

DNA total foi purificado usando o kit “*Wizard Genomics DNA Purification Kit*” (PROMEGA) a partir de leucócitos obtidos de 5mL de sangue periférico.

Seguindo o protocolo do fabricante, as amostras de sangue foram homogeneizadas por 15 minutos a temperatura ambiente. A 3mL de sangue foram adicionados 9mL de solução de lise e o volume total agitado por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir o material foi centrifugado por 10 minutos a 1700 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado vigorosamente. A seguir foram adicionados 3mL de solução contendo Tris [hidroximetilaminoetano], EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) e SDS (dodecil sulfato de sódio) para promover a lise nuclear. Foram então adicionados 30µL de RNase (4mg/mL), com posterior incubação a 37° C por 30 minutos. A amostra foi rapidamente resfriada a 4°C e 2mL de solução de precipitação de proteínas (contendo SDS) foi adicionada e misturada que foi então agitada vigorosamente. O material foi centrifugado (1700 x g) por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo contendo 3mL de isopropanol, sendo então misturado lentamente até que o DNA precipitasse. Uma nova centrifugação (1700 x g) foi realizada durante 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado então lavado com 3mL de etanol 70%, seguido de outra centrifugação (1700 x g) por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o DNA purificado foi seco por 30 minutos a temperatura ambiente e ressuspenso em 100µL de Líquido

de Hidratação (Tris/EDTA), seguido de uma incubação a 65° C, para a completa solubilização.

A quantificação do DNA foi feita pela dosagem de sua absorbância a partir da leitura da amostra no comprimento de onda de 260nm em um espectrofotômetro. A pureza do DNA representada pela relação da leitura 260/280nm foi sempre superior a 1,8. Para verificação da qualidade da amostra, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose. Cada amostra foi catalogada e armazenada a -20°C para posterior sequenciamento.

3.1.4 Sequenciamento do gene *PRNP*

a) Amplificação de *PRNP*

Como o tamanho da região codificadora de *PRNP* (ORF ou fase aberta de leitura) é grande para que se consiga seqüenciá-la numa única reação, esta foi dividida em dois fragmentos sobrepostos e foram desenhados *primers* (iniciadores) a partir da sequência AY008282, depositada no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): *Fragmento1*, *sense1* 5'ATG CTG GTT CTC TTT GTG3' e *antisense1*: 5'AAC GGT CCT CAT AGT CAC TGC3', que correspondem a 423 pb, e tem início no nucleotídeo 65 e término no 488, e *Fragmento2*, *sense2* 5'TCA TGG TGG TGG CTG GGG TCA3' e *antisense2*: 5'CGC CTC CCT CAA GCT GGA AAA3', contendo 404 pb, com início no nucleotídeo 455 e término no 858.

Utilizamos o software Premier Primer[®], disponível na internet (<http://www.premierbiosoft.com>) para analisar a seqüência dos iniciadores na

tentativa de prevenir possíveis formações de "hairpins" e dímeros. Esses iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen do Brasil (São Paulo, Brasil).

As amostras foram amplificadas por PCR, utilizando-se o Kit de amplificação *Taq DNA polimerase* (Promega, WI, USA). As reações foram feitas em um volume de 20 μ L contendo 50vg de DNA genômico (diluído em água Dnase/Rnase Free, Invitrogen), 20mM Tris HCl pH 8,0; 50mM KCl; 25mM MgCl₂; 500 μ M dNTP (Life Technologies, Gibco BRL); 0,5 μ M de iniciadores (sense e antisense) e 1U de Taq DNA polimerase.

Para o Fragmento1, as condições de ciclagem foram 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min seg, 64°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 min.

Para o Fragmento2, As condições de ciclagem foram 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min seg, 66°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, diluídos na proporção 1:5 em TBE (TRIS Borato EDTA). Após a corrida, o gel foi incubado por 40 minutos com Sybr Gold® (Invitrogen - cat S11494) e os produtos amplificados foram visualizados em Luz UV.

Os produtos destas amplificações foram então utilizados nas reações de sequenciamento.

b) Sequenciamento de *PRNP*

Após ter o DNA amplificado (item I.3.1) utilizamos o kit *DYEnamic ET Terminator*[®] (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, USA) para a reação de sequenciamento. As reações foram realizadas segundo as especificações do fabricante, em um volume final de 10 μ L contendo 0,2pmoles de DNA genômico e 0,5pmoles de iniciador, adicionados a mistura reagente contendo os dNTPs fluorescentes. A amplificação foi feita em termociclador *DNA Thermal Cycler PTC-100* (MJ Research, Inc), utilizando-se um programa com uma denaturação inicial de 1 minuto a 94°C, 1 minuto e 15 segundos a 60° C e 20 segundos a 94° C por 25 ciclos. Nestas reações foram usados iniciadores sintetizados pela Life Technologies do Brasil (S.P., Brasil). Para o fragmento 1 da sequência aberta de leitura de *PRNP* foi utilizado o iniciador F1seq – 5' CTG GTT CTC TTT GTG GCC 3' ou R1seq – 5' AAC GGT CCT CAT AGT CAC TGC 3'. Para o fragmento 2 da sequência aberta de leitura de *PRNP* foi utilizado o iniciador: F2 seq – 5'TGG TGG TGG CTG GGG TCA AGG 3' e R2 seq – 5' CTC CCT CAA GCT GGA AAA AGA 3'.

Após esta reação de ciclagem, foi adicionado 1 μ L de AcNa/EDTA (1,5M) e 40 μ L de etanol 95% e o material permaneceu por 15 min no escuro a 4° C. Este foi a seguir submetido a centrifugação a 10.600 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado lavado com 250 μ L de etanol 70%, seguido de centrifugação por 10.600 x g por 5 min a 4° C. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado seco a 55°C no escuro. As amostras foram aplicadas em gel e a leitura da sequência foi feita no

seqüenciador *ABI 3100 Genetic Analyzer* da Applied Biosystems (New Jersey, USA).

3.1.5 Cromatografia Líquida de Fase Reversa Denaturante (DHPLC)

DNAs extraídos de leucócitos de sangue periférico de pacientes (item I.2) foram amplificados por PCR, utilizando-se o Kit de amplificação *AmpliTaq Gold*[®] (Applied Biosystems, USA) com um volume final de 50µL contendo 100µg de DNA genômico (diluído em água *Dnase/Rnase Free*, Invitrogen), 4mM Tris HCl pH 8.3; 20mM KCl; 1,5mM MgCl₂; 20µM dNTPs (Amersham Pharmacia); 0,5µM de iniciadores (*sense1* e *antisense1*) e 5U de *AmpliTaq Gold*[®].

Para o Fragmento 1 (ver I.3.b) as condições de ciclagem foram 95°C por 10 min, seguido de 10 ciclos de 95°C por 1 min, 63° C por 1 min e 72° C por 1 min, 10 ciclos de 95°C por 1 min 61° C por 1 min e 72° C por 1 min, 10 ciclos de 95°C por 1 min, 59° C por 1 min e 72° C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 min.

Para o Fragmento 2 (ver I.3.b) as condições de ciclagem foram 95°C por 10 min, seguido de 10 ciclos de 95°C por 1 min, 62° C por 1 min e 72° C por 1 min; 10 ciclos de 95°C por 1 min, 60° C por 1 min e 72° C por 1 min; 10 ciclos de 95°C por 1 min 58° C por 1 min e 72° C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 min.

Após a amplificação por PCR, os DNAs foram submetidos à cromatografia de fase reversa denaturante (DHPLC) (*Wave-nucleic acid Fragment Analysis System* – *Trasgenomic Inc*, CA, USA). Os parâmetros de

gradiente e fluxo de tampões (tampão A = TEEA 5% e tampão B = acetonitrila a 25%) foram ajustados utilizando-se o software *Wavemaker System Control* (Transgenomic Inc, CA, USA).

Os produtos da reação de PCR foram primeiramente aquecidos a 95°C por 5 minutos, para denaturação total das fitas duplas de DNA, e resfriados gradativamente até a temperatura ambiente, para re-naturação. Em seguida as amostras foram colocadas no cromatógrafo, onde primeiramente foram submetidas a uma temperatura de 50°C, quando se analisou a qualidade do DNA (denominada "double-stranded sizing – single fragment"), e depois à temperatura de anelamento, onde foi feita a pesquisa de mutações ou polimorfismos pela formação de heteroduplex (HUBER et al. 1995) e que foi calculada pelo software *Wavemaker*, mostrando-se ótima para a resolução total dos heteroduplex em 65°C para o Fragmento1, e 61°C ou 63°C para o Fragmento2.

Amostras que revelaram somente um pico de saída do cromatograma (homoduplex) na análise de polimorfismos, foram submetidas novamente à análise cromatográfica após misturá-las em igual concentração com DNA protótipo (com os polimorfismos mais frequentes em homozigotidade) e denaturação da mistura a 95°C por 5 minutos, para formação de possíveis heteroduplex. O detalhamento desta técnica foi descrito por nosso grupo (CASTRO et al. 2004).

3.1.6 Análise estatística

As análises estatísticas do estudo, bem como o cálculo das medidas de dispersão e tendência central, foram realizadas utilizando-se o software SPSS 13.0 (Chicago, IL).

Foram analisados os casos que apresentavam as variantes polimórficas do gene *PRNP* e sua correlação com a presença de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) alterada ou não. A significância estatística das diferenças entre as variáveis categóricas foi avaliada através do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher e o respectivo intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

3.1.7 Clonagem dos Polimorfismos no Vetor pEGFP

a) Subclonagem do gene *PRNP*

A partir de DNAs de pacientes deste estudo, foi iniciada a construção dos clones contendo as diferentes combinações dos polimorfismos na região de octapeptídeos repetidos e no códon 129. Essas variantes alélicas foram utilizadas na transfecção celular e posteriormente na avaliação de sua participação na maior ou menor susceptibilidade ao tratamento com doxorubicina *in vitro*.

Sendo assim, após verificarmos os perfis genéticos através da técnica de DHPLC, procuramos amostras que contivessem os seguintes polimorfismos: quatro ou cinco repetições de oito peptídeos e/ou o aminoácido valina e/ou metionina no códon 129 para iniciarmos o processo de clonagem (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Construtos produzidos.

Variantes alélicas	Quantidade de octapeptídeos repetidos	Aminoácido no códon 129 do gene de PrP ^C
1	4	Metionina
2	4	Valina
3	5	Metionina
4	5	Valina

Como não havia nenhum paciente com o polimorfismo 129V com 4 octapeptídeos repetidos (129VDel), partimos para a produção deste perfil pela técnica de PCR recombinante. Para tanto, desenhamos um iniciador interno que correspondesse ao códon para o aminoácido valina na posição 129 do *PRNP*. Desenhamos também um outro par de iniciadores externos que hibridam dos nucleotídeos 67 a 87 (FwPrP^C) e 741 a 762 (RvPrP^C) e contêm sítios das enzimas de restrição *EcoRI* (extremidade 5' do iniciador FwPrP^C) e *BamHI* (extremidade 3' do iniciador RvPrP^C), para que a sequência amplificada correspondente aos codons 23 a 254 de *PRNP*, depois de digerida com as respectivas enzimas de restrição, tivesse extremidades coesivas com as do vetor pEGFP (**Tabela 2**).

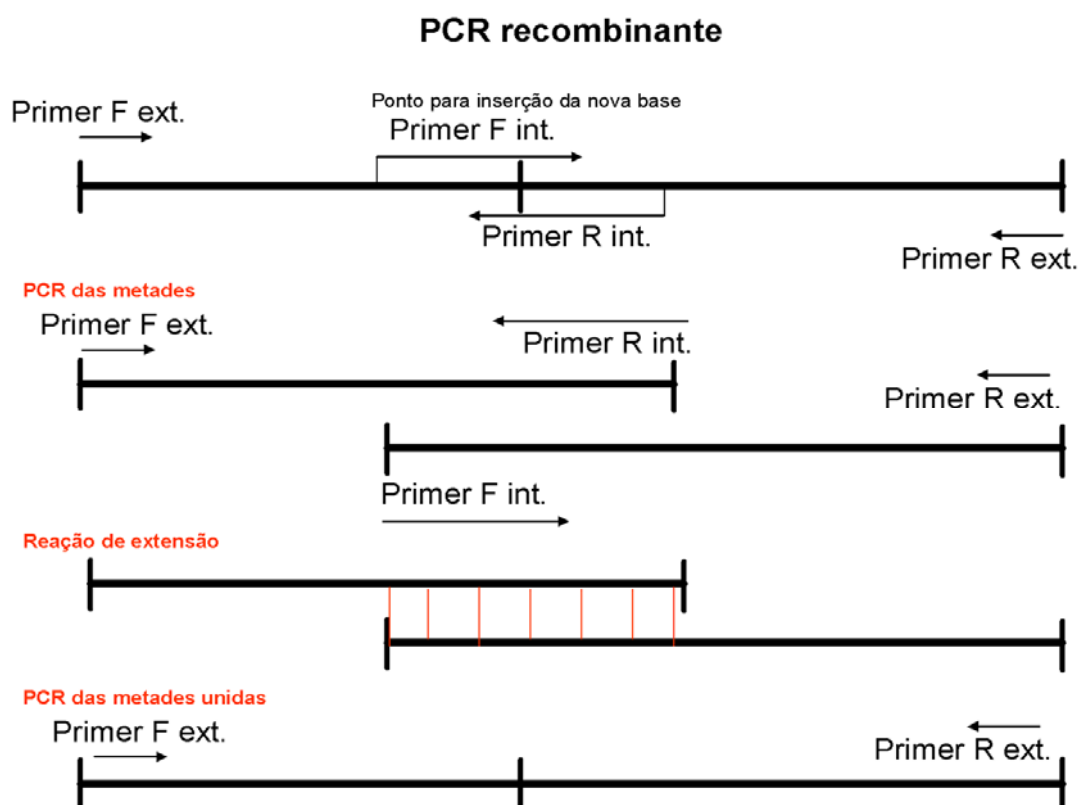
Esses iniciadores foram desenhados a partir da sequência AY008282, depositada no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e sintetizados pela Invitrogen do Brasil (São Paulo, Brasil)

Tabela 2 - Iniciadores sintetizados para a subclonagem do *PRNP*.

	<i>Forward</i>	<i>Reverso</i>
129V	5'ggcggctac gtg ctgggaagtgcc 3'	5'acttcccagcacgtagccgccaag 3'
RvPrPc	NA	5'atcttctgatagtgggatga 3'
FwPrPc	5'aagaagcgccccgaagcctgga 3'	NA

NA: não se aplica

Partindo de DNAs clonados com quatro octapeptídeos repetidos (129Mdel), procedemos à amplificação através de uma reação de PCR recombinante (**Figura 4**), utilizando o kit da *Taq DNA Polimerase* (Promega). No entanto, precisamos fazer essa PCR recombinante em duas partes: cada uma com um iniciador externo que contém um sítio de enzima de restrição. Sendo assim, uma das reações de PCR foi feita com o iniciador *forward* com o sítio da enzima de restrição *EcoRI* (FwPrPc) e o iniciador reverso interno modificado codificando para o aminoácido valina no códon 129 (Rv129V). A outra reação de PCR foi feita com o iniciador reverso com o sítio da enzima de restrição *BamHI* (RvPrPc) e o iniciador *forward* interno modificado codificando para o aminoácido valina no códon 129 (Fw129V). Dessa forma, temos duas “metades” de DNA que precisarão ser posteriormente ligadas e extendidas, já que os iniciadores internos com as modificações sítio específicas se sobrepõem em 7 códons, o que faz com que as fitas por eles sintetizadas sejam coesivas (**Figura 4**).



Legenda: Amplificação da ORF de PrP^c usada como molde, o produto amplificado e a ligação das metades para se obter uma nova ORF com a modificação 129VDel desejada.

Figura 4 - Esquema das etapas de construção da variante alélica 129VDel utilizando a técnica de PCR Recombinante.

Para que as duas “metades” fossem conectadas, foi feita uma reação de extensão do produto de PCR das duas partes, onde 2µL de cada um dos produtos de PCR foi adicionado a 4mM Tris HCl pH 8.3, 20mM KCl, 1.5mM MgCl₂ e 20µM dNTPs e foram aquecidos à temperatura de 95°C por 5 minutos (denaturação), 60°C por 1 minuto (hibridização), 68°C por 10 minutos (renaturação) para que os fragmentos fossem extendidos. Posteriormente foram adicionados 0,5µM dos iniciadores RvPrPc e FwPrPc e a reação foi submetida a nova ciclagem térmica de 95°C por 10 minutos;

35 ciclos de 95°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto e 68°C por 1 minuto, com extensão final de 68°C por 5 minutos. Em cada uma destas etapas os produtos de PCR eram purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) e em seguida quantificados por eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificação da qualidade da amplificação.

b) Digestão do Vetor e dos Insertos com Enzimas de Restrição

Para estudar as funções de PrP^C, construímos uma proteína recombinante EGFP-PrP^C. EGFP (*Green Fluorescent Protein*) é uma proteína de 238 aminoácidos clonada a partir de água-viva *Aequorea victoria*, sendo capaz de emitir fluorescência por si só quando excitada sob determinados comprimentos de onda sem necessidade de cofatores especiais ou um substrato, o que permite seu uso como um fluoróforo funcional, além de sua expressão ser inócua para as células.

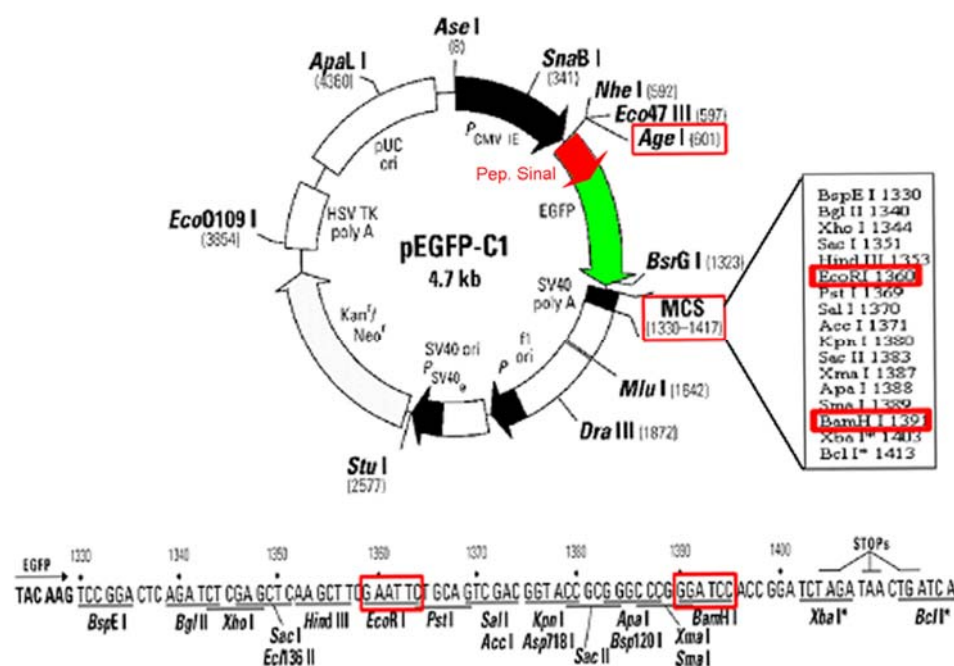
Os produtos da PCR recombinante (que gerou a variante alélica 129VDel) ou de PCR obtidos diretamente do DNA de pacientes com as variantes alélicas 129Mdel, 129M e 129V foram purificados e digeridos a 37°C durante a noite com 10U da enzima de restrição *EcoRI* e 10 unidades da enzima de restrição *BamHI* (**Figura 4**). O vetor utilizado neste trabalho, o plasmídeo pEGFP-C1 (Clontech), já continha a sequência do peptídeo sinal de PrP^C de camundongo (1-22) no sítio *Agel* também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição *BamHI* (Biolabs) e *EcoRI* (Gibco) durante a noite a 37°C.

Os produtos dessas digestões foram purificados com o *Kit Wizard[®] PCR Clean-Up System* utilizando o protocolo do fabricante. Para evitar que houvesse reanelamento do plasmídeo vazio, este foi defosforilado com 10 unidades da enzima CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Invitrogen) durante 30 minutos a 37°C. A reação foi inativada a 72°C por 10 minutos e novamente purificada. O fragmento digerido e purificado foi então inserido no vetor através de reação de ligação.

c) Reação de ligação

Duzentos nanogramas dos produtos de PCR para as variantes alélicas foram inseridos no vetor pEEGFP-C1 (40ng) através da reação de ligação utilizando 400 unidades (U) da enzima T4 DNA Ligase (Biolabs) durante a noite a 4°C.

Após essa reação, o vetor agora apresentava a sequência do peptídeo sinal seguida da sequência de EGFP e PrP^C. Com isso, evitamos que após as modificações pós-traducionais, como por exemplo, a clivagem do peptídeo sinal de endereçamento ao retículo na extremidade amino-terminal ou a adição da âncora de GPI na extremidade carboxi-terminal fizesse com que EGFP fosse clivado de PrP^C.



Legenda: Em destaque estão os sítios de restrição utilizados para abrir o sítio múltiplo de clonagem (MCS) para inserção da sequência do PRNP (*EcoRI* e *BamHI*) e o sítio de *AgeI*, onde já estava inserido a sequência do peptídeo sinal de PrP^c.

Figura 5 - Plasmídeo pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech)

d) Transformação dos Produtos de Ligação

Cinquenta nanogramas do produto de ligação foi então incubado com uma bactéria *E.coli* termocompetente (DH5α) por 30 minutos no gelo, seguido de um choque térmico por 2 minutos a 42°C e por 3 minutos no gelo novamente. Foi acrescentado 1mL de meio LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl; pH 7,4) e incubado a 37°C por 1 hora. Os tubos foram então centrifugados por 5 minutos a 5000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As bactérias foram ressuspensas em 100μL meio LB e plaqueadas em placas de Petri contendo LB agar (1,5% de ágar), contendo

ampicilina (50µg/ml). As bactérias permaneceram durante a noite a 37°C na estufa para que pudessem crescer.

No dia seguinte, algumas colônias foram selecionadas e amplificadas por PCR para verificação da qualidade do DNA presente em cada uma para que fosse verificado se houve amplificação do gene de PrP^C.

e) Minipreparação

Dez microlitros do meio LB contendo a colônia selecionada e analisada, foram inoculados em 5mL de meio LB acrescido de 5µL do antibiótico kanamicina (50µg/mL). Esse foi incubado sob agitação de 200 rpm a 37°C durante a noite.

Após esse período, o DNA plasmidial foi purificado com o kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, para verificação da liberação do inserto e os clones que apresentaram o inserto foram então sequenciados.

f) Sequenciamento

Após ter o DNA amplificado (produto de PCR) foi utilizado o kit *DYEnamic ET Terminator®* (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, USA) para a reação de sequenciamento, as reações foram feitas segundo as especificações do fabricante, em um volume final de 10µL, contendo 0,2pmoles de DNA genômico e 0,5pmoles de iniciador, adicionando à mistura um reagente contendo dNTPs fluorescentes. A amplificação foi feita

no termociclador *DNA Thermal Cycler PTC-100* (MJ Research, Inc, USA), utilizando-se um programa com denaturação inicial de 1 minuto a 94°C e 1 minuto e 15 segundos a 60°C e 20 segundos a 94°C por 25 ciclos, utilizando os mesmos iniciadores externos utilizados na construção dos insertos.

Após a ciclagem térmica, adicionamos 1µL de acetato de sódio e 40µL de etanol a 95% e incubamos no escuro e no gelo por 15 minutos. Centrifugamos por 10 minutos a 14000 rpm e aspiramos o sobrenadante no vácuo. Adicionamos 250µL de etanol a 70%, centrifugamos por 10 minutos a 14000 rpm e aspiramos novamente no vácuo. Deixamos secar no escuro e na estufa à 56°C, durante cerca de 15 minutos. As amostras foram então aplicadas em gel e a leitura da seqüência foi feita em seqüenciador ABI Prism-377™ (Perkin- Elmer, USA).

g) Maxipreparação

Quinhentos nanogramas de DNA obtido na minipreparação e analisado por sequenciamento direto foram transformados com a bactéria competente como descrito anteriormente e então crescidos em 250mL de meio de cultura LB com antibiótico, durante a noite, e sob agitação constante de 200rpm a 37°C. Os meios foram então centrifugados e o pellet processado como manda o fabricante do *Kit Qiagen Tips 500* (Qiagen). Ao fim do procedimento, dosamos a quantidade de DNA obtido e utilizamos esse DNA para os experimentos de transfecção celular.

PARTE II – CULTURA DE CÉLULAS

3.II.1 Cultura primária de cardiomiócitos de camundongos

O embriões (E18) foram colocados em solução de Ringer (NaCl 154mM; KCl 3,35mM; CaCl_2 1,7mM; pH 7,0) e mantidos no gelo, sendo a seguir decapitados com o auxílio de uma tesoura limpa e os corações expostos após um pequeno corte ter sido feito no tórax. Os corações foram então colocados em nova solução de Ringer e mantidos no gelo.

Com o auxílio de uma lupa, os ventrículos foram retirados e colocados em outra solução de Ringer e novamente mantidos no gelo. Os ventrículos foram a seguir cortados e colocados em um Erlenmeyer contendo solução de Ringer e uma pequena barra magnética. Sob agitação constante os ventrículos foram lavados duas vezes em solução de Ringer. A seguir, foram novamente lavados com PBS 1X, durante 5 minutos sob agitação e a 37°C, para que fosse retirado o excesso de cálcio que estava presente na solução de Ringer.

O excesso de PBS foi retirado e então procedeu-se à dissociação enzimática (colagenase tipo II 0,8%; tripsina 0,1%, PBS 1X pH 7,4) sob agitação durante 5 minutos a 37°C. A primeira dissociação foi descartada e, a partir da segunda dissociação, procedeu-se da seguinte forma durante 6 passagens: dissociação por 5 minutos sob agitação a 37°C, retirada da solução de dissociação que é guardada em um tubo contendo cerca de 2mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com 10% de SBF e 1% de L-glutamina em gelo. Cada vez que a solução de dissociação enzimática

era retirada, uma pequena alíquota era levada ao microscópio ótico para que fosse verificada a qualidade da dissociação, para que se tivesse um controle da quantidade das células e se elas não estavam sofrendo com o tratamento enzimático.

Após as 6 dissociações, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e estas foram ressuspensas em meio DMEM completo. Procedeu-se uma nova centrifugação para que houvesse completa remoção das enzimas utilizadas. Foram plaqueadas $1,5 \times 10^5$ células em placas de 24 poços previamente tratadas com gelatina (0,01% em solução de Ringer) por 30 minutos na estufa e com uma lamínula de vidro, para que os cardiomiócitos pudessem aderir.

Após 24 horas de cultura, as placas foram lavadas com meio DMEM completo para retirar os debris celulares e as células que não aderiram. Protocolo adaptado de Souza et al. 2004.

3.II.2 Marcação de culturas primárias com indicador fluorescente de Ca^{2+} Fluo-3 AM

Culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos tipo selvagem para PrP^C foram incubadas com 10 μM do indicador fluorescente de Ca^{2+} - Fluo-3 AM – por 30 min a 37° C em meio neurobasal contendo 2mM de CaCl_2 . Depois de decorrido o tempo de marcação as células foram lavadas três vezes com DMEM contendo 2mM de CaCl_2 . Após as lavagens as células foram mantidas em Tampão Krebs (124mM NaCl, 4mM KCl, 25mM Hepes, 1.2mM MgSO_4 , 10mM glucose contendo ou não 2mM de CaCl_2).

As variações de intensidade de fluorescência das células foram analisadas por microscopia confocal Bio-Rad Radiance 2100 acoplado a um microscópio Nikon (TE200-U) com objetiva de imersão em água (40X, 1,2 NA) com comprimentos de onda de EX-488nm (laser de argônio) com filtro de EM-522-535nm. Com as imagens adquiridas as células foram analisadas utilizando-se o programa WCIF ImageJ (National Institute of Health- NIH) onde foi feita uma razão entre a fluorescência final e a fluorescência inicial ($F1/F0$).

3.II.3 Transfecção das linhagens celulares H9c2 (provenientes de cardiomiócitos de rato) e HEK293

A linhagem celular H9c2 é proveniente de cardiomiócitos de rato, sendo um subclone da linhagem celular clonal original derivada de tecido cardíaco embrionário de ratos BD1X. A linhagem celular HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) é uma linhagem celular originalmente derivada de rins humanos embrionários crescidos em cultura de tecidos. Este tipo de linhagem celular foi escolhido por ser de fácil cultivo e transfecção.

Cerca de 5×10^3 células de cada uma das linhagens foram plaqueadas em placas de Petri de 35mm de diâmetro em meio DMEM com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de L-glutamina para a linhagem H9c2 e em meio MEM com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de L-glutamina para a linhagem HEK293. Vinte e quatro horas depois foi iniciado o processo de transfecção: 3µg dos DNAs em questão (construtos 129V e 129M com ou sem a deleção de octapeptídeos, e fusionados à proteína fluorescente verde

- EGFP) foram incubados com DMEM (ou MEM) sem SBF, à temperatura ambiente, por 5 minutos. Em um outro tubo, 5µg de lipofectamina (Invitrogen) foram incubados em meio de cultura DMEM (ou MEM) sem SBF por 5 minutos. Após esse período, o conteúdo do tubo contendo lipofectamina foi misturado ao conteúdo do tubo contendo o DNA e então incubado por 20 minutos à temperatura ambiente.

Enquanto isso, o meio de cultura das células plaqueadas 24 horas antes foi retirado, as células foram lavadas com meio DMEM (ou MEM) sem SBF e então foram adicionados 1,5mL de meio DMEM (ou MEM) sem SBF e o conteúdo de cada tubo contendo o DNA e a lipofectamina foi cuidadosamente aplicado sobre as células. Após 4 horas na estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂, o meio foi retirado e as células receberam um novo meio de cultura DMEM (ou MEM) com 10% de SBF e 1% de L-glutamina.

A visualização da eficiência da transfecção foi realizada após 48 horas de cultivo em estufa a 37°C com atmosfera com 5% de CO₂.

3.II.4 “Western blot”

Quarenta microgramas de proteína total provenientes de extratos celulares foram dosadas através de ensaio colorimétrico pelo reagente de Bradford, fervidos a 95°C por 5 minutos, aplicados em um gel de poliacrilamida 10% e submetido a uma corrida eletroforética a 40mA para completa separação das proteínas. As proteínas então foram imobilizadas em uma membrana de nitrocelulose (0,45µm - Schleicher e Shuell,

Alemanha) em um sistema de transferência “semi-dry”. Após a transferência, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau para verificação da qualidade da transferência e certificação da presença das proteínas na membrana.

A membrana foi lavada para retirada do excesso do corante e então incubada com solução de bloqueio de ligações inespecíficas (leite desnatado liofilizado 0.5% em solução de Tris-Buffer-saline-Tween (TBST) 0,05%) por uma hora a temperatura ambiente e sob agitação constante. A solução de bloqueio foi retirada e adicionado um dos anticorpos primários (anti-PrP^C, anti-EGFP, anti-caspase 9, anti-caspase 3 ativada) que foi incubado com a membrana durante a noite a 4°C sob agitação constante. A membrana foi então lavada por 3 vezes com TBST 0.05% durante 5 minutos e incubada por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação com o anticorpo secundário de camundongo marcado com peroxidase. Esta foi novamente lavada por 3 vezes com TBST 0,05% por 5 minutos cada lavagem e então revelada utilizando o kit *ECL Western Blotting Analysis System* (Amersham-Pharmacia) seguida de exposição de um filme de raio X à membrana.

3.II.5 Tratamento celular com Doxorrubicina

Foram feitos tratamentos nas linhagens celulares H9c2 e HEK293 com as seguintes concentrações de doxorrubicina por um período de 24 horas: 1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 25µM, 50µM e 75µM. A avaliação da morte celular induzida pela Doxorrubicina, foi feita pela coloração nuclear por iodeto de propídeo e posterior contagem dos núcleos picnóticos

As células foram lavadas em PBS 1X, fixadas por 20 minutos em paraformaldeído 4%, novamente lavadas com PBS 1X, coradas com iodeto de propídeo por 20 minutos, lavadas com PBS 1X e montadas em uma lâmina de vidro para posterior avaliação em um microscópio de fluorescência invertido.

3.II.6 Citometria de Fluxo

As culturas celulares foram removidas da placa de cultura por tratamento enzimático com tripsina, centrifugadas e incubadas por 30 minutos em meio completo a 37°C para a recuperação da membrana. Aliquotas de 10^6 células de H9c2 foram incubadas com anticorpo monoclonal 3F4 (10ng/ μ l) (Abcam – reconhece PrP^C humano mas não reconhece PrP^C de camundongo), ou anticorpo policlonal M233 (1/100) (produzido em camundongos deletados para o gene de PrP^C imunizados com proteína PrP^C murina recombinante e que reconhece PrP^C murino e humano) em PBS/BSA 0,5% Azida Sódica 0,05% por 1h à 4°C. A seguir, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário (anti-camundongo marcado com *phycoeritrina*, PE) em mesmo tampão, por 1h à 4°C. A leitura da fluorescência foi realizada em aparelho BD FACScan ou BD FACSCalibur (Becton Dickinson), nos programas *Cell Lyses* ou *Cell Quest Pro*, respectivamente. Para a análise de fluorescência de EGFP e de PE utilizamos laser de argônio (emissão 488nm) e detectores de 530nm (EGFP) e 585nm (PE).

As populações de H9c2 expressando as diversas construções foram submetidas à clonagem celular por diluição limitante. Esses clones foram novamente avaliados por citometria de fluxo, onde verificamos a ausência de expressão dos construtos nesta linhagem celular.

A constatação da expressão de PrP^C em células H9c2 foi feita, a princípio, pela presença de fluorescência de EGFP através de citometria de fluxo. Utilizamos a média geométrica da intensidade de fluorescência para avaliar a quantidade de EGFP expresso em cada clone, tendo as células não transfectadas como padrão de comparação.

3.II.7 “Cell sorting”

Selecionamos as populações de clones de células HEK293 fusionadas com os construtos EGFP-PrP^C positivas através do método de *cell sorting*, disponível no aparelho BD FACSCalibur.

Neste método, as células HEK293 transfectadas com EGFP-PrP^C e selecionadas com G₄₁₈ por no mínimo 14 dias foram incubadas com iodeto de propídeo 1µg/ml, um intercalante de DNA não permeável à membrana plasmática, ou seja, internalizado somente em células não viáveis.

Selecionamos as células através de seu tamanho e sua granulosidade, para que pudéssemos excluir fragmentos celulares e células agregadas. Para selecionarmos as células viáveis, utilizamos o iodeto de propídeo (IP) como marcador de células mortas, e selecionamos então as células negativas para este marcador e positivas para a fluorescência de EGFP.

Este processo foi feito por duas vezes, para nos assegurarmos de que nossos clones celulares apresentassem a menor quantidade possível de células “contaminantes” não fusionadas à proteína EGFP.

PARTE III – MODELO ANIMAL

3.III.1 Animais

Os animais avaliados neste estudo são camundongos “nocaute” para o gene codificador da proteína PrP^C (Zrch ou *ZPrnp*^{0/0}) (BÜELER et al. 1992), que têm um *background* genético misto C57Bl6/J x 129 Sv. Nestes animais, 552 pares de base (bp) do gene de PrP^C foram substituídos por um cassete do vetor de resistência à neomicina de 1.1 kb (BÜELER et al. 1992), o que fez com que não houvesse mais expressão da PrP^C. Outra cepa de camundongos que foi usada é de animais que têm expressão aumentada da proteína PrP^C (Tg20) (SHEMERLING et al. 1998). Esta foi construída a partir da inserção de cerca de 20 cópias do *Prnp* em blastocistos obtidos dos animais nocautes (*ZPrnp*^{0/0}) produzidos por BÜELER et al. (1992). Estes animais expressam cerca de 6 vezes mais PrP^C que aqueles do tipo selvagem (FISCHER et al. 1996). Como controle destes animais usamos camundongos híbridos construídos a partir do cruzamento de um animal 129 Sv com um animal C57BL6/J (*ZPrnp*^{+/+}) e mantidos em acasalamento contínuo de sua F1 (**Figura 6**).

Utilizamos também animais construídos por MANSON et al. (1994) Edbg *Prnp*^{-/-} (ou *EPrnp*), Edbg *Prnp*^{+/-} e Edbg *Prnp*^{+/+}, onde o cassete de

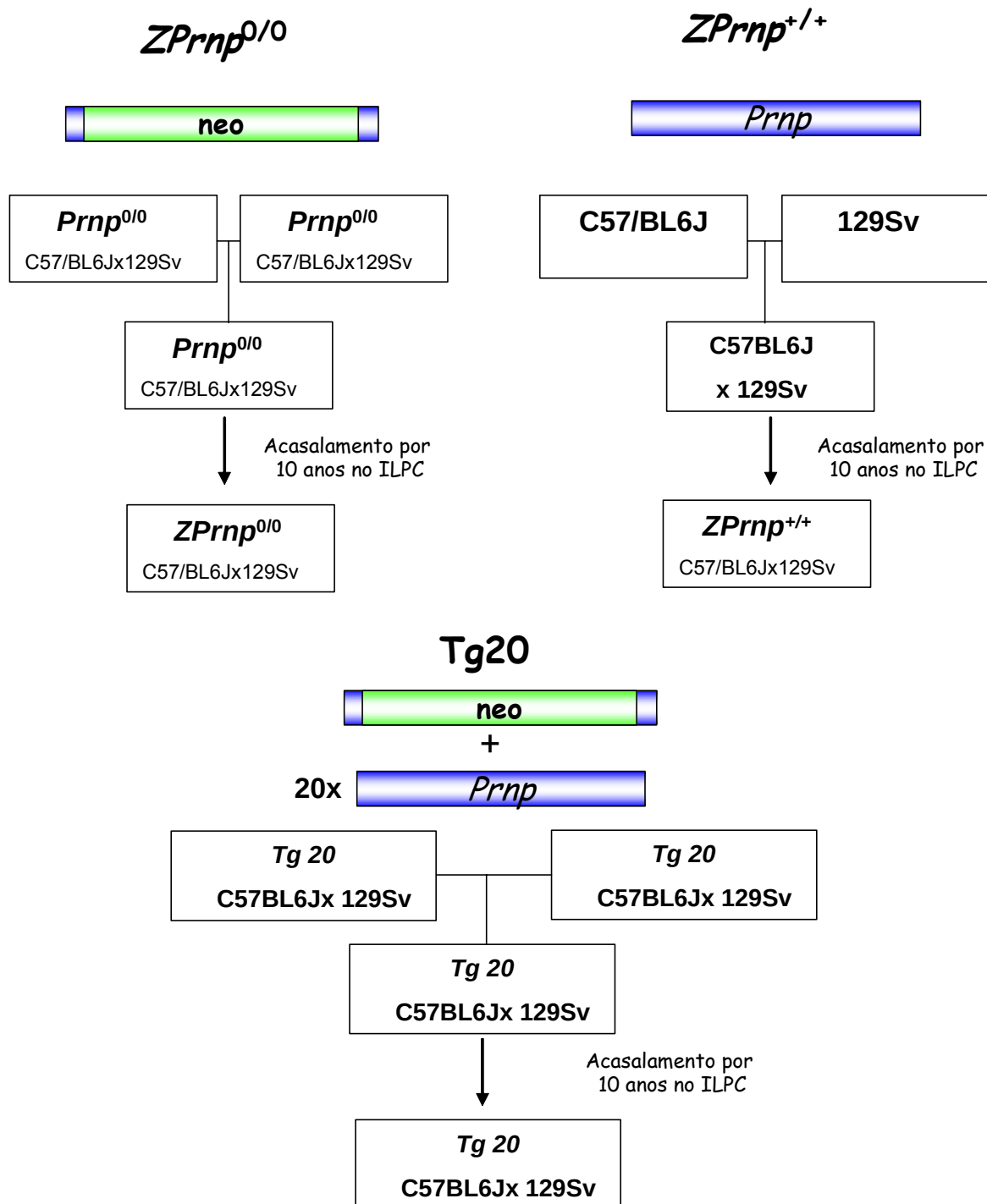
neomicina foi inserido no sítio de restrição da enzima Kpn-1 presente na ORF de *Prnp* (**Figura 7A**). Estes animais foram re-acasalados com animais de background C57/BL10 por 4 gerações no Laboratório do Dr Bruce Chesebro (Rocky Mountains NIH).

Para que o *background* genético desta linhagem fosse mantido, foram feitos acasalamentos contínuos (*backcross*) entre animais heterozigotos (Edbg *Prnp*^{+/-}) com animais C57/BL10 (**Figura 7B**). Os animais heterozigotos provenientes deste acasalamento foram então acasalados entre si e sua prole continha cerca de 50% de animais heterozigotos (*EPrnp*^{+/-}), 25% de animais homozigotos depletados de *Prnp* (*EPrnp*^{-/-}) e 25% de animais controles não depletados (*EPrnp*^{+/+}). Esses animais além de possuírem o mesmo background genético, seu controle tipo selvagem advém do mesmo acasalamento (**Figura 7B**). Todos os animais gerados neste acasalamento são genotipados e seus produtos de reação de PCR são usados para identificação dos genótipos (**Figura 7C**).

Para a genotipagem dos animais Edbg, DNA extraído da cauda foi amplificado em duas reações multiplex. A primeira delas para amplificar o gene de neomicina usando 0,25µM dos iniciadores 5' – TTG AGC CTG GCG AAC AGT TC – 3' e 5' – GAT GGA TTG CAC GCA GGT TC – 3' e 0,5 µM dos iniciadores 5' – AAT AGA GGC ACT CCC TTC AC – 3' e 5' – GGT AAG CCC TTG ACC TAA AA – 3' para amplificar o gene de retinoblastoma, usado como controle interno da reação. As condições de ciclagem foram 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min e 72°C por 45 seg, seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 min.

A segunda reação para amplificar o gene de *Prnp* usando 0,25µM dos iniciadores 5' – AAC CGT TAC CCA CCT CAG GGT -3' e 5' – GCG CTC CAT CAT CTT CAC A – 3' e 0,25µM dos iniciadores para amplificar o gene de retinoblastoma como descrito acima. As condições de ciclagem foram 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 45 seg seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 min. As amostras foram amplificadas por PCR, utilizando-se o Kit de amplificação Taq DNA polimerase (Promega, WI, USA). As reações foram feitas em um volume de 10µL contendo 25µg de DNA genômico, 20mM Tris HCl pH 8,0; 50mM KCl; 25mM MgCl₂; 500µM dNTP (Life Technologies, Gibco BRL); 0,5µM de iniciadores (*Forward* e *Reverse*), DMSO 10% e 1 U de Taq DNA polimerase.

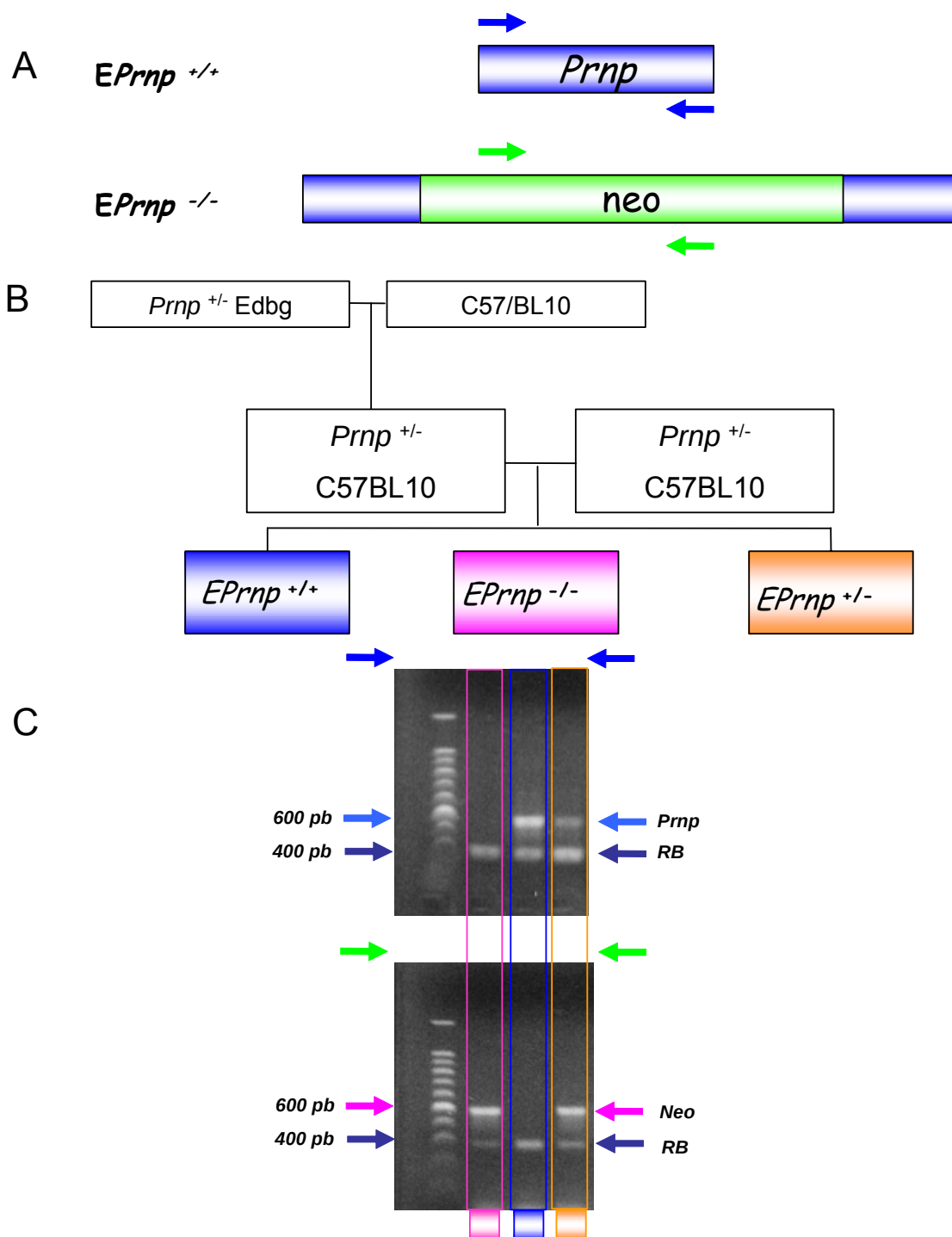
Todos os animais foram mantidos em uma sala limpa, com pressão positiva, temperatura entre 22 e 24°C, umidade do ar entre 40 e 60%; gaiolas limpas com hipoclorito de sódio, lavadas e esterilizadas por autoclavagem. A maravalha autoclavada; ração esterilizada por radiação e autoclavada quando de seu uso; água MiliQ acidificada com ácido clorídrico 37% (0,1%); e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. O guia “Principles of laboratory animals care” (NIH # 85-23, revisado em 1996) foi seguido em todos os experimentos feitos neste trabalho, que foi submetido ao Comitê de ética Animal do Hospital AC Camargo.



Legenda: Esquema para melhor visualização dos cruzamentos para a obtenção das linhagens de camundongos $ZPrnp^{0/0}$, $ZPrnp^{+/-}$ e Tg20. Estes animais têm sido mantidos neste esquema de acasalamento nos últimos 10 anos.

Fonte: LANDEMBERGER (2006)

Figura 6 - Esquema de acasalamentos dos animais $ZPrnp^{0/0}$, $ZPrnp^{+/-}$ e Tg20 ().



Legenda: A) Foi inserido um cassete de neomicina no sítio de restrição da enzima Kpn-1 presente na ORF do gene de *Prnp*; B) Obtenção dos animais $EPrnp^{-/-}$, $EPrnp^{+/+}$ e $EPrnp^{+/-}$ provenientes do acasalamento de dois heterozigotos para *Prnp*, e C) gel da reação de PCR realizada para a genotipagem destes animais.

Fonte: LANDEMBERGER (2006)

Figura 7 - Esquema de acasalamentos dos animais $EPrnp^{-/-}$, $EPrnp^{+/+}$ e $EPrnp^{+/-}$.

3.III.2 Animais tratados com Doxorubicina

Camundongos de 3 a 4 meses de idade receberam tratamento intraperitoneal com diferentes doses do quimioterápico Adriamicina® (Doxorrubicina). Neste estudo, utilizamos as doses de 50, 30, 20, 15, 10 e 7,5 mg/kg de doxorubicina em camundongos *ZPrnp*^{+/+}, *ZPrnp*^{0/0} e Tg20, *EPrnp*^{-/-}, *EPrnp*^{+/-} e *EPrnp*^{+/+}). Os animais utilizados neste estudo foram pesados separadamente e a dose de Doxorubicina a ser administrada foi calculada individualmente.

A doxorubicina foi diluída em água MiliQ estéril deionizada, em fluxo laminar, na concentração de 2mg/mL (3mM) e utilizada no mesmo dia em que foi reconstituída, pois sua estabilidade é de, no máximo, 48 horas protegida da luz e refrigerada a 4°C.

Os tratamentos dos animais com a droga foram feitos no biotério do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. A droga foi aplicada por via intraperitoneal em doses diferentes e os animais permaneceram sob constante observação ao longo de 6 semanas, onde a anotação de morte foi feita a cada 24 horas. Aqueles que, ao fim das 6 semanas, permaneceram vivos foram submetidos a ortotanasia por deslocamento cervical ou por inalação de CO₂. Seus corações foram fixados em formalina tamponada e emblocados em parafina.

Todos os procedimentos atenderam às normas do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antonio Prudente (número 015/07).

3.III.3 Análise Estatística

O tempo de sobrevida dos camundongos foi calculado a partir do dia de injeção da doxorubicina até a data da morte ou da eutanásia (considerando-se a morte como evento). As análises estatísticas de sobrevida foram feitas utilizando o software SPSS 13.0. As sobrevidas globais dos grupos de camundongos estudados foram calculadas através do teste não-paramétrico de Kaplan-Meier e a estimativa da influência da expressão de PrP^C nas mesmas foi avaliada através do teste de log-rank. Para todas as análises foi considerado intervalo de confiança de 95%.

3.III.4 Avaliação das lesões cardíacas em cortes de tecido

Cortes parafinados de tecido cardíaco de 4µm foram desparafinizados e marcados pela técnica de detecção de fragmentação de DNA seguindo o protocolo do fabricante do Kit CardioTACS – *In Situ* Apoptosis Detection Kit (R&D Systems, USA). Resumidamente, os cortes foram desparafinizados com seguidas lavagens em xilol e permeabilizados com Proteinase K. A atividade da peroxidase endógena foi extinta com peróxido de hidrogênio; em seguida a enzima deoxinucleotidil transferase (TdT) que adiciona nucleotídeos biotinilados a porção 3' do DNA fragmentado, o que gera um precipitado azul na presença do substrato TACS Blue Label.

4 RESULTADOS

PARTE I – PACIENTES

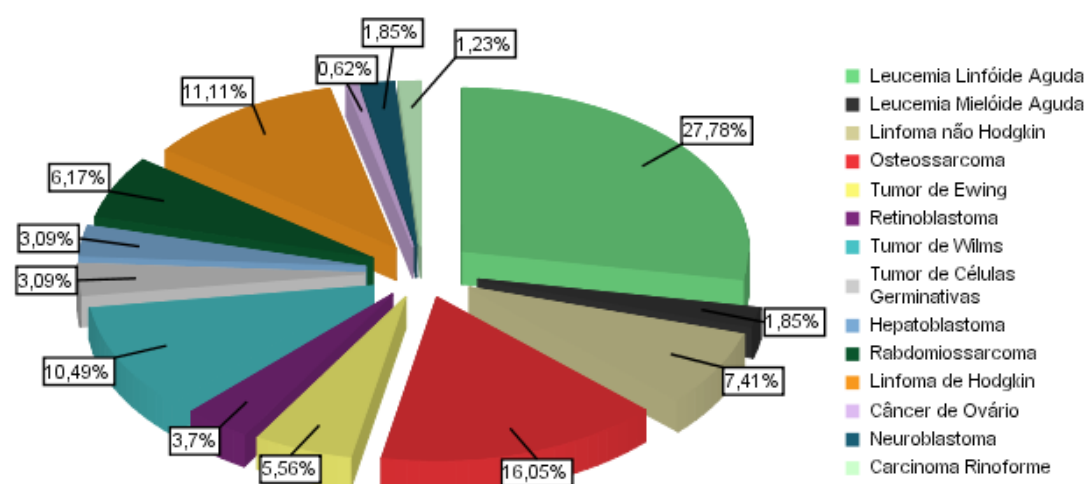
4.1.1 Estudo de polimorfismos em pacientes tratados com Doxorubicina

a) Descrição dos pacientes

Os 162 pacientes deste estudo abrangem um grupo de 51,9% do sexo masculino e 48,1% do sexo feminino, onde 67,9% são brancos, 24,7% são pardos, 4,3% negros e 3,1% com cor de pele indefinida.

A idade ao diagnóstico variou entre 1 mês e 17 anos, sendo o tempo de tratamento entre 2 meses e 5 anos.

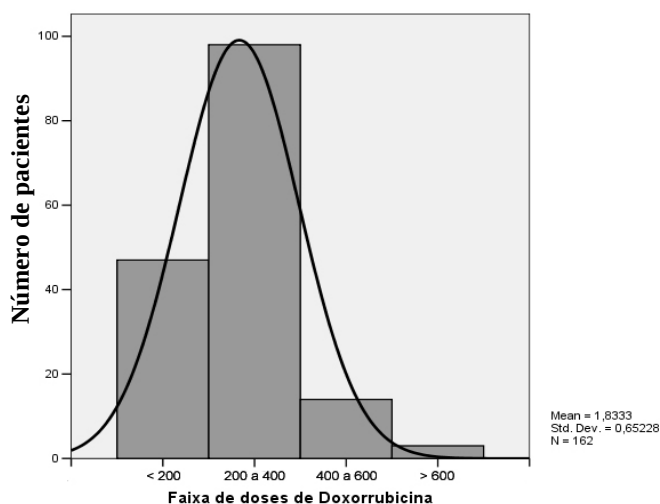
Os pacientes incluídos neste estudo apresentavam diferentes tipos de tumores, dos quais as leucemias e linfomas eram predominantes (48%), seguidas pelo osteossarcoma (16%) e pelo tumor de Wilms. (**Figura 8**).



Legenda: Os tipos de tumores estão representados por fatias de diferentes cores e estão demonstrados em valores percentuais, onde a Leucemia Linfóide Aguda representa a maior fatia do gráfico, com 27,78% do total de tumores dos pacientes do estudo, seguido do Osteossarcoma, com 16,05% e do Linfoma de Hodgkin, com 11,11%.

Figura 8– Distribuição dos tipos de tumores apresentados pelos pacientes do estudo.

Quando analisamos as doses de antracíclicos recebidas por estes pacientes, verificamos que 159 deles receberam valores dentro dos limites aceitos mundialmente de dose cumulativa de antracíclicos que é de 600mg/m². (**Figura 9**). Entretanto, 3 pacientes receberam uma dose cumulativa maior que 600mg/m².



Legenda: Histograma da faixa de doses de antracíclicos dos pacientes do estudo, demonstrando que a maioria deles recebeu uma dose máxima de cerca de 600mg/m², dentro dos padrões estabelecidos mundialmente.

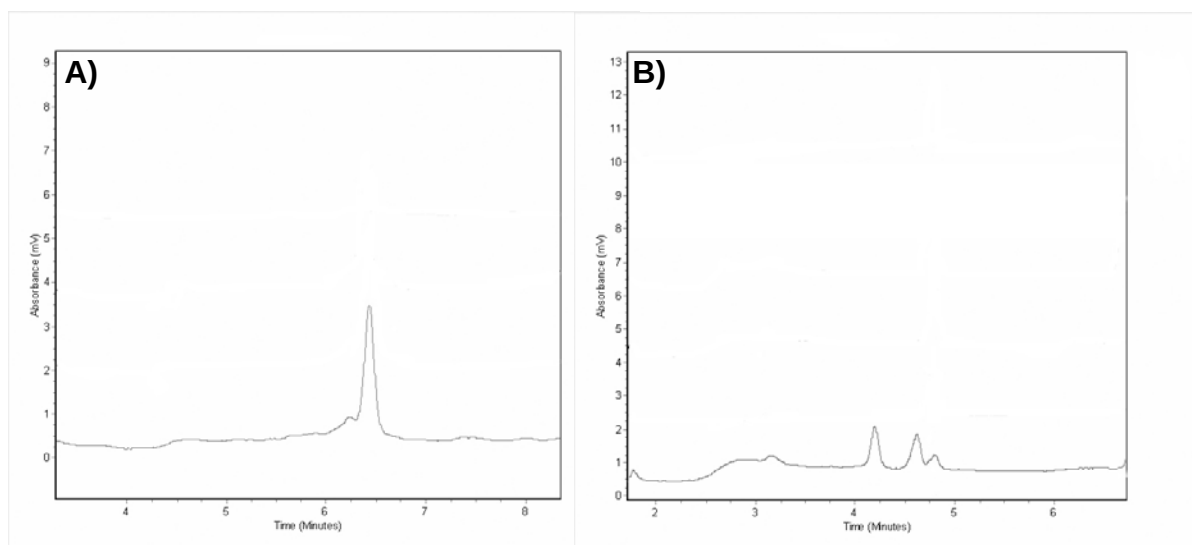
Figura 9 - Histograma de faixa de dose cumulativa de antracíclico dos 162 pacientes do estudo.

Os pacientes deste estudo estavam fora de tratamento há pelo menos cinco anos. Os dados mostram que a mediana do tempo fora de tratamento era 186 meses (cerca de 15 anos e meio), com um máximo de 25 anos.

b) Análise do gene *PRNP*

Amostras de DNA amplificadas de sangue de pacientes foram avaliadas através da técnica de DHPLC. A identificação de cada polimorfismo baseia-se no perfil apresentado para cada amostra, e está amplamente descrito em CASTRO et al. 2004.

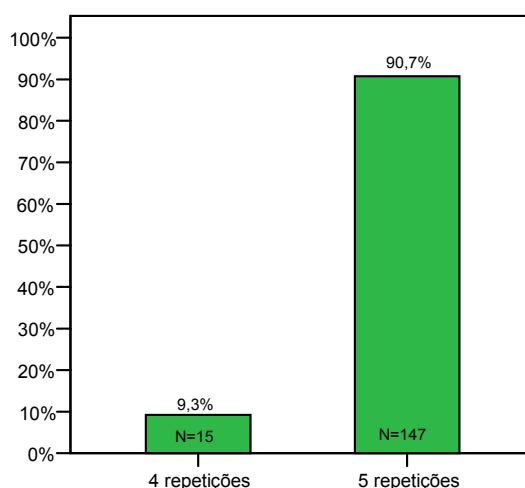
Analizamos um total de 162 amostras que foram submetidas à temperatura de 50°C no cromatógrafo para verificarmos a qualidade do DNA (**Figura 10A**). Nesta temperatura também é possível verificarmos a presença ou ausência de deleções no DNA em estudo, como por exemplo, a deleção de um octapeptídeo repetido (**Figura 10B**).



Legenda: Exemplo de cromatograma obtido por DHPLC em uma análise realizada a 50°C do produto amplificado de *PRNP*, demonstrando que a amplificação foi de boa qualidade. Nesta temperatura já é possível detectar alterações maiores na sequência amplificada: à esquerda vemos um pico único de saída, demonstrando que a amostra é homozigota e possui um material genético de boa qualidade (A), enquanto a amostra à direita (B), possui deleção de um octapeptídeo repetido em heterozigose, verificado por um pico de saída duplo anterior a 5 minutos.

Figura 10 – Perfil cromatográfico de DHPLC para o DNA protótipo de *PRNP* (A) e para a deleção de um octapeptídeo repetido (B).

Deste total de 162 pacientes, 15 indivíduos (9,3%) apresentaram 4 repetições de octapeptídeos e 147 (90,7%) que possuíam 5 octapeptídeos repetidos (**Figura 11B**) (**Gráfico 1**), que está de acordo com a distribuição deste polimorfismo em uma população normal (DOH-URA et al 1989).

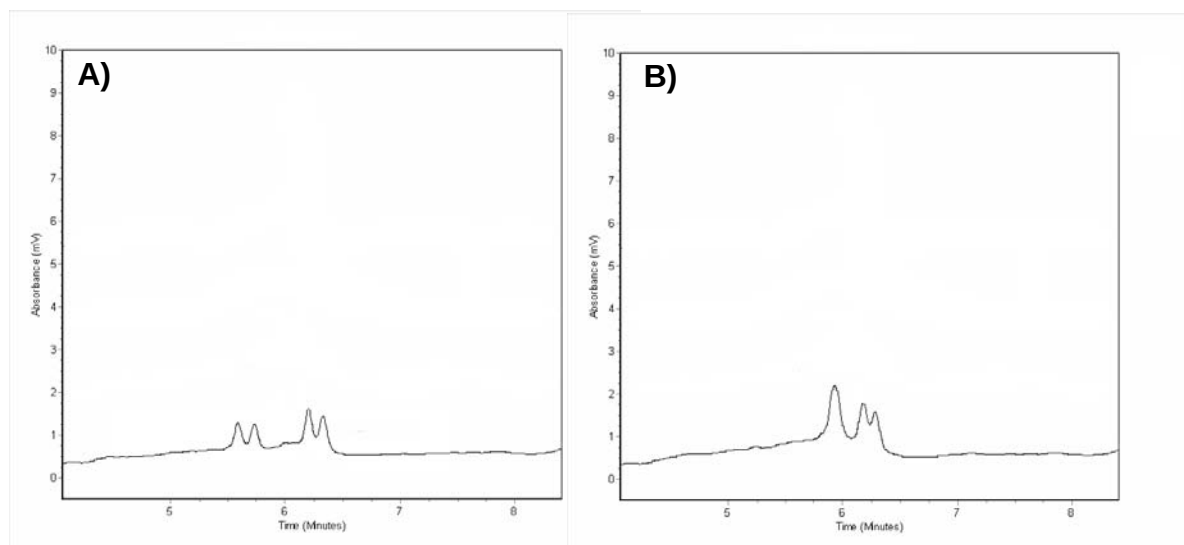


Legenda: Distribuição do polimorfismo na região de octapeptídeos repetidos na população em estudo, onde 9,3% (n=15) dos indivíduos apresentavam 4 repetições de octapeptídeos e 90,7% (n=147) apresentavam 5 repetições.

Figura 11 - Perfil de distribuição do polimorfismo na região de octapeptídeos repetidos encontrados em 162 pacientes.

Nesta mesma amostragem, três pacientes possuíam o polimorfismo silencioso no códon 117 (HSIAO et al. 1989), causado por uma mutação *missense* e caracterizado por DHPLC obtido a 65°C. Esse polimorfismo não acarreta nenhuma patologia para os indivíduos portadores. Na **Figura 12A** podemos observar que a presença deste polimorfismo leva a uma alteração no perfil obtido para o DHPLC. Este polimorfismo pode ser identificado mesmo num paciente heterozigoto para o códon 129 (Figura 12A).

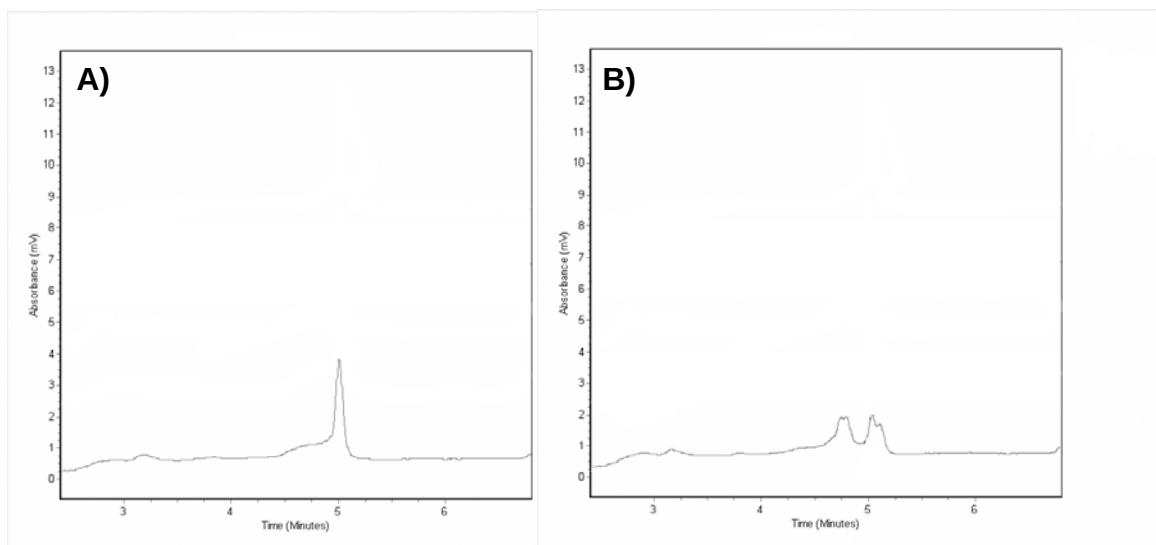
Oitenta e três (51,2%) pacientes apresentavam-se heterozigotos para o códon 129 de *PRNP*, possuindo um aminoácido valina (V) em um alelo e metionina (M) no outro alelo (M129V) (Figura 12B).



Legenda: Exemplo de cromatograma obtido por DHPLC em uma análise realizada a 65°C do produto amplificado de *PRNP*. **A)** Amostra com o polimorfismo silencioso A117A, com pico de saída duplo anterior a 6 minutos, e polimorfismo M129V, pico de saída duplo posterior a 6 minutos; **B)** Amostra heterozigota M129V, demonstrado pelos dois picos distintos: um único e outro duplo.

Figura 12 - Perfil cromatográfico de DHPLC para o *PRNP* com o polimorfismo A117A e/ou M129V.

Já 79 amostras apresentaram um pico de saída único (**Figura 13A**). Sendo assim, essas amostras foram misturadas com um DNA protótipo (códon 129 metionina – M129M), essa mistura foi novamente denaturada a 95°C e os perfis cromatográficos foram analisados por DHPLC a 65°C. Destas amostras, 54 mostraram-se homozigotas para metionina e 25 homozigotas para valina no códon 129 (**Figura 13B**).



Legenda: Exemplo de cromatograma obtido por DHPLC em uma análise realizada a 65°C do produto amplificado de *PRNP*. Em A), amostra com perfil homozigótico e em B), mistura do protótipo M129M ao DNA em estudo, demonstrando a presença do aminoácido Valina em homozigozidade no códon 129 (V129V), representado pelos dois picos de saída no cromatograma.

Figura 13 - Perfil cromatográfico de DHPLC para a homozigose no códon 129 de *PRNP* (A) e após a mistura com DNA protótipo M129M (B).

c) Análise Ecocardiográfica dos Pacientes

Após a identificação dos polimorfismos de *PRNP* nos pacientes do estudo, estes dados foram comparados com os achados ecocardiográficos. A **Tabela 3** mostra um resumo de todos os perfis de polimorfismos encontrados nas amostras estudadas, correlacionados com a presença ou não de alteração na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). A maioria da população estudada (70 pacientes) (43,2%) é composta de indivíduos heterozigotos no códon 129, genótipo M129V e com 5 repetições de octapeptídeos.

Tabela 3 - Distribuição dos polimorfismos e alterações na FEVE nos 162 pacientes do estudo.

Polimorfismo		Fração de Ejeção		Total
		Alterada	Normal	
129	<i>Met/Met</i>	6 (3,7%)	48 (29,6%)	54 (33,3%)
	<i>Met/Val</i>	14 (8,6%)	69 (42,6%)	83 (51,2%)
	<i>Val/val</i>	4 (2,5%)	21 (13%)	25 (15,4%)
Octapeptídeos repetidos	<i>4 repetições</i>	3 (1,9%)	12 (7,4%)	15 (9,3%)
	<i>5 repetições</i>	21 (13,0%)	126 (77,8%)	147 (90,7%)
129/octapeptídeos	<i>M129Mdel</i>	2 (1,2%)	0 (0%)	2 (1,2%)
	<i>M129Vdel</i>	1 (0,6%)	12 (7,4%)	13 (8,0%)
	<i>M129M</i>	4 (2,5%)	48 (29,6%)	52 (32,1%)
	<i>V129V</i>	4 (2,5%)	21 (13%)	25 (15,4%)
	<i>M129V</i>	13 (8%)	57 (35,2%)	70 (43,2%)

Dois indivíduos (1,2%) apresentaram a deleção de octapeptídeos associada ao códon 129 homozigoto para metionina (M129Mdel), sendo que ambos apresentaram fração de ejeção alterada. A homozigose para metionina no códon 129 associada a 5 octapeptídeos repetidos estava presente em 29,6% das amostras. Além disso, 13% dos indivíduos apresentaram o aminoácido valina em homozigotidade no códon 129 e com 5 octapeptídeos repetidos no *PRNP* (V129V). Finalmente, nesta população não há indivíduos homozigotos para o aminoácido valina com 4 repetições de octapeptídeos (V129Vdel).

No que tange às alterações cardíacas presentes nos pacientes que fazem parte desse estudo, foram avaliados 162 pacientes através de

ecodopplercardiografia com mapeamento por fluxo de cores pelo Dr. Júlio Santin. Os exames que apresentaram fração de ejeção de ventrículo esquerdo (FEVE) menor que 55% foram considerados com função cardíaca alterada. Os dados mostrados na **Tabela 3** dividem os 162 pacientes como tendo exames da FEVE alterados ou não.

Como pode ser observado na **Tabela 4** duas variáveis (códon 129 + deleção na região de octapeptídeos) foram agrupadas. A ausência de indivíduos com fração de ejeção normal no grupo M129Mdel impossibilita a análise estatística. Entretanto, o programa mostra uma associação significativa entre a presença do polimorfismo onde há a deleção de uma sequência de octapeptídeos repetidos e a de metionina em homozigose (M129Mdel), com o comprometimento da FEVE ($p=0,021$).

A comparação de qualquer outra variável clínica, tipo de tumor, dose do antracíclico ou tempo fora de tratamento com os polimorfismos em *PRNP* não mostrou nenhuma correlação significativa (dados não mostrados).

Tabela 4 - Comparação entre a presença de polimorfismos no *PRNP* e alterações na FEVE.

			Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo		
			Alterada	Normal	Total
Polimorfismo	M129M del	Casos (% polimorfismo)	2 (100%)	0 (0%)	2
		% Fração de Ejeção	8,3%	,0%	1,2% (p=0,021)*
	Outros Polimorfismos	Casos (% polimorfismo)	22 (13,8%)	138 (86,3%)	160
		% Fração de Ejeção	91,7%	100,0%	98,8%
Total		Casos (% polimorfismo)	24 (14,8%)	138 (85,2%)	162
		% Fração de Ejeção	100,0%	100,0%	100,0%

* Teste Exato de Fischer

PARTE II - CULTURA DE CÉLULAS

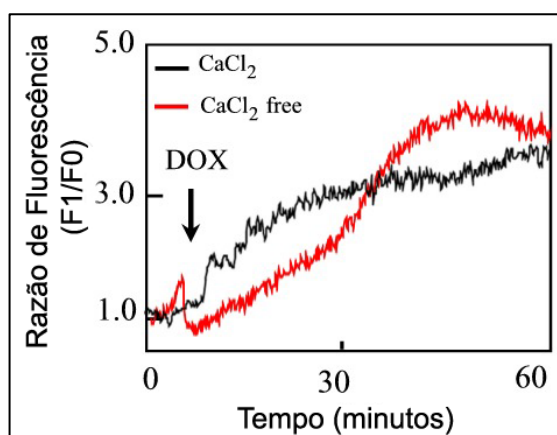
4.II.1 Isolamento de cardiomiócitos obtidos a partir de culturas primárias de corações isolados de camundongos tipo selvagem (*ZPrnp^{+/+}*) e nocaute (*ZPrnp^{0/0}*).

A obtenção de cardiomiócitos a partir de animais tipo selvagem (*ZPrnp^{+/+}*) ou nocaute (*ZPrnp^{0/0}*) era nosso objetivo inicial. Em particular as células provenientes de animais *ZPrnp^{0/0}* seriam uma ferramenta muito importante uma vez que não expressam a proteína PrP^C endógena. Portanto, a expressão das proteínas humanas PrP^C com os diferentes polimorfismos poderia determinar o papel protetor associado a cada variante alélica. Infelizmente, não foi possível isolar cardiomiócitos destes animais apesar de termos sucesso na obtenção destas células a partir de animais tipo selvagem. Esta dificuldade foi causada provavelmente pela maior sensibilidade à diferentes tipos de estresse (neste caso às condições de cultura *in vitro*) das células de animais *ZPrnp^{0/0}*.

Na tentativa de mostrar que houve padronização da técnica de isolamento de cardiomiócitos de animais tipo selvagem e que estes eram viáveis e funcionais, realizamos ensaios de resposta celular a doxorrubicina pela quantificação de cálcio. Já foi descrito que a doxorrubicina atua na homeostase do cálcio intracelular, e que esse mecanismo seria então um dos responsáveis pela morte celular por estresse oxidativo (SEON-YOUNG et al. 2006). Procedemos então ensaios com culturas primárias de

cardiomiócitos de animais do tipo selvagem (*ZPrnp^{+/+}*) tratadas com 3 μ M de doxorubicina durante 1 hora. As células foram inicialmente marcadas com o corante Fluo 3AM por 30 minutos e o experimento da medida de $[Ca^{2+}]_i$ foi avaliado na presença ou na ausência de cálcio extracelular, como demonstrado na **Figura 14**.

Nossos resultados demonstram que há um aumento do cálcio intracelular (razão entre a fluorescência inicial das células (F0) e o pico de fluorescência (F1) após o tratamento com doxorubicina, o que aponta para a funcionalidade e viabilidade destas células. Além disso, este incremento de cálcio intracelular ocorre mesmo na ausência de cálcio extracelular (linha vermelha da **Figura 14**), apontando que este incremento deva-se portanto, à liberação de cálcio de estoques intracelulares, particularmente de retículo endoplasmático.



Legenda: Cardiomiócitos provenientes de animais tipo selvagem *ZPrnp^{+/+}* foram tratados ($CaCl_2$) ou não ($CaCl_2$ free) com cálcio extracelular e a variação da absorção desse íon foi mensurada através da razão de fluorescência emitida F1/F0, onde F1 representa o pico de fluorescência e F0, a fluorescência inicial das células .

Figura 14 - Gráfico de fluorescência dos cardiomiócitos tipo selvagem *ZPrnp^{+/+}* após tratamento com cálcio extracelular.

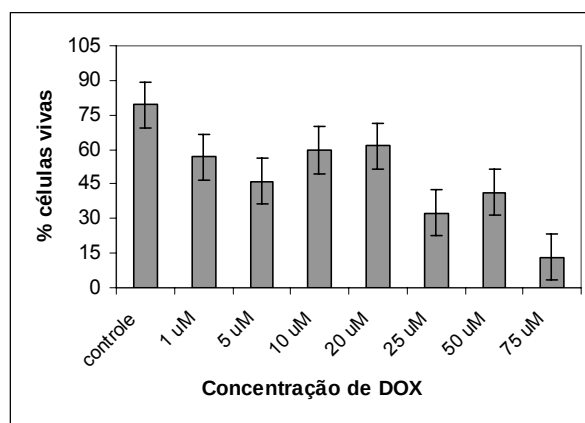
4.II.2 Linhagem celular H9c2

A Tratamento celular com doxorrubicina

Dada a impossibilidade de se usar culturas primárias de cardiomiócitos de animais *ZPrnp^{0/0}* decidimos continuar o estudo usando a linhagem celular de cardiomiócitos de rato, H9c2.

A primeira abordagem experimental conduzida nestas células foi a determinação de sua sensibilidade à toxicidade da doxorrubicina.

A **Figura 15** mostra a padronização da toxicidade da doxorrubicina (doses de 1 a 75µM) em células H9c2. O tratamento com 20µM da droga causa a morte de 40% das células quando comparadas aos controle sem tratamento. Esta condição nos pareceu adequada para estudarmos o efeito protetor da expressão das proteínas PrP^C humanas com os diferentes polimorfismos.

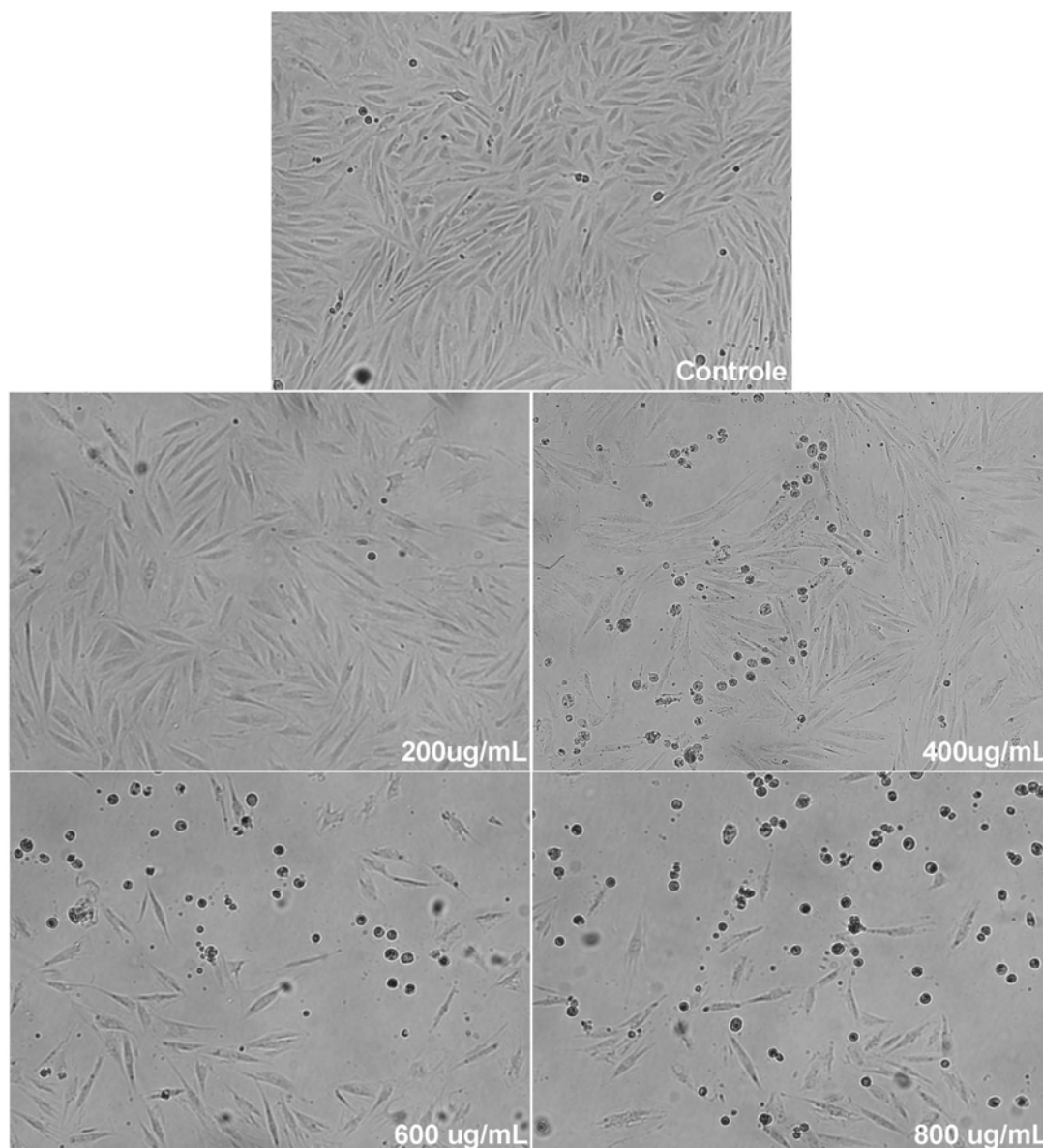


Legenda: A linhagem celular H9c2 foi tratada por 24 horas com diferentes doses de doxorrubicina para estabelecimento da dose ideal para este tipo celular nas condições presentes em nosso laboratório. Estabelecemos a dose de 20 µM como padrão para posterior tratamento celular com Doxorrubicina nos construtos pEGFP-PrP^C.

Figura 15 – Curva dose-resposta da toxicidade de diferentes concentrações de doxorrubicina em células H9c2 tratadas por 24 horas.

B Padronização do tratamento de células H9c2 com G₄₁₈.

Um ensaio inicial para estabelecer a dose de G₄₁₈ (neomicina) que seria utilizada após a transfecção celular foi conduzida com 200, 400, 600 e 800µg/mL deste antibiótico. Como pode ser observado na **Figura 16**, a linhagem H9c2 apresentou sensibilidade ao antibiótico a partir da dose de 400µg/mL após dois dias de tratamento. Após cinco dias de tratamento com 400, 600 ou 800µg/mL não havia mais nenhuma célula viva e em 10 dias nenhum dos tratamentos mostrava células vivas. Optamos então por trabalhar com a dose de 400µg/mL de G₄₁₈.



Legenda: Teste das células da linhagem H9c2 quanto à sua sensibilidade ao antibiótico neomicina. O painel superior corresponde ao controle, sem a adição de antibiótico à cultura celular. Os demais painéis foram tratados com 200, 400, 600 ou 800 μ g/mL de G_{418} . A dose de 400 μ g/mL de G_{418} foi a escolhida para ser utilizada em nossas células após a inserção dos construtos de pEGFP-PrP^C.

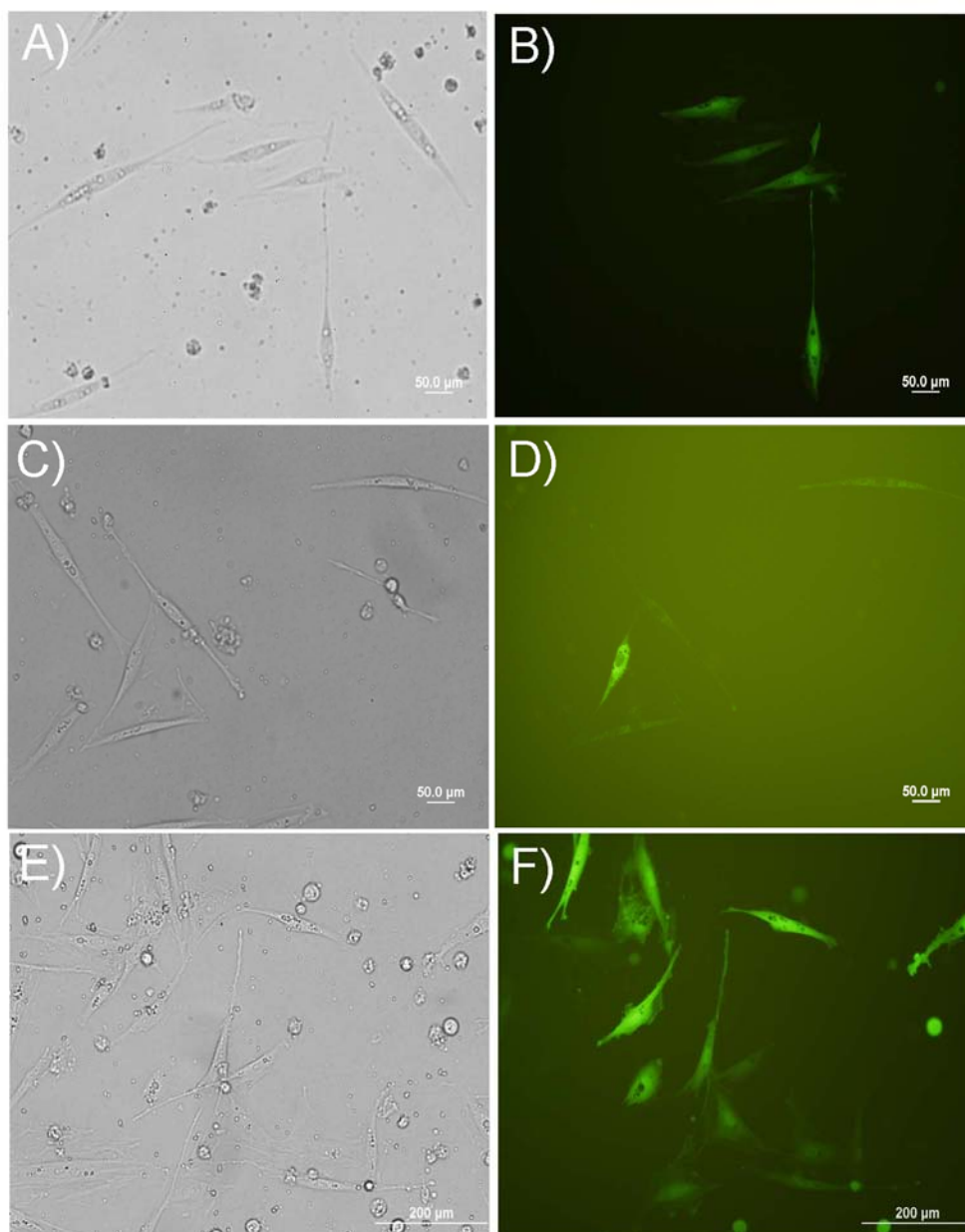
Figura 16 - Tratamento com G_{418} nas doses indicadas após quatro dias de cultura.

C Transfecção da linhagem H9c2

Iniciamos as transfecções de células H9c2 com os vetores de expressão das proteínas PrP^C contendo apenas os polimorfismos 129M e 129V (ambos sem deleção de octapeptídeos) fusionadas com a EGFP (pEGFP-PrP^C). Estes foram denominados pEGFP-129M ou pEGFP-129V respectivamente. As células foram transfectadas com o uso de lipofectamina como previamente descrito (LEE et al. 2001).

A padronização foi feita utilizando-se 1µg, 5µg, 10µg e 15µg de lipofectamina e 0,5µg, 1µg, 2µg e 4µg dos vetores por períodos de 2 e 4 horas de transfecção. Os melhores resultados foram obtidos com o tempo de 4 horas de transfecção e utilizando-se 2µg do vetor e 5µg de lipofectamina (dados não mostrados), onde foi obtido cerca de 45% de eficiência de transfecção. Na transfecção com 10µg de lipofectamina houve menor eficiência de transfecção (20%) e alta toxicidade para as células, enquanto no tratamento com 4µg do vetor também houve muito dano celular e eficiência de transfecção de cerca de 30%.

A **Figura 17** mostra a expressão das proteínas EGFP-PrP129M e EGFP-PrP129V. O vetor vazio pEGFP-C1 foi usado como controle positivo e é possível verificar que sua eficiência de transfecção é superior as anteriores (cerca de 80%).



Legenda: **A)** e **B)** Microscopia de campo claro e de fluorescência, respectivamente, com o vetor pEGFP-129M **C)** e **D)** Microscopia de campo claro e de fluorescência com o vetor pEGFP-129V; **E)** e **F)** Microscopia de campo claro e de fluorescência com o vetor vazio pEGFP-C1 (controle positivo). As células expressaram uma menor quantidade de proteína fusionada EGFP-PrP^C após 48 horas de sua transfecção quando comparadas ao controle positivo onde somente o vetor vazio (EGFP) foi transfectado (**F**). Barras: (A-D), 50μm; (E-F), 200μm.

Figura 17 - Expressão das proteínas EGFP-PrP129M, EGFP-129V e EGFP em H9c2 após 48 horas da transfecção.

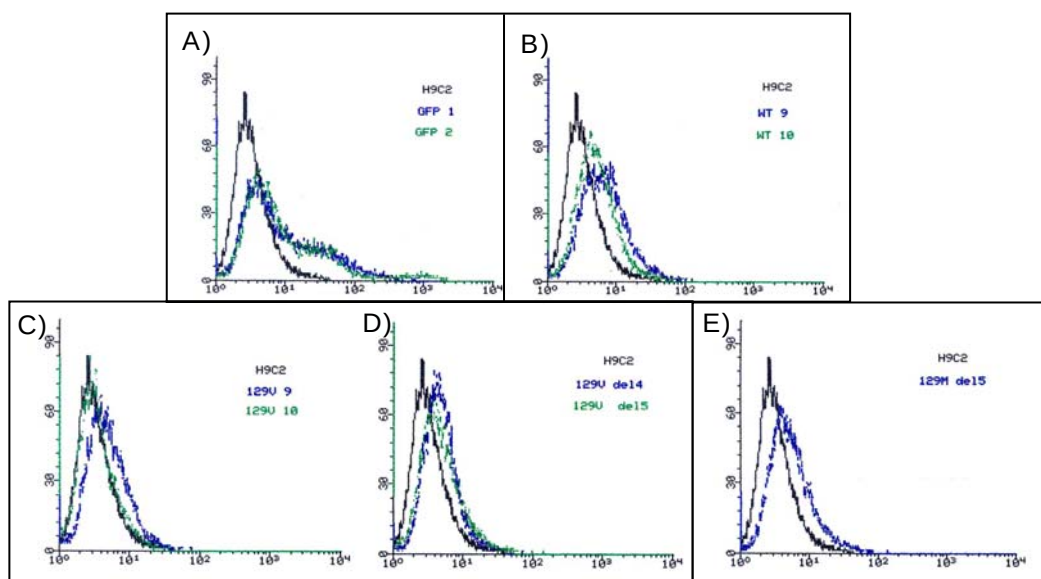
D Análise de *pools* de células H9c2 transfectadas com vetor de expressão de PrP^C por citometria de fluxo

Após o período de seleção com o antibiótico, observamos que a fluorescência das células transfectadas não era mais visível ao microscópio confocal e resolvemos avaliá-las através da técnica de citometria de fluxo. Avaliamos várias culturas de células transfectadas com os 5 diferentes construtos (pEGFP-C1, pEGFP-129M, pEGFP-129V, pEGFP-129Mdel, pEGFP-129Vdel) e selecionadas por pelo menos 14 dias com G₄₁₈.

A abordagem inicial foi a quantificação da intensidade de fluorescência da proteína EGFP em cada um dos *pools* celulares isolados. Foram avaliados pelo menos dois *pools* celulares transfectados com cada um dos construtos desse estudo, e estes foram comparados com o controle representado pela célula não transfectada. Verificamos que havia deslocamento de fluorescência no *pool* transfectado com o construto pEGFP-C1 (vetor vazio), referente à expressão da proteína EGFP em relação ao controle (célula não transfectada) (**Figura 18A**). O *pool* celular expressando o construto pEGFP-129M, aqui chamado WT, apresentou deslocamento de intensidade de fluorescência (**Figura 18B**). O mesmo valia para os *pools* celulares transfectados com os construtos pEGFP-129V (**Figura 18C**), pEGFP-129Vdel (**Figura 18D**) e pEGFP-129Mdel (**Figura 18E**).

A seguir as células foram marcadas com o anticorpo monoclonal 3F4 que reconhece somente PrP^C humana. Desta forma poderíamos determinar a expressão da proteína exógena e excluir a expressão da proteína endógena de rato expressa pela célula H9c2. Como controle a

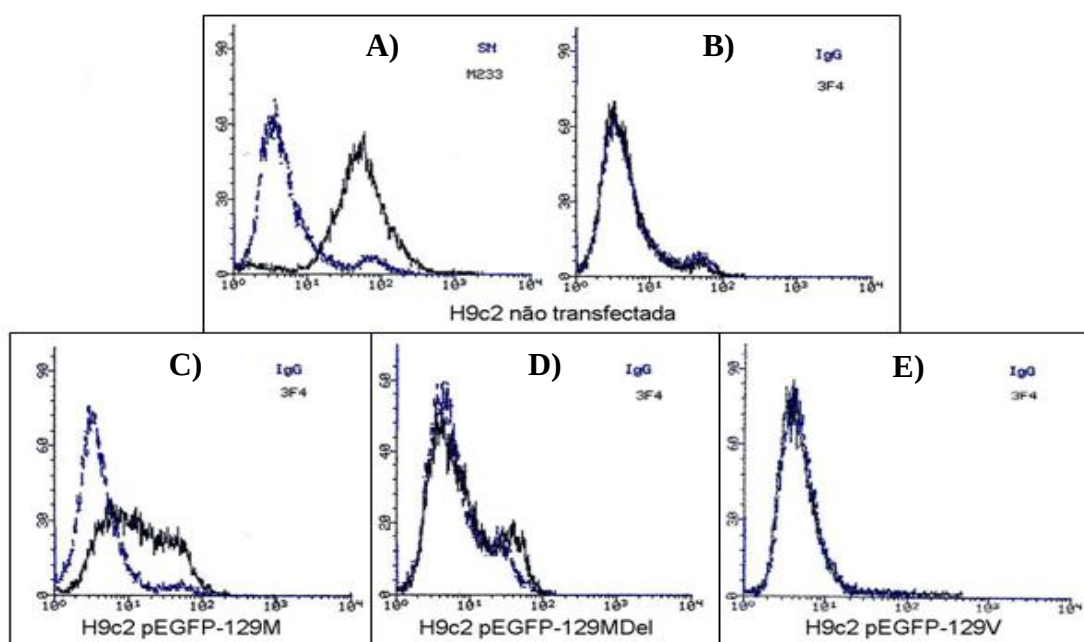
célula parental foi marcada com um anticorpo policlonal capaz de reconhecer a proteína PrP^C endógena (rato) (**Figura 19A**). A **Figura 19B** confirma que o anticorpo monoclonal 3F4 não reconhece a PrP^C endógena expressa por esta célula. As células transfectadas com o construto pEGFP-129M apresentaram reconhecimento pelo anticorpo 3F4, o que demonstra que a proteína de fusão EGFP-PrP129M foi expressa nesse *pool* celular (**Figura 19C**).



Legenda: A intensidade de fluorescência da proteína EGFP foi utilizada como controle inicial da inserção dos construtos utilizados na transfecção celular. Dois *pools* celulares da célula H9c2 transfectados com o construto: **A)** pEGFP-C1 (vetor vazio); **B)** pEGFP-129M; **C)** pEGFP-129V; **D)** pEGFP-129Vdel; **E)** pEGFP-129Mdel. A célula H9c2 não transfectada foi utilizada como controle negativo de todas as reações.

Figura 18 - Expressão das proteínas EGFP-PrP129M, EGFP-PrP129V, EGFP-PrP129Mdel e EGFP-PrP129Vdel em células H9c2 .

Por outro lado, a expressão de PrP^C humano nos *pools* H9c2 transfectados com pEGFP-129Mdel (**Figura 19D**) e pEGFP-129V (**Figura 19E**) não foi detectada. Estes dados indicam que alguns dos *pools* de células transfectadas expressam baixas concentrações da proteína PrP^C e não foi possível sua detecção por citometria de fluxo.

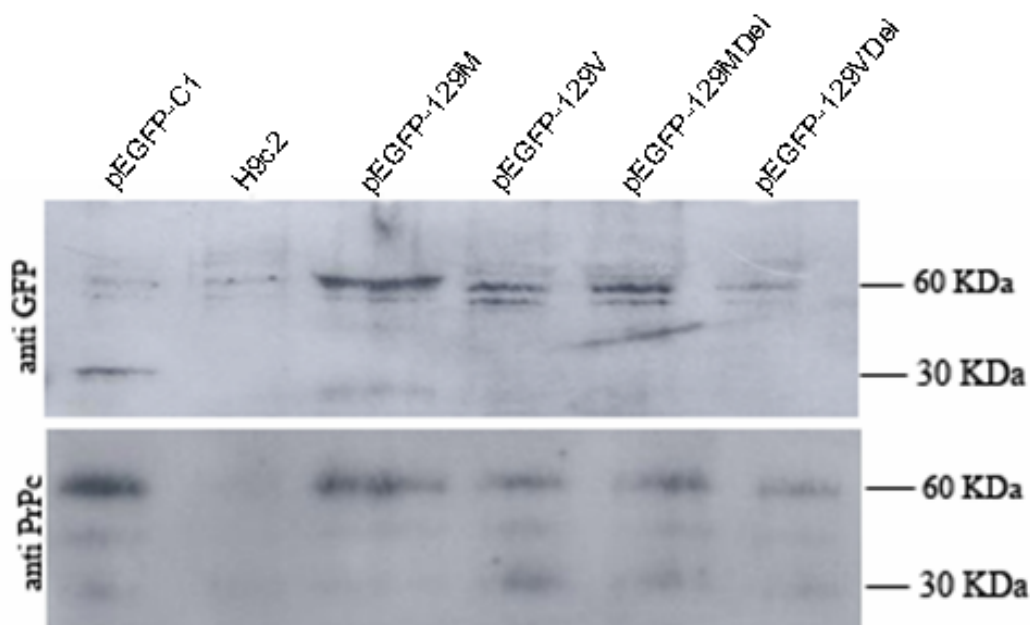


Legenda: Linhagem celular H9c2 não transfectada, marcada com o anticorpo policlonal anti-PrP^C que reconhece a proteína de rato (**A**); marcada com o anticorpo monoclonal 3F4 que reconhece PrP^C humana (**B**); transfectada com o construto pEGFP-129M marcada com 3F4 (**C**); transfectada com o construto pEGFP-129Mdel marcada com 3F4 (**D**); transfectada com o construto pEGFP-129V marcada com 3F4 (**E**). Como controle negativo de todos os ensaios foi utilizada a célula H9c2 não transfectada marcada com IgG irrelevante (em azul).
Figura 19 - Expressão das proteínas EGFP-PrP129M, EGFP-PrP129Mdel e EGFP-129V em células H9c2.

E **Análise de *pools* de células H9c2 por *Western blot***

A expressão das proteínas exógenas de PrP^C fusionadas a EGFP foram avaliadas ainda por ensaio de *western blot*. Foi utilizado como controle positivo o extrato protéico de células H9c2 que foram transfectadas com o vetor vazio. A parte superior da **Figura 20** mostra o *Western Blot* realizado com o anticorpo anti-EGFP. Observamos banda dupla na altura de 60 KDa, que equivale à proteína fusionada EGFP-PrP^C nos *pools* transfectados. O *pool* transfectado com o vetor vazio (pEGFP-C1), apresenta banda na altura de 30 KDa, referente a apenas EGFP. Como observado previamente nos ensaios de citometria de fluxo, o *pool* pEGFP-129M parece expressar maior quantidade de proteína fusionada. Uma banda única de 60 KDa e bastante fraca aparece ainda nas células H9c2 não transfectadas, o que deve indicar neste caso, tratar-se de reconhecimento inespecífico.

A parte inferior da **Figura 20** mostra a mesma membrana reagida com o anticorpo policlonal anti-PrP^C (de camundongo). Uma banda de 60 KDa que corresponde à proteína de fusão EGFP-PrP^C pode ser vista em todos os *pools* e, como esperado, não é vista na célula H9c2 não transfectada. Entretanto, a mesma banda aparece na célula transfectada com o vetor vazio.



Legenda: *Pools* celulares marcados com os anticorpos anti-EGFP (parte superior) e anti PrP^C (parte inferior), confirmando a presença de PrP^C fusionada a EGFP (banda de 60KDa) em todos os construtos transfectados nas células H9c2.

Figura 20 - *Western Blot* dos *pools* celulares transfectados com os construtos de pEGF-PrP^C.

Tentamos isolar células com expressão da PrP^C exógena por “*cell sorting*” como explicado em Material e Métodos. Entretanto, durante as passagens seriadas das células, observamos que havia morte celular e uma diminuição da fluorescência das células sobreviventes. Isso inviabilizou a continuação do trabalho com esta linhagem celular transfectada.

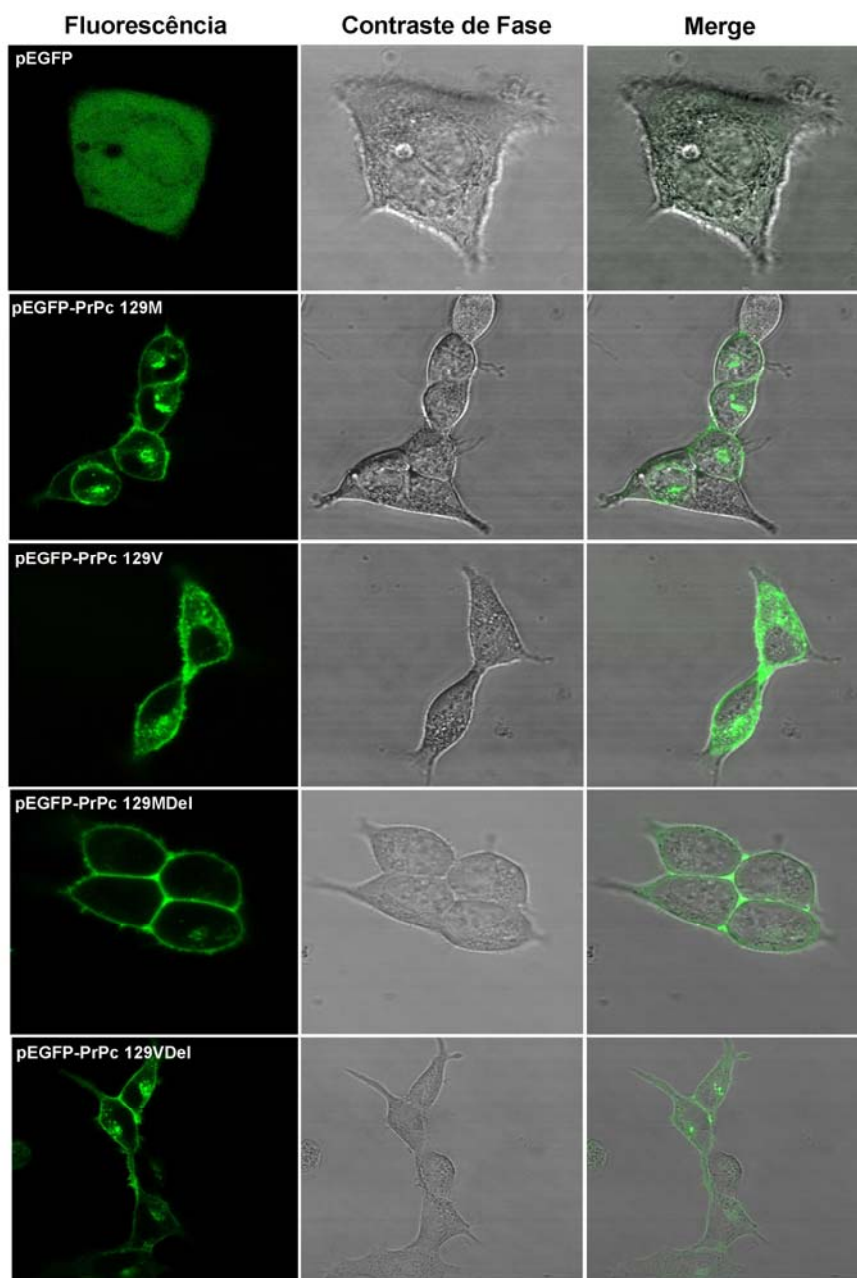
4.II.3 Linhagem HEK293

A Transfecção Celular

As dificuldades mostradas na caracterização dos clones de células H9c2, bem como a baixa expressão de algumas das variantes alélicas de

PrP^C levaram-nos à expressão e caracterização destas proteínas em outro tipo celular. A indisponibilidade de outra linhagem celular de cardiomiócitos levou-nos a escolher as células HEK293. A grande vantagem deste tipo celular é sua alta eficiência de transfecção.

As células foram transfectadas com lipofectamina de maneira semelhante às H9c2, e apresentaram uma eficiência de transfecção de cerca de 80%. As células foram selecionadas com G₄₁₈ e a expressão das proteínas EGFP-PrP^C foi avaliada por microscopia de confocal como mostrado na **Figura 21**. Como esperado, as proteínas fusionadas EGFP-PrP^C com os diferentes polimorfismos apresentaram localização na membrana celular e em região perinuclear correspondente ao complexo de Golgi (LEE et al. 2001).

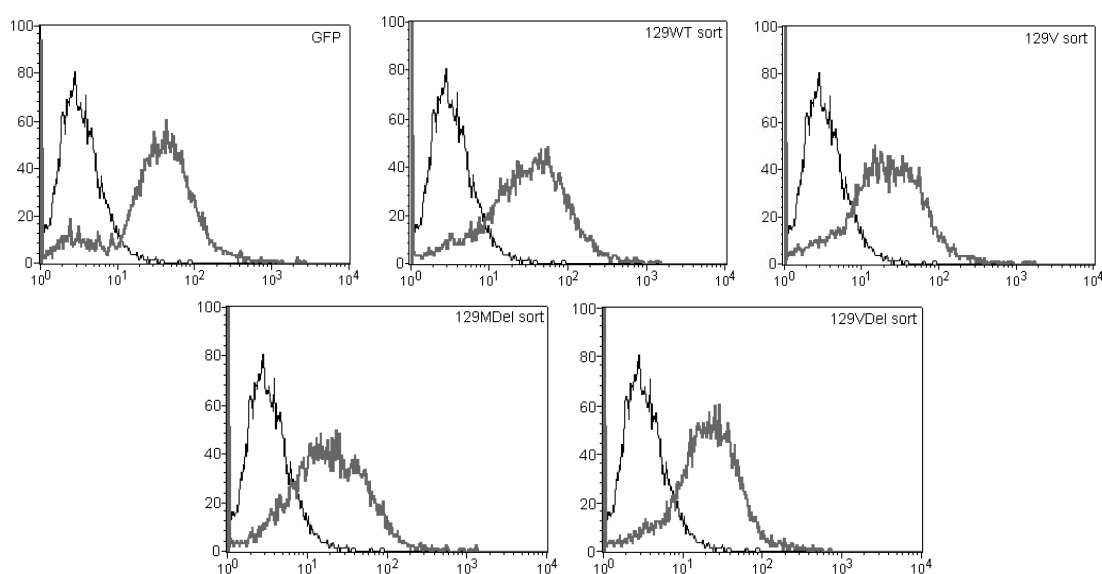


Legenda: Microscopia de confocal dos clones de HEK293 transfectados com os construtos de pEGFP-PrP^C confirmando a presença da proteína fusionada em todos os clones construídos. Como pode ser observado, as células transfectadas com os construtos apresentam marcação em região perinuclear e na membrana, indicando os locais onde PrP^C se concentra. Já as células transfectadas com o vetor vazio, apresentaram um distribuição homogênea de fluorescência por todo corpo celular (pEGFP).

Figura 21 - Microscopia de confocal dos clones celulares de HEK293 transfectados com os construtos de pEGF-PrPC.

B Citometria de Fluxo

Após o período de seleção com G₄₁₈, as células que expressavam as proteínas de fusão foram selecionadas por “*cell sorting*” como descrito em Material e Métodos. Para marcarmos as células não viáveis, foi utilizado o corante intercalante de DNA iodeto de propídeo (IP). Aliquotas celulares não marcadas com IP foram separadas e utilizadas para compensação da leitura da fluorescência vermelha (IP) em relação à verde (EGFP). Duas etapas de “*cell sorting*” foram usadas para que se conseguisse uma população homogênea para a expressão das proteínas de interesse.



Legenda: A curva à esquerda (mais fina) representa a população de células HEK293 não transfectada, que foi utilizada como controle negativo da transfecção, enquanto a curva à direita (mais larga) representa a população transfectada com cada um dos construtos descritos e selecionadas por *cell sorting*.

Figura 22 - Histograma de intensidade de fluorescência dos clones celulares de HEK293 transfectados com os construtos de pEGFP-PrP^C após separação por *cell sorting*.

A **Figura 22** mostra a análise da expressão das proteínas exógenas a partir da fluorescência de EGFP a elas fusionado. Todos os clones isolados apresentam uma alta expressão da proteína exógena.

Algumas tentativas iniciais foram feitas para se padronizar a toxicidade da doxorubicina destas células. Infelizmente estes ensaios não foram finalizados. Neste trabalho houve portanto, a geração de uma ferramenta muito importante para nossos estudos futuros.

PARTE III - MODELO ANIMAL

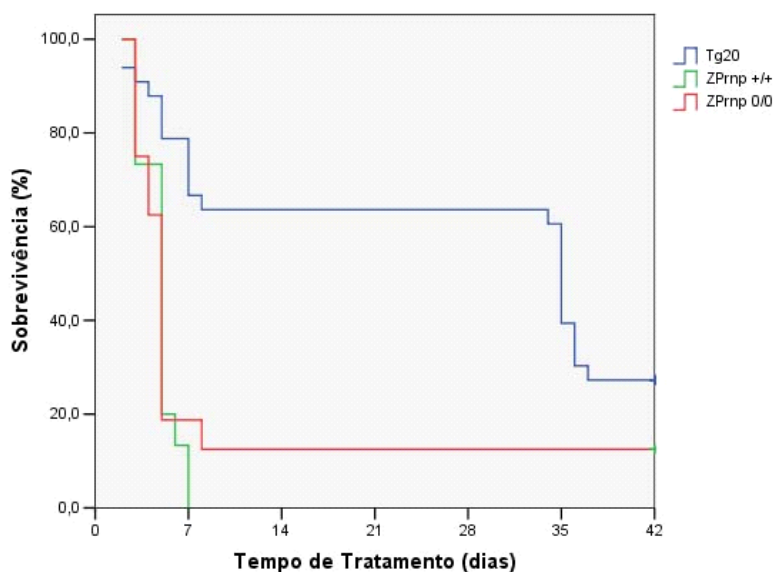
4.III.1 Animais tratados com Doxorubicina

A Animais $ZPrnp^{0/0}$, $ZPrnp^{+/+}$ e Tg20

Na tentativa de avaliar um possível papel protetor de PrP^C na toxicidade a doxorubicina, camundongos nocautes para PrP^C ($ZPrnp^{0/0}$), ou que expressam cerca de 6 vezes mais PrP^C (Tg20) e seus controles tipo selvagem ($ZPrnp^{+/+}$) foram tratados com uma dose única (i.p.) de 30 mg/kg de doxorubicina. Esta dose foi escolhida para iniciar os estudos pois é a dose máxima da droga descrita na literatura empregada em camundongos.

O óbito dos animais começou a ocorrer em torno do terceiro dia após o início do tratamento. As três cepas de camundongos tiveram um pico de morte em torno do sexto dia após a injeção do quimioterápico. Os animais tipo selvagem e nocaute responderam igualmente quanto a mortalidade

($p=0,6$); os animais Tg20 ($n=33$), entretanto, apresentaram uma resistência maior à toxicidade da droga, sendo esta diferença estatisticamente significativa quando comparada ao nocaute ($n=16$) ($p<0,005$) e ao animal tipo selvagem ($n=15$) ($p<0,001$) (**Figura 23**).

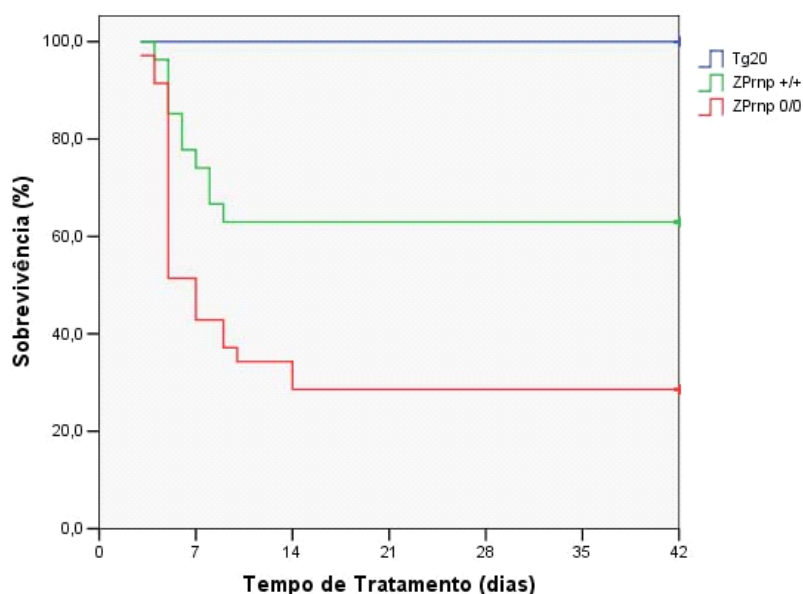


Legenda: Camundongos $ZPrnp^{+/+}$ ($n=15$), $ZPrnp^{0/0}$ ($n=16$) e Tg20 ($n=33$) foram injetados com doxorubicina intraperitonealmente e seu tempo de sobrevida acompanhado por 42 dias. Como pode ser observado no gráfico, os animais da linhagem Tg20 (linha azul) apresentaram maior tempo de sobrevida do que os animais tipo selvagem (linha verde) e animais nocaute (linha vermelha).

Figura 23 - Curva de tempo de sobrevida dos animais $ZPrnp^{0/0}$, $ZPrnp^{+/+}$ e Tg20 após o tratamento com 30 mg/kg de doxorubicina.

Um novo grupo de camundongos foi avaliado após este tratamento, com uma dose de doxorubicina de 20 mg/kg. Neste experimento verificamos que a sobrevivência dos animais nocaute ($n=35$) é muito menor, quando comparados aos animais do tipo selvagem ($n=27$) ($p=0,008$).

Já entre nos animais Tg20 ($n=10$), não ocorreu nenhum óbito, dado que é estatisticamente diferente das outras duas cepas ($p<0,03$). Os animais $ZPrnp^{+/+}$ e $ZPrnp^{0/0}$ começaram a morrer em torno do terceiro dia após o início do tratamento. A sobrevivência após 42 dias de tratamento não ultrapassou 25% nos animais $ZPrnp^{0/0}$ e foi de 63% para os animais tipo selvagem (Figura 24).

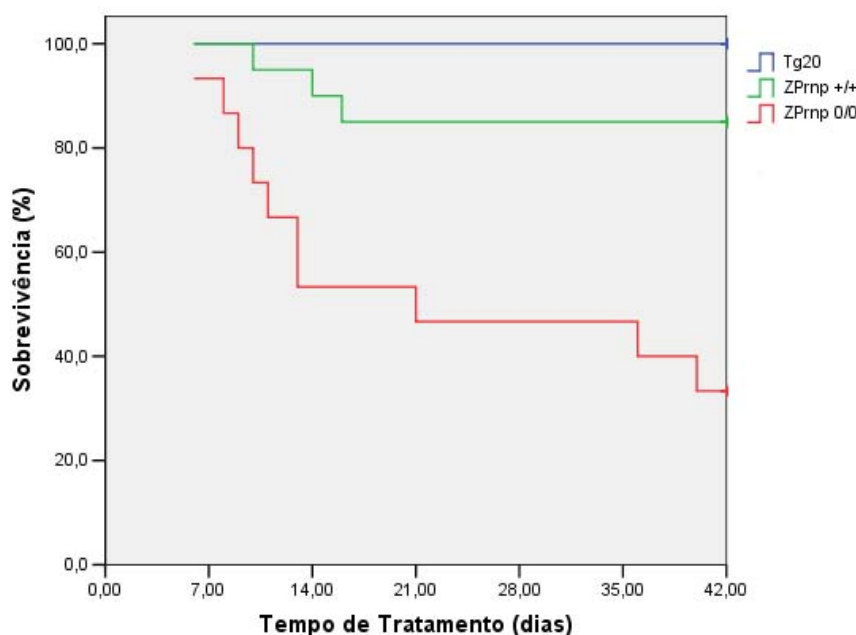


Legenda: Camundongos $ZPrnp^{+/+}$ ($n=27$), $ZPrnp^{0/0}$ ($n=35$) e Tg20 ($n=10$) foram injetados com doxorrubicina intraperitonealmente e avaliados por 42 dias. Não houve nenhum óbito nos animais Tg20 (linha azul). Já cerca de 37% dos animais tipo selvagem (linha verde) e 75% dos animais nocaute (linha vermelha) morreram.

Figura 24 - Curva de tempo de sobrevivência dos animais $ZPrnp^{0/0}$, $ZPrnp^{+/+}$ e Tg20 após o tratamento com 20 mg/kg de doxorrubicina.

Resultados semelhantes foram obtidos quando diminuimos a dose de doxorrubicina para 15 mg/kg. Apesar do tempo de sobrevivência aumentar quando este grupo é comparado com o grupo que recebeu 20mg/Kg de doxorrubicina, continua havendo um tempo de sobrevivência maior dos animais

tipo selvagem (n=20) quando comparados aos $ZPrnp^{0/0}$ (n=15) ($p<0,001$). Por sua vez, os animais Tg20 (n=10) continuaram apresentando uma melhor sobrevivência a este tratamento que os nocautes ($p<0,001$). Nesta concentração da droga, os animais Tg20 não apresentaram tempo de sobrevivência estatisticamente diferente dos do tipo selvagem ($p<0,2$) (**Figura 25**).

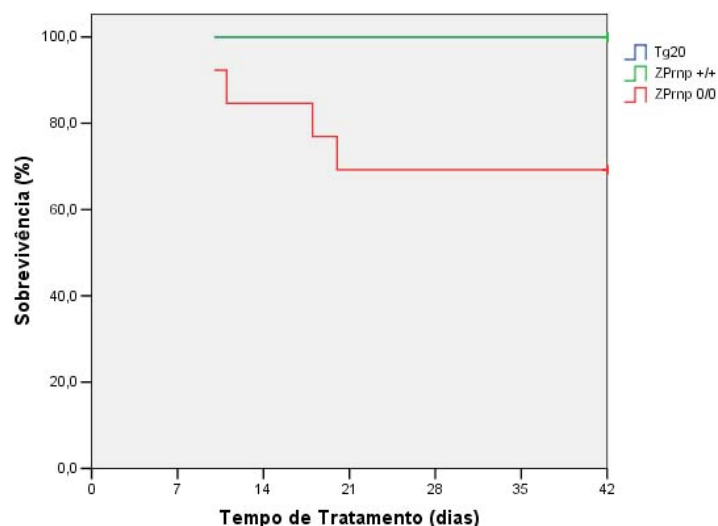


Legenda: Camundongos $ZPrnp^{+/+}$ (n=20), $ZPrnp^{0/0}$ (n=15) e Tg20 (n=10) foram injetados com doxorrubicina intraperitonealmente e avaliados por 42 dias. Todos os animais Tg20 e 80% dos tipo selvagem sobreviveram ao tratamento. Os animais nocautes por sua vez apresentaram uma sobrevivência de apenas 30%.

Figura 25 - Curva de tempo de sobrevivência dos animais $ZPrnp^{0/0}$, $ZPrnp^{+/+}$ e Tg20 após o tratamento com 15 mg/kg de doxorrubicina.

Na dose de 10 mg/kg, não houve mortalidade entre os animais Tg20 (n=9) e naqueles do tipo selvagem (n=15). Os animais nocaute (n=13) apresentaram 70% de sobrevivência ao fim do tratamento, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) quando comparado aos animais tipo selvagem ($p=0,002$) e Tg20 ($p=0,07$) (**Figura 26**).

Quando finalmente foi aplicada a dose de 7,5 mg/kg de doxorubicina, todos os animais das três cepas estudadas (n=10 para cada grupo) sobreviveram após 42 dias de tratamento (dado não mostrado).



Legenda: Camundongos $ZPrnp^{+/+}$ (n=15), $ZPrnp^{0/0}$ (n=13) e Tg20 (n=9) foram injetados com 10mg/kg de doxorubicina intraperitonealmente e avaliados por 42 dias. Todos os animais tipo selvagem (linha verde) assim como os Tg20 sobreviveram ao tratamento. Já entre os animais nocaute a sobrevivência foi cerca de 70%.

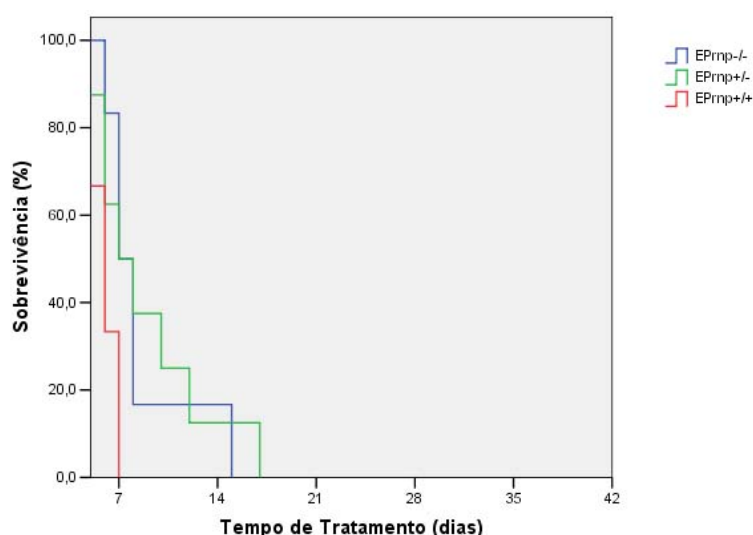
Figura 26 - Curva de tempo de sobrevida dos animais $ZPrnp^{0/0}$, $ZPrnp^{+/+}$ e Tg20 após o tratamento com 10 mg/kg de doxorubicina.

B Animais $EPrnp^{-/-}$, $EPrnp^{+/+}$ e $EPrnp^{-/+}$

Iniciamos os estudos com uma segunda linhagem de animais nocaute de PrP^C (MANSON et al. 1994). Isto foi necessário pois os animais $ZPrnp^{+/+}$, $Prnp^{0/0}$ e Tg20 possuem um *background* genético misto (C57/Bl10 x 129Sv). Este segundo grupo de animais são uma geração posterior de nocautes para PrP^C , cuja deleção do gene *Prnp* foi conduzida de maneira diferente daquela do primeiro grupo e além disso, estes camundongos possuem *background* proveniente de uma única linhagem (C57/Bl10) (como mostrado em

Casuística, Material e Métodos, **figuras 6 e 7**). Iniciamos o tratamento destes camundongos com a dose de 15 mg/kg de doxorrubicina, pois como descrito para o primeiro grupo de animais, esta quantidade da droga permitia diferenciar a sensibilidade à doxorrubicina de acordo com a expressão de PrP^C.

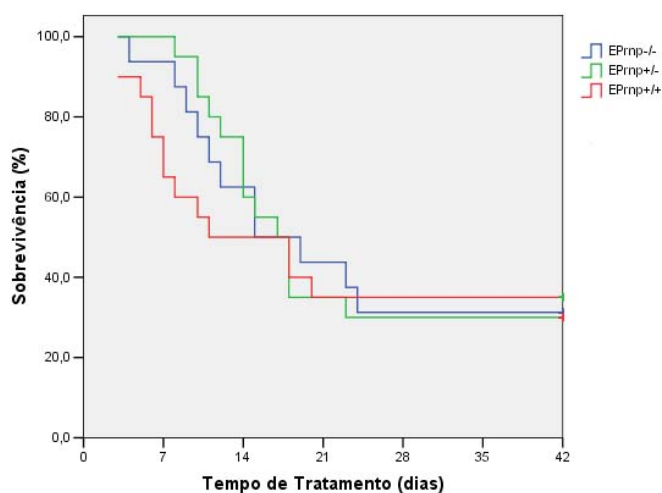
Surpreendentemente observamos que este grupo de animais, cujo *background* genético é C57/Bl10, apresentou uma mortalidade muito maior daquela demonstrada pelos animais avaliados anteriormente (**Figura 27**).



Legenda: Camundongos $EPrnp^{+/+}$ (n=23), $Eprnp^{-/-}$ (n=12) e $EPrnp^{-/+}$ (n=18) foram injetados intraperitonealmente com doxorrubicina e avaliados por 42 dias. Os animais com os três genótipos diferentes apresentaram alta sensibilidade ao tratamento e a mortalidade foi semelhante entre eles.

Figura 27 - Curva de tempo de sobrevivência dos animais $EPrnp^{+/+}$, $Eprnp^{-/-}$ e $EPrnp^{-/+}$ ao tratamento com 15 mg/kg de doxorrubicina.

Mesmo após diminuir a dose da doxorrubicina para 10 mg/kg (**Figura 28**), não foi possível determinar uma diferença na sensibilidade à droga nestes 3 grupos de animais.



Legenda: Camundongos $EPrnp^{+/+}$ ($n=16$), $EPrnp^{-/-}$ ($n=20$) e $EPrnp^{+/-}$ ($n=16$) foram injetados intraperitonealmente com doxorubicina e avaliados por 42 dias. Os animais com os três genótipos diferentes apresentaram uma sobrevida semelhante e de cerca de 35%.

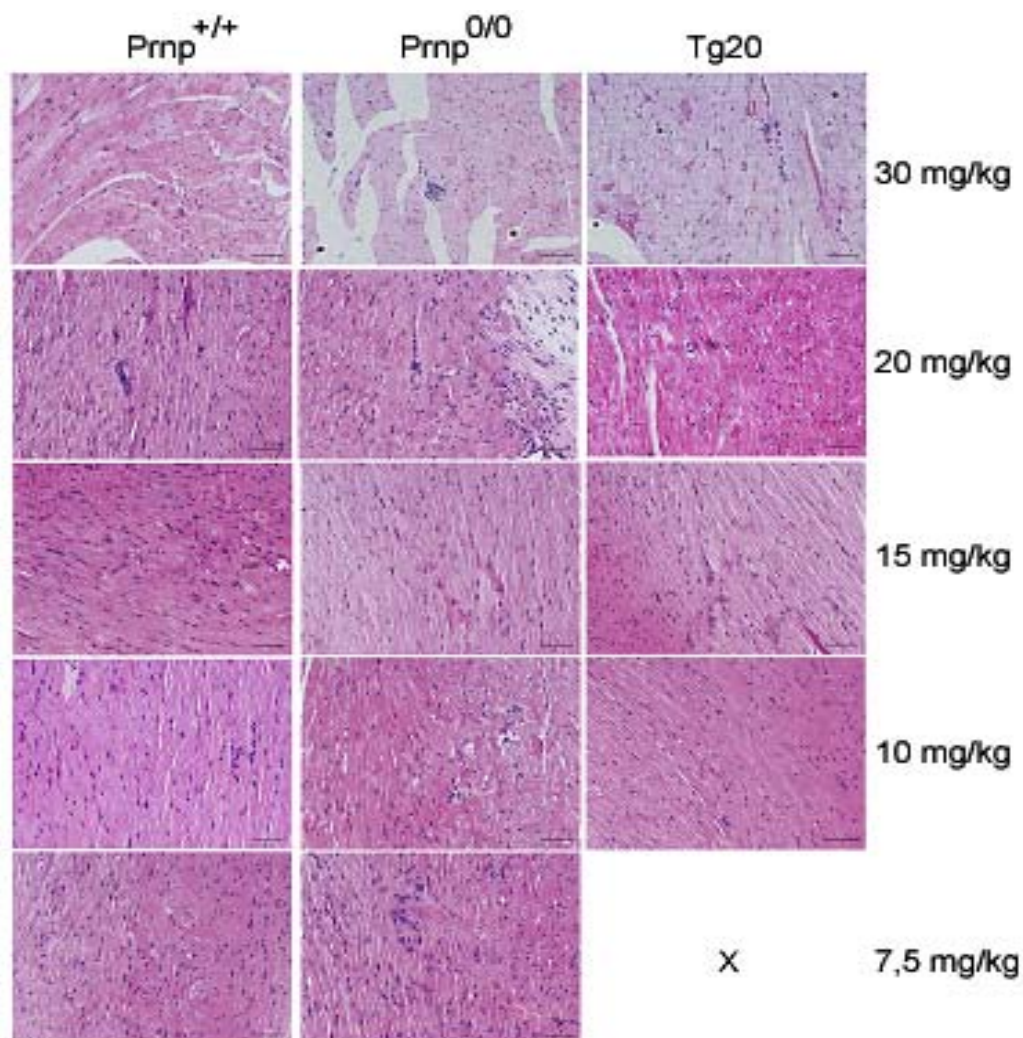
Figura 28 - Curva de tempo de sobrevida dos animais $EPrnp^{+/+}$, $EPrnp^{-/-}$ e $EPrnp^{+/-}$ ao tratamento com 10 mg/kg de doxorubicina.

4.III.2 Avaliação do tecido cardíaco dos camundongos tratados com doxorubicina

A Avaliação por hematoxilina e eosina (HE)

Ao fim do tratamento de 42 dias com doxorubicina, os animais sobreviventes foram sacrificados e seus corações removidos, fixados em formalina tamponada fosfatada 10% e emblocadas em parafina. Foram feitos cortes de 4 μ m, fixados em lâminas de vidro e os tecidos corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) para visualização das possíveis alterações cardíacas causadas pelo tratamento com a doxorubicina (**Figura 29**).

A princípio, este método não detectou anomalias no tecido cardíaco dos camundongos $ZPrnp^{+/+}$, $ZPrnp^{0/0}$ e Tg20 sobreviventes ao tratamento com diferentes doses de doxorubicina.



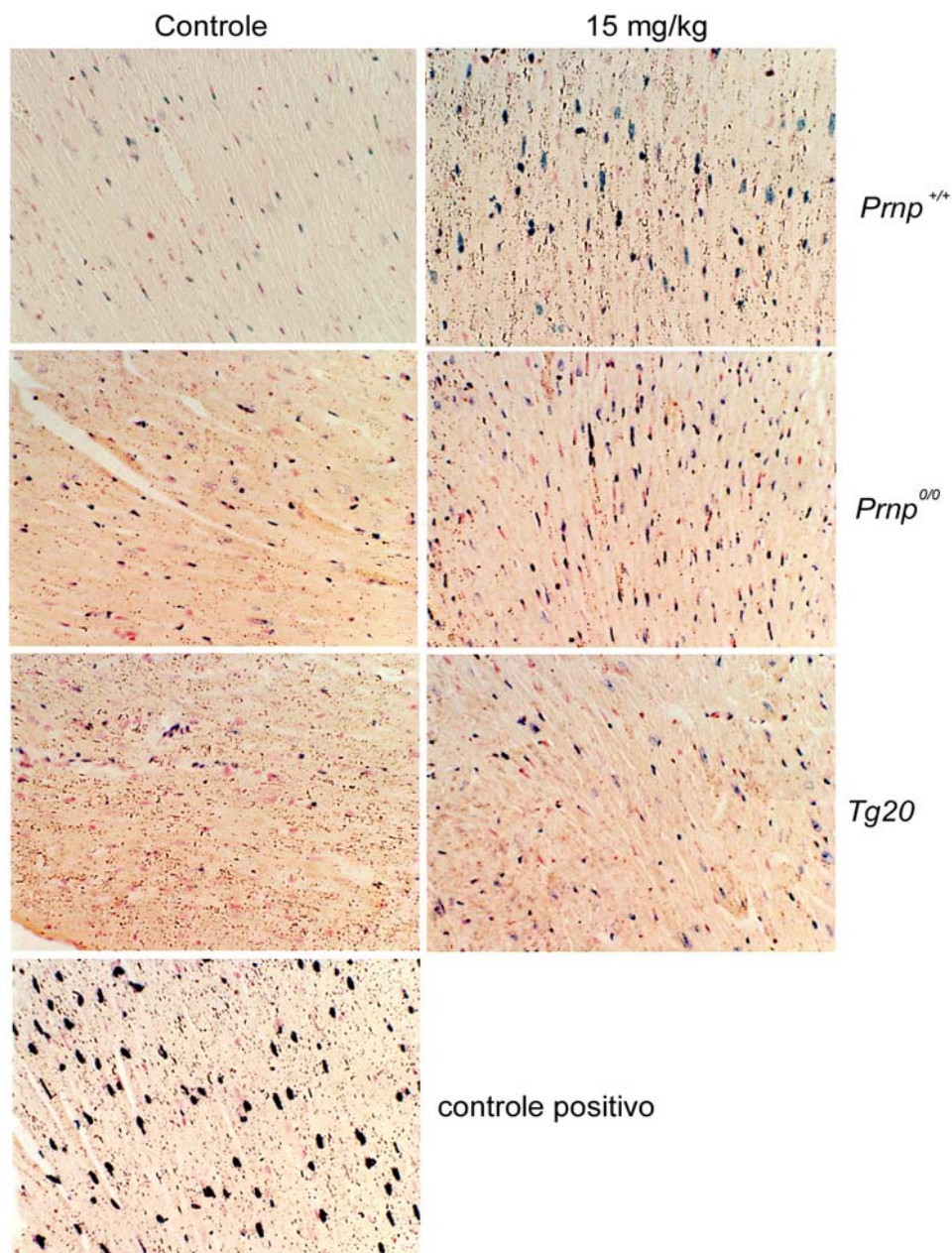
Legenda: Os animais foram submetidos à uma única dose de Doxorubicina intraperitoneal e observados por 42 dias consecutivos. Após este período, eles foram ortotansados e seus corações foram removidos e fixados. A figura mostra cortes (4µm) do ventrículo esquerdo dos camundongos após coloração por hematoxilina e eosina. As doses do antracíclico utilizadas estão à direita das figuras e as respectivas linhagens de camundongos estão assinaladas acima das colunas. Barra: 100µm

Figura 29 - Cortes histológicos de coração de camundongos após tratamento com doxorubicina.

B Avaliação de morte celular por apoptose

O tecido cardíaco proveniente dos animais sobreviventes ao tratamento com doxorrubicina foi tratado como descrito no item II.2.1 e corado com o kit CardioTACS (Chemicon) para visualização de núcleos marcados, indicativos da presença de morte celular por apoptose.

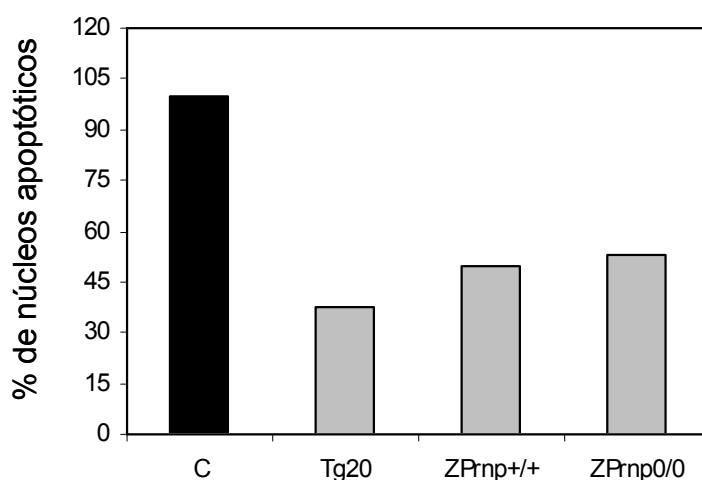
Podemos observar na **Figura 30** que não há uma diferença na presença de núcleos apoptóticos nos animais tipo selvagem (*ZPrnp^{+/+}*) quando comparados aos animais nocaute para a proteína prion celular (*ZPrnp^{0/0}*) após o tratamento com 15 mg/kg de doxorrubicina. No entanto, percebe-se um aumento na quantidade de núcleos apoptóticos no tecido de animais *ZPrnp^{+/+}* e *ZPrnp^{0/0}* após o tratamento com doxorrubicina quando comparados com seus respectivos controles sem tratamento. Já o animal que tem expressão aumentada da proteína prion celular (Tg20), apresenta menor quantidade de células em apoptose tanto no controle quanto após o tratamento com doxorrubicina, o que nos leva a acreditar que a alta expressão de PrP^C possa protegê-los contra a morte celular por apoptose dos cardiomiócitos.



Legenda: À esquerda estão os cortes de tecido cardíaco controle de camundongos tratados apenas com PBS. À direita, corte de tecido cardíaco dos animais tratados com uma dose única de 15 mg/kg de doxorubicina por 42 dias. Os núcleos apoptóticos encontram-se marcados de azul e os núcleos de células saudáveis de rosa claro (Kit-cardioTACS®). O controle positivo da reação foi feito segundo o protocolo do fabricante (R&D Systems, USA), com a utilização de corte de tecido tratado com DNase.

Figura 30 - Marcação de núcleos apoptóticos em tecido cardíaco de animais tratados com doxorubicina por 42 dias.

Para que pudéssemos quantificar esses núcleos, utilizamos o *software* ImageJ versão 1.32c (NIH, USA) para a contagem dos *pixels* dos núcleos apoptóticos após a marcação com o kit cardioTACS®. Para tanto, normalizamos o controle positivo da reação como tendo 100% de núcleos marcados e os espécimes avaliados foram comparados com o controle positivo (**Figura 31**). Para essa contagem dos núcleos apoptóticos, foram utilizados cortes de tecido cardíaco de 3 animais de cada linhagem, onde foram feitos 3 cortes seriados de cada um dos corações. Foram obtidas cerca de 20 imagens de cada coração e o valor dos *pixels* foi obtido por média aritmética.



Legenda: Os camundongos foram tratados com 15 mg/kg de doxorrubicina intraperitoneal durante 42 dias. Após esse período, seus corações foram removidos, cortes de 4µm foram feitos e os núcleos apoptóticos marcados com o uso do kit cardioTACS®. Os núcleos apoptóticos foram contados e a porcentagem de núcleos marcados no tecido correspondente ao controle positivo foi considerada 100%. Os valores encontrados para os tecidos dos animais tratados com doxorrubicina são relativos ao do controle positivo. **C** corresponde ao controle positivo da reação.

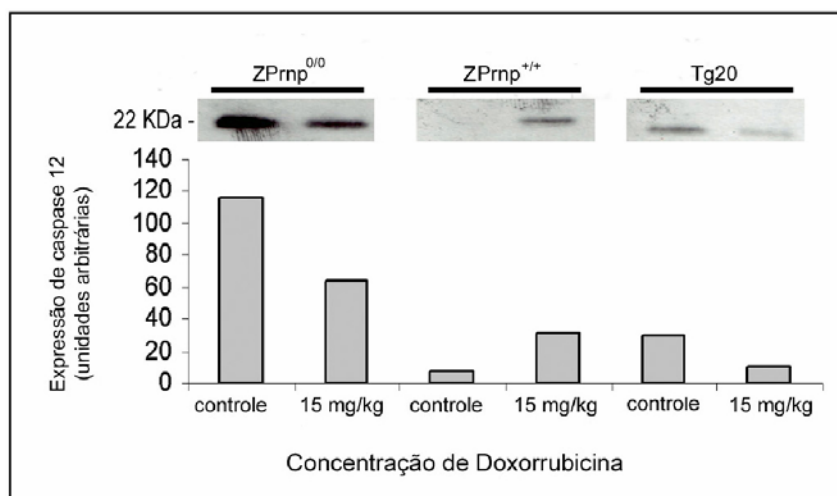
Figura 31 - Contagem da porcentagem de núcleos apoptóticos no tecido cardíaco dos animais tratados com 15mg/kg de doxorrubicina.

Como pode ser visto no gráfico da **Figura 31**, os animais Tg20 parecem apresentar menor porcentagem de núcleos apoptóticos quando comparados aos animais tipo selvagem e nocaute o que está de acordo com os dados apresentados na **Figura 30**.

A morte de células cardíacas nos animais tratados com 15mg/kg de doxorrubicina por 42 dias também foi avaliada pela ativação de caspase 12. Para tanto, extratos protéicos totais de corações removidos dos animais *ZPrnp^{+/+}*, *ZPrnp^{0/0}* e Tg20 foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidos para membrana de nitrocelulose para posterior marcação com o anticorpo contra caspase 12 ativada.

Como podemos observar na **Figura 32**, o animal deficiente para a proteína prion celular (*ZPrnp^{0/0}*) apresentou níveis basais de caspase 12 ativada maiores que os demais animais, o que pode vir a explicar sua maior susceptibilidade à droga quando comparado aos animais tipo selvagem e os animais Tg20.

No entanto, um fato curioso se deu no animal tipo selvagem, onde a expressão de caspase 12 praticamente não foi detectada em níveis basais e um ligeiro aumento foi observado após o tratamento com a doxorrubicina. Este resultado é o oposto daquele ocorrido com os animais Tg20, onde há maior expressão de caspase 12 ativada nos animais não tratados com a droga quando comparada à expressão destes animais tratados com 15 mg/kg de doxorrubicina.



Legenda: *Western Blot* dos extratos totais proteicos de coração dos animais tratados com doxorubicina, marcados com o anticorpo anti-caspase 12 (parte superior) e seu respectivo gráfico de densitometria (parte inferior). Os animais *ZPrnp*^{0/0} apresentam níveis de caspase 12 ativada mais elevados do que animais das duas outras linhagens, *ZPrnp*^{+/+} e Tg20, tanto antes quanto após o tratamento com doxorubicina.

Figura 32 - Quantificação dos níveis de caspase 12 ativada nos camundongos *ZPrnp*^{+/+}, *ZPrnp*^{0/0} e Tg20, antes e depois do tratamento com 15 mg/kg de doxorubicina por 42 dias.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que PrP^C está associado a proteção contra estresse oxidativo e que células de origem neuronal obtidas de animais nocautes para esta proteína exibem maior suscetibilidade a radicais livres e a outras agressões (BROWN et al. 1997a, 1997b, 1997c). PrP^C protege contra a apoptose neuronal mediada por Bax em culturas primárias de neurônios humanos. A deleção de quatro octapeptídeos, bem como as mutações D178N e T183A no *PRNP* suprimem completa ou parcialmente o efeito neuroprotetor de PrP^C (BOUNHAR et al. 2001).

Está amplamente estudado e aceito o fato de que os radicais livres de oxigênio gerados durante o ciclo de redução da doxorrubicina são os responsáveis pelos danos causados no coração (JULICHER et al. 1985; VENDITTI et al. 1998; SINGAL e ILISKOVIC 1998). Isso ocorre, porque a geração de radicais livres de oxigênio pela doxorrubicina e seu metabólito tóxico doxorrubicinol, acumulam-se no tecido cardíaco, que tem baixos níveis de anti-oxidantes (DE JONG et al. 1991). Como PrP^C pode atuar como um agente antioxidante ao se ligar a íons cobre e então atuar como uma enzima SOD Cu/Zn (BROWN e BESINGER 1998), sugerimos que concentrações de PrP^C diferentes ou o tipo de proteína expressa (com quatro ou cinco repetições de octapeptídeos associados ao polimorfismo no códon 129) possam atuar no tecido cardíaco protegendo-o contra o estresse causado por pela doxorrubicina.

Como a região de octapeptídeos repetidos parece estar envolvida mais especificamente com essa possível proteção contra o estresse oxidativo ao se ligar a íons cobre, a presença de quatro ou cinco repetições na molécula de PrP^C humana pode determinar maior ou menor proteção contra os efeitos cardiotoxícos causados pela doxorrubicina, mais especificamente o doxorrubicinol (LICATA et al. 2000). A cardiotoxicidade causada pelo tratamento com o quimioterápico Doxorrubicina pode comprometer a saúde dos pacientes e pode ocorrer até anos após o tratamento ter sido finalizado (KAPUSTA et al. 2000).

Ainda não existem estudos dos efeitos cardiotoxícos da doxorrubicina em relação à presença de cinco ou de quatro octapeptídeos na PrP^C e a presença do aminoácido valina ou metionina na posição 129 desta proteína. Foi descrito que a presença do aminoácido metionina por exemplo, na doença de parkinson iatrogênica (GOSSRAU et al. 2005), leva a uma diminuição dos tremores característicos da doença, quando comparados com indivíduos doentes que eram heterozigotos (M129V). Além disso, sabe-se que na nova variante de CJD (WONG et al. 2000), a presença do aminoácido valina em homozigozidade parece ter efeito protetor.

Os dados de levantamento de prontuário de pacientes do Hospital A.C.Camargo e seus respectivos ecodopplercardiogramas foram comparados com os dados genéticos para a verificação das possíveis correlações entre a presença ou não de cardiotoxicidade com o perfil genético do gene *PRNP*.

Em nossa amostra de 162 pacientes, avaliamos uma grande variedade de neoplasias sólidas e hematopoiéticas, distribuição equivalente quanto ao sexo dos pacientes e todos fora de tratamento quimioterápico há pelo menos 5 anos. Além disso, não havia nenhum paciente em idade avançada, o que poderia inferir em danos cardíacos decorrentes da idade.

A porcentagem de indivíduos (9,7%) com a presença da deleção de um octapeptídeo repetido está de acordo com a distribuição em uma população normal (cerca de 10%) (DOH-URA et al 1989), e a dose total de antracíclico dos pacientes também se enquadra dentro da dose máxima recomendada de 600mg/m^2 de área corpórea.

Nossos dados mostram que há uma alteração na FEVE nos únicos dois indivíduos que apresentam o aminoácido metionina em homozigossidade juntamente com a deleção de um octapeptídeo repetido (M129MDel). Esse achado pode sinalizar para uma possível associação entre a presença desse polimorfismo e uma maior sensibilidade a cardiotoxicidade pela doxorubicina. Entretanto, a nossa amostra ainda é pequena levando-se em conta a frequência do polimorfismo com deleção ao octapeptídeo repetido. Portanto, um número maior de indivíduos deve ser avaliado para permitir ou não a confirmação deste dado.

Embora preliminares, os dados deste trabalho apontam para uma área onde o clínico no futuro poderá individualizar o tratamento, pois será possível, através do perfil genético do paciente, adequar o tratamento de acordo com sua maior ou menor sensibilidade às drogas de acordo com o

tipo de tumor ou doença apresentado, diminuindo os efeitos tóxicos de uma determinada droga com a sensibilidade individual ao tratamento proposto.

Nossas culturas celulares foram um desafio durante a realização deste projeto. Inicialmente, tentamos as culturas primárias de camundongos, que não é uma cultura trivial e na qual foi investido muito tempo. Na literatura existem diversos trabalhos com culturas primárias de cardiomiócitos de rato, mas pouco ou quase nenhum dado com culturas de camundongos. Por fim conseguimos estabelecer este tipo de cultura nos animais tipo selvagem. No entanto, quando partimos para os animais nocaute para a PrP^C (*ZPrnp*^{0/0}), nos deparamos com um obstáculo: as células não suportavam o tratamento enzimático estabelecido para seu cultivo e nossos experimentos tiveram então que ser suspensos com este tipo celular. Embora tivessem sido tentados várias concentrações diferentes de tratamento enzimático, as células de animais nocaute sofrem muito mais com este tipo de cultivo. Isso pode ser devido ao fato das defesas antioxidantes presentes nos corações desses animais estarem alteradas pela ausência de um mecanismo mais completo de homeostase celular representado pela PrP^C.

Embora nossos dados experimentais com cálcio indicassem que as culturas primárias de cardiomiócitos provenientes de animais tipo selvagem (*ZPrnp*^{+/+}) estivessem viáveis e fisiologicamente ativas, não era possível prosseguirmos com os experimentos, pois não tínhamos células deficientes de PrP^C para a comparação funcional.

Após pesquisa na literatura, encontramos uma linhagem celular de cardiomiócitos de rato imortalizada, a H9c2. Vários trabalhos já haviam sido descritos com esta linhagem e achamos então que seria uma boa abordagem experimental, já que não havia nenhuma linhagem de cardiomiócitos de camundongo disponível comercialmente. Estabelecemos a tolerância de células H9c2 ao antibiótico G_{418} que pretendíamos usar em nossas transfecções celulares, bem como uma curva dose-resposta de doxorubicina e iniciamos a transfecção nesta linhagem celular.

Embora a eficiência de transfecção fosse baixa (cerca de 20% somente), ainda assim tentamos separar as células transfectadas com os diversos construtos de EGFP-PrP^C tanto por clonagem seriada quanto por *cell sorting*. Como a quantidade e a qualidade das células transfectadas não era muito grande, estas não permaneciam fluorescentes por muito tempo, tornando inviável seu uso para qualquer tipo de experimento funcional quanto à presença de PrP^C. Uma das possibilidades aventadas é que a expressão constitutiva de EGFP seja tóxica para este tipo celular. Uma outra justificativa seria o fato de que este tipo celular requer muitos contatos célula-célula para crescer em cultura e, ao ser feito o *cell sorting*, a quantidade de células restantes era tão pouca, que tornava inviável o crescimento da cultura.

Sendo assim, a linhagem celular HEK293, de origem humana, foi nossa melhor escolha, já que apresenta níveis de PrP^C endógena baixos e é um tipo celular que apresenta uma eficiência de transfecção bastante alta. Com esta linhagem celular conseguimos uma eficiência de transfecção

superior a 50% em todos os construtos EGFP-PrP^C deste estudo e clones celulares foram isolados por *cell sorting* seriado. Infelizmente, não houve tempo para finalizar este estudo. Entretanto, estes clones celulares serão uma excelente ferramenta para a continuação deste estudo pelo nosso grupo.

Nos modelos animais (*ZPrnp*^{0/0}, *ZPrnp*^{+/+} e Tg20) (BÜELER et al. 1992) conseguimos verificar que os camundongos tratados com as injeções intraperitoneais de doxorrubicina apresentaram toxicidade dose-dependente, onde a PrP^C parece participar da proteção contra os efeitos tóxicos desta droga. Verificamos também que outra linhagem de camundongos tipo selvagem, nocaute e homozigoto para PrP^C (*EPrnp*^{+/-}, *EPrnp*^{-/-} e *EPrnp*^{+/+}) (MANSON et al. 1994) também apresentou sensibilidade à doxorrubicina dose-dependente, porém estas linhagens são mais sensíveis do que o primeiro grupo de animais. Esses animais não apresentam expressão de PrP^C, nem mesmo da proteína truncada. Essa maior sensibilidade provavelmente ocorre devido ao seu *background* genético (C57/Bl10x129Sv para os *ZPrnp*^{0/0}, *ZPrnp*^{+/+} e Tg20 e C57/Bl10 para os *EPrnp*^{+/-}, *EPrnp*^{-/-} e *EPrnp*^{+/+}). Desta forma, acreditamos que os camundongos de *background* C57/Bl10 são mais sensíveis a doxorrubicina, o que impossibilitou a visualização de diferenças entre animais *EPrnp*^{+/-}, *EPrnp*^{-/-} e *EPrnp*^{+/+} quando a doxorrubicina foi usada nas doses de 15 e 10 mg/kg.

Para que seja possível uma melhor visualização da diferença de sensibilidade entre essas duas cepas de camundongos, será necessária

uma diminuição da dose administrada de doxorrubicina nos animais $EPrnp^{+/-}$, $EPrnp^{-/-}$ e $EPrnp^{+/+}$.

Tentamos fazer uma correlação entre a toxicidade à doxorrubicina e a morte de cardiomiócitos nos animais $ZPrnp^{0/0}$, $ZPrnp^{+/+}$ e Tg20. Não observamos diferenças entre os animais $ZPrnp^{0/0}$ e $ZPrnp^{+/+}$, entretanto, os animais Tg20 apresentam uma aparente resistência à apoptose por doxorrubicina quando comparados com os animais $ZPrnp^{0/0}$ e $ZPrnp^{+/+}$. Estes dados são preliminares, mas devem ser continuados dentro do grupo.

Pouca atenção tem sido dada à apoptose mediada pelo retículo endoplasmático (RE). O retículo sarcoplasmático (SR), que é uma forma especializada do RE, mantém os níveis de cálcio nos cardiomiócitos para a correta contratibilidade. Sabe-se que um aumento no cálcio intracelular aumenta significativamente a susceptibilidade à apoptose via ativação da caspase 12, localizada no lado citoplasmático do SR (NAKAGAWA et al. 2000; NAKAGAWA e YUAN 2000). Além disso, o estresse oxidativo agudo e crônico causado pela doxorrubicina *in vivo* pode induzir a apoptose via caspase 12 do SR, uma possibilidade que ainda não foi investigada.

Similaridades entre o domínio homólogo da proteína Bcl-2 (BH2) e os octapeptídeos repetidos sugerem que PrP^C tem um importante papel na sobrevivência ou na morte celular. O domínio BH2 já foi visto como mediador da interação entre as proteínas Bcl-2 e Bax, e também é o responsável pela proteção do Bcl-2 contra a morte celular mediada por Bax. Além disso, o domínio carboxi-terminal da proteína Bcl-2 interage com PrP^C em sistemas híbridos de leveduras, como visto por KURSCHNER e MORGAN (1995 e

1996). Sendo assim, é possível que PrP^C atue como membro da família Bcl-2 (ZOMOSA-SIGNORET et al. 2008).

Os resultados da análise da ativação de caspase em nossos modelos animais tratados com doxorrubicina (*ZPrnp*^{0/0}, *ZPrnp*^{+/+} e Tg20) não foram conclusivos. Isso ocorreu em função da diferença entre os níveis basais de caspase 12 ativada nos 3 grupos de animais. Interessantemente os animais *ZPrnp*^{0/0} são aqueles que apresentam valores basais maiores de caspase 12 ativada quando comparados aos camundongos *ZPrnp*^{+/+} e Tg20. Este fato pode ser um dos responsáveis pela menor resistência desta linhagem ao tratamento com a doxorrubicina, pois a ativação da caspase 12 pode levar a um aumento da morte celular por apoptose.

Dados da literatura demonstram que uma linhagem de câncer gástrico resistente à doxorrubicina apresenta níveis mais elevados de PrP^C do que células não resistentes (DU et al. 2005), e corroboram a significância do presente estudo no que tange à possível proteção da PrP^C contra o estresse oxidativo causado pela doxorrubicina. Sendo o coração um órgão muito afetado em tratamentos quimioterápicos com uso de antracíclicos, num futuro próximo será possível a individualização do tratamento oncológico, com a utilização de ferramentas de mapeamento genético para minimizar os efeitos colaterais das drogas e para otimizar o efeito destas drogas nos tratamentos a serem feitos.

Desta forma, acreditamos que os resultados apresentados apontam para um possível papel protetor de PrP^C, notadamente no coração, atuando como protetor antioxidante. Este dado além de corroborar com a literatura

acrescenta um resultado inédito por avaliar o tecido cardíaco, nunca antes avaliado para estabelecer funções de PrP^C. Portanto, este trabalho agrega à literatura mais evidências da relevância biológica de PrP^C.

6 CONCLUSÕES

- A deleção de um octapeptídeo repetido associada com a homozigose do aminoácido metionina no códon 129 (M129Mdel) parece estar relacionada à uma maior susceptibilidade dos indivíduos submetidos à quimioterapia com o antracíclico Doxorubicina a desenvolverem problemas cardíacos, notadamente alterações na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE);
- Foram construídas ferramentas importantes para trabalhos futuros: células HEK293 transfectadas com construtos pEGFP-PrP^C com polimorfismos na região de octapeptídeos repetidos e no códon 129 para posterior investigação das funções fisiológicas de PrP^C;
- Animais nocautes para PrP^C são mais sensíveis ao tratamento com doxorubicina do que os animais tipo selvagem para a proteína;
- Animais que têm expressão aumentada de PrP^C são mais resistentes ao tratamento com doxorubicina do que os animais tipo selvagem;
- A sensibilidade ao tratamento com a doxorubicina é dose dependente nos animais deste estudo;
- Experimentos preliminares demonstraram que animais que têm expressão aumentada da proteína PrP^C possuem níveis de caspase 12 ativada basais e após o tratamento com doxorubicina, mais baixos do que os animais nocautes para a proteína, o que pode explicar sua maior resistênica ao tratamento quimioterápico.

7 PERSPECTIVAS

- Aumentar a quantidade de pacientes do estudo, para que possa ser verificada a tendência à alterações na FEVE em pacientes tratados com doxorubicina e com o polimorfismo M129Mdel;
- Aumentar a quantidade de animais $EPrnp^{+/-}$, $EPrnp^{-/-}$ e $EPrnp^{+/+}$ tratados com doses mais baixas do que 10mg/kg de doxorubicina, para verificar em qual faixa de dose já é possível a verificação de diferenças quanto à toxicidade causada pela administração de doxorubicina intraperitoneal;
- Dar continuidade ao estudo com células HEK293 transfectadas com os construtos deste estudo, principalmente verificando a toxicidade à Doxorubicina em diferentes doses e correlacioná-la aos polimorfismos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. **Cell** 2004; 116:313-27.

Aguzzi A. Pathogenesis of spongiform encephalopathies: an update. **Int Arch Allergy Immunol** 1996; 110:99-106.

Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, et al. Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. **Lancet** 1999; 353:1673-4.

Arcamone F, Franceschi G, Penco S, Selva A. Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic. **Tetrahedron Lett** 1969; 13:1007-10.

Basler K, Oesch B, Scott M, et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell** 1986; 46:417-28.

Bennion BJ, Daggett V. Protein conformation and diagnostic tests: the prion protein. **Clin Chem** 2002; 48:2105-14.

Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. **Biochemistry** 1984; 23:5898-906.

Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated Apoptosis. **J Biol Chem** 2001; 276:39145-49.

Brown DR, Qin K, Herms JW, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature** 1997a; 390:684-7.

Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells. **Int J Dev Neurosci** 1997b; 15:961-72.

Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. **Exp Neurol** 1997c; 146:104-12.

Brown DR, Besinger A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. **Biochem J** 1998; 334:423-9.

Brown DR, Schmidt B, Groschup MH, Kretzschmar HA. Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. **Eur J Cell Biol** 1998; 75:29-37.

Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. **Biochem J** 1999; 344:1-5.

Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. **Trends Neurosci** 2001; 24:85-90.

Büeler H, Fischer M, Lang Y, et al. Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** 1992; 356:577-82.

Butler D. Did UK 'dump' contaminated feed after ban? **Nature** 1996; 381:544-5.

Calzolari L, Lysek DA, Pérez DR, Güntert P, Wüthrich K. Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:651-5.

Castro RMRPS, Landemberger MC, Walz R, et al. High capacity and low cost detection of prion protein gene 4 variant alleles by denaturing HPLC. **J Neurosci Methods** 2004; 139:263-9.

Caughey B, Race R, Chesebro B. Comparative sequence analysis, in vitro expression and biosynthesis of mouse PrP. **Prog Clin Biol Res** 1989; 317:619-36.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J** 2002; 21:3317-26.

Coitinho AS, Freitas AR, Lopes MH, et al. The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. **Eur J Neurosci** 2006; 24:3255-64.

Coitinho AS, Lopes MH, Hajj GN, et al. Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. **Neurobiol Dis** 2007; 26:282-90.

De Jong J, Guérard WS, Schoofs PR, Bast A, van der Vijgh WJF. Simple and sensitive quantification of anthracyclines in mouse atrial tissue using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **J Chromatogr B: Biomed Appl** 1991; 570:209-16.

Del Bo R, Comi GP, Giorda R, et al. The 129 codon polymorphism of the prion protein gene influences earlier cognitive performance in Down syndrome subjects. **J Neurol** 2003; 250:688-92.

Del Bo R, Scarlato M, Ghezzi S, et al. Is M129V of PRNP gene associated with Alzheimer's disease? a case-control study and a meta-analysis. **Neurobiol Aging** 2006; 27:770-1.

Dell'Aqua G, Polishchuck R, Fallon JT, Gordon JW. Cardiac resistance to adriamycin in transgenic mice expressing a rat alpha-cardiac myosin heavy chain/human multiple drug resistance 1 fusion gene. **Hum Gene Ther** 1999; 10:1269-79.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J Hypertens** 2000; 18:655-73.

Di Marco A, Gaetani M, Scarpinato B. Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. **Cancer Chemother Rep** 1969; 53:33-7.

Doh-ura K, Kitamoto T, Sakaki Y, Tateishi J. CJD discrepancy. **Nature** 1991; 353:801-2.

Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. Pro----leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. **Biochem Biophys Res Commun** 1989; 163:974-9.

Du J, Pan Y, Shi Y, et al. Overexpression and significance of prion protein in gastric cancer and multidrug-resistant gastric carcinoma cell line SGC7901/ADR. **Int J Cancer** 2005; 113:213-20.

Ellis V, Daniels M, Misra R, Brown DR. Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. **Biochemistry** 2002; 41:6891-6.

Ewer MS, Martin FJ, Henderson C, Shapiro CL, Benjamin RS, Gabizon AA. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. **Semin Oncol** 2004; 31(6 Suppl 13):161-81.

Fornari FA Jr, Jarvis WD, Grant S, Orr MS, et al. Induction of differentiation and growth arrest associated with nascent (nonoligosomal) DNA fragmentation and reduced c-myc expression in MCF-7 human breast tumor cells after continuous exposure to a sublethal concentration of doxorubicin. **Cell Growth Differ** 1994; 5:723-33.

Gacia M, Safranow K, Styczyńska M, et al. Prion protein gene M129 allele is a risk factor for Alzheimer's disease. **J Neural Transm** 2006; 113:1747-51.

Gharib MI, Burnett AK. Chemorotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. **Eur J Heart Fail** 2002; 4:235-42.

Goldfarb LG, Brown P, Little BW, et al. A new (two-repeat) octapeptide coding insert mutation in Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurology** 1993; 43:2392-4.

Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt–Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. **Science** 1992; 258:806-8.

Gossrau G, Herting B, Möckel S, et al. Analysis of the polymorphic prion protein gene codon 129 in idiopathic Parkinson's disease. **J Neural Transm** 2006; 113:331-7.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Lett** 2000; 482:257-60.

Grubenbecher S, Stüve O, Hefter H, Korth C. Prion protein gene codon 129 modulates clinical course of neurological Wilson disease. **Neuroreport** 2006; 17:549-52.

Hajj GN, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. **J Cell Sci** 2007; 120:1915-26.

Hall DA, Leehey MA, Filley CM, et al. PRNP H187R mutation associated with neuropsychiatric disorders in childhood and dementia. **Neurology** 2005; 64:1304-6.

Halliwel B, Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD. A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:7664-8.

Harris DA. Cellular biology of prion diseases. **Clin Microbiol Rev** 1999; 12:429-44.

Herman EH, Ferrans VJ. Pretreatment with ICRF-187 provides long-lasting protection against chronic daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. **Cancer Chemother Pharmacol** 1986; 16:102-6.

Hetz C, Maundrell K, Soto C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? **Trends Mol Med** 2003; 9:237-43.

Hornemann S, Schorn C, Wüthrich K. NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. **EMBO Rep** 2004; 5:1159-64.

Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. **Biochem Biophys Res Commun** 1995a; 214:993-9.

Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. **Biochem Biophys Res Commun** 1995b; 207:621-9.

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. **Nature** 1989; 338:342-5.

Huber CG, Oefner PJ, Bonn GK. Rapid and accurate sizing of DNA fragments by ion-pair chromatography on alkylated nonporous poly styrene-divinylbenzene particles. **Annalytical Chem** 1995; 67:578-85.

Jackson GS, Collinge J. The molecular pathology of CJD: old and new variants. **Mol Pathol** 2001; 54:393-9.

Jensen BV, Skovsgaard T, Nielsen SL. Functional monitoring of anthracycline cardiotoxicity: a prospective, blinded, long-term observational study of outcome in 120 patients. **Ann Oncol** 2002; 13:699-709.

Julicher RH, Sterrenberg L, Bast A, Riksen RO, Koomen JM, Noordhoek J. The role of lipid peroxidation in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity as studied in rat isolated heart. **J Pharm Pharmacol** 1986; 38:277-82.

Julicher RH, van der Laarse A, Sterrenberg L, et al. The involvement of an oxidative mechanism in the adriamycin induced toxicity in neonatal rat heart cell culture. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol** 1985; 47:35-47.

Kachel N, Kremer W, Zahn R, Kalbitzer HR. Observation of intermediate states of the human prion protein by high pressure NMR spectroscopy. **BMC Struct Biol** 2006; 6:16.

Kapusta L, Thijssen JM, Groot-Loonen J, Antonius T, Mulder J, Daniëls O. Tissue Doppler imaging in detection of myocardial dysfunction in survivors of childhood cancer treated with anthracyclines. **Ultrasound Med Biol** 2000; 26:1099-108.

Keshet GI, Bar-Peled O, Yaffe D, Nudel U, Gabizon R. The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. **J Neurochem** 2000; 75:1889-97.

Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML Jr, et al. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. **Free Rad Biol Med** 2001; 30:1137-44.

Korantzopoulos P, Galaris D, Papaioannides D, Kokkoris S. C-reactive protein and oxidative stress in atrial fibrillation. **Int J Cardiol** 2003; 88:103-4.

Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Dearmond SJ. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. **DNA** 1986; 5:315-24.

Kurschner C, Morgan JI. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. **Brain Res Mol Brain Res** 1995; 30:165-8.

Kurschner C, Morgan JI. Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. **Brain Res Mol Brain Res** 1996; 37:249-58.

Landemberger MC. **Papel de prion celular em modelos experimentais de convulsão e detecção de polimorfismos do gene PRNP em pacientes portadores de epilepsias**. São Paulo, 2006 [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente]

Leandro J, Dyck J, Poppe D, et al. Cardiac dysfunction late after cardiotoxic therapy for childhood cancer. **Am J Cardiol** 1994; 74:1152-6.

Lee KS, Magalhaes AC, Zanata SM, Brentani RR, Prado MA. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion in mutants in living cells. **J Neurochem** 2001; 79:79-87.

Liao YC, Tokes Z, Lim E, et al. Cloning of rat "prion-related protein" cDNA. **Lab Invest** 1987; 57:370-4.

Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. **Chem Res Toxicol** 2000; 13:414-20.

Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. **Physiol Rev** 2008; 88:673-728.

Locht C, Chesebro B, Race R, Keith JM. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986; 83:6372-6.

Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci** 2005; 25:11330-9.

López Garcia F, Zahn R, Riek R, Wüthrich K. NMR structure of the bovine prion protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:8334-9.

Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, et al. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:640-5.

Ma J, Lindquist S. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:14955-60.

Mallucci G, Collinge J. Update on Creutzfeldt-Jakob disease. **Curr Opin Neurol** 2004; 17:641-7.

Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Mol Neurobiol** 1994; 8:121-7.

Martins VR, Brentani RR. The biology of the cellular prion protein. **Neurochem Int** 2002; 41:353-5.

Martins VR, Linden R, Prado MAM, et al. Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS Letters** 2002; 512:25-8.

Martins VR. A receptor for infectious and cellular prion protein. **Braz J Med Biol Res** 1999; 32:853-9.

Mead S, Stumpf MPH, Whitfield J, et al. Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. **Science** 2003; 300:640-3.

Miele G, Jeffrey M, Turnbull D, Mansons J, Clinton M. Ablation of cellular prion protein expression affects mitochondrial numbers and morphology. **Biochem Biophys Res Commun** 2002; 291:372-7.

Momparler RL, Karon M, Siegel SE, Avila F. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. **Cancer Res** 1976; 36:2891-5.

Montagna P, Cortelli P, Avoni P, et al. Clinical features of fatal familial insomnia: phenotypic variability in relation to a polymorphism at codon 129 of the prion protein gene. **Brain Pathol** 1998; 8:515-20.

Mordente A, Mcucci E, Martorana GE, Giardina B, Minotti G. Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. **IUMB Life** 2001; 52:83-8.

Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. **J Cell Biol** 2000; 150, 887-94.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature** 2000; 403:98-103.

Olson LE, Bedja D, Alvey SJ, Cardounel AJ, Gabrielson KL, Reeves RH. Protection from doxorubicin-induced toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. **Cancer Res** 2003; 63:6602-6.

Pacher P, Liaudet L, Bai P, et al. Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. **Circulation** 2003; 107:896-904.

Pan Km, Baldwin M, Nguyen J, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheet features in the formation of scrapie prion proteins. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:10962-6.

Papadopoulou LC, Theophilidis G, Thomopoulos GN, Tsiftoglou AS. Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome c oxidase II gene expression. **Biochem Pharmacol** 1999; 57:481-9.

Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Aguzzi A, Hock C, Nitsch RM, de Quervain DJ. The prion gene is associated with human long-term memory. **Hum Mol Genet** 2005; 14:2241-6.

Parchi P, Castellani R, Capellari S, et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **Ann Neurol** 1996; 39:767-78.

Perry RT, Go RC, Harrell LE, Acton RT. SSCP analysis and sequencing of the human prion protein gene (PRNP) detects two different 24 bp deletions in an atypical Alzheimer's disease family. **Am J Med Genet** 1995; 60:12-8.

Petchanikow C, Saborio GP, Anderes L, Frossard MJ, Olmedo MI, Soto C. Biochemical and structural studies of the prion protein polymorphism. **FEBS Lett** 2001; 509:451-6.

Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. **Cell** 1984; 38:127-34.

Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. **Science** 1991; 252:1515-22.

Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. **Science** 1997; 278:245-51.

Prusiner SB. **Prion biology and diseases**. Portland: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

Prusiner SB. The prion diseases. **Brain Pathol** 1998; 8:499-513.

Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, et al. Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. **J Biol Chem** 2003; 278:9064-72.

Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wüthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). **Nature** 1996; 382:180-2.

Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wüthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). **FEBS Lett** 1997; 413:282-8.

Robert J. Long-term and short-term models for studying anthracycline cardiotoxicity and protectors. **Cardiovasc Toxicol** 2007; 7:135-9.

Ross ED, Baxa U, Wickner RB. Scrambled prion domains form prions and amyloid. **Mol Cell Biol** 2004; 24:7206-13.

Rudd PM, Merry AH, Wormald MR, Dwek RA. Glycosylation and prion protein. **Curr Opin Struct Biol** 2002; 12:578-86.

Rujescu D, Hartmann AM, Gonnermann C, Möller HJ, Giegling I. M129V variation in the prion protein may influence cognitive performance. **Mol Psychiatry** 2003; 8:937-41.

Safra T, Muggia F, Jeffers S, et al. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². **Ann Oncol** 2000; 11:1029-33.

Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation** 1978; 58:1072-83.

Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Biol Pharm Bull** 2002; 25:1391-400.

Samaia HB, Brentani RR. Can loss-of-function prion-related diseases exist? **Mol Psychiatry** 1998; 3:196-7.

Seon-Young K, Sang-Jin K, Byoung-Joo K, et al. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. **Exp Mol Med** 2006; 38:535-45.

Shi MM. Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes. **Am J Pharmacogenomics** 2002; 2:197-205.

Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. **N Engl J Med** 1998; 339:900-5.

Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. **Nat Med** 2004; 10 Suppl:S63-7.

Souza EM, Henriques-Pons A, Bailly C, Lansiaux A, Araújo-Jorge TC, Soeiro MNC. In vitro measurement of enzymatic markers as a tool to detect mouse cardiomyocytes injury. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2004; 99:697-701.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. **Cell** 1987; 51:229-40.

Steinherz LJ, Graham T, Hurwitz R, et al. Guidelines for cardiac monitoring of children during and after anthracycline therapy: report of the Cardiology Committee of the Childrens Cancer Study Group. **Pediatrics** 1992; 89:942-9.

Tajik AJ, Seward JB, Hagler DJ, Mair DD, Lie JT. Two-dimensional real-time ultrasonic imaging of the heart and great vessels. Technique, image orientation, structure identification, and validation. **Mayo Clin Proc** 1978; 53:271-303.

Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. **Cancer** 1967; 20:333-53.

Tsai MT, Su YC, Chen YH, Chen CH. Lack of evidence to support the association of the human prion gene with schizophrenia. **Mol Psychiatry** 2001; 6:74-8.

van Acker FA, Hulshof JW, Haenen GR, Menge WM, van der Vijgh WJ, Bast A. New synthetic flavonoids as potent protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Free Radic Biol Med** 2001; 31:31-7.

Venditti P, Balestieri M, de Leo T, di Meo S. Free radical involvement in doxorubicin-induced electrophysiological alterations in rat papillary muscle fibers. **Cardiovasc Res** 1998; 38:695-702.

Villani F, Galimberti M, Monti E. Effect of glutathione and N-acetylcysteine on in vitro and in vivo cardiac toxicity of doxorubicin. **Free Radic Res Commun** 1990; 11:145-51.

Wadsworth JD, Asante EA, Desbruslais M, et al. Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. **Science** 2004; 306:1793-6.

Weiss RB. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? **Semin Oncol** 1992; 19:670-86.

Westaway D, Prusiner SB. Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein. **Nucleic Acids Res** 1986; 14:2035-44.

Will RG, Zeidler M, Stewart GE, et al. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. **Ann Neurol** 2000; 47:575-82.

Wong BS, Clive C, Haswell SJ, Jones IM, Brown DR. Copper has differential effect on prion protein with polymorphism of position 129. **BBRC** 2000; 269:726-31.

Yin X, Wu H, Chen Y, Kang YJ. Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. **Biochem Pharmacol** 1998; 56:87-93.

Zahn R, Liu A, Lühns T, et al. NMR solution structure of the human prion protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:145-50.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J** 2002; 21:3307-16.

Zomosa-Signoret V, Arnaud JD, Fontes P, Alvarez-Martinez MT, Liautard JP. Physiological role of the cellular prion protein. **Vet Res** 2008; 39(4):9