BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo 20149
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

OK LILACS

PAPEL DE NF- κ B NO CONTROLE DA PROLIFERAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO CELULAR

LÚCIA HELENA SILVA DE CARVALHO

TESE DE DOUTORAMENTO APRESENTADA
AO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Orientadora: Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR

SÃO PAULO • 2002

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004875

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Carvalho, Lúcia Helena Silva de
C331p Papel de NF- κ B no controle da proliferação e transformação
celular / Lúcia Helena Silva de Carvalho. -- São Paulo,
2002.

104p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Sogayar, Mari Cleide

1. Biologia molecular 2. Biologia celular I. T. II.
Sogayar, Mari Cleide, orientador.

574.88 CDD

“Papel de NF- κ B no Controle da Proliferação e Transformação Celular”

LÚCIA HELENA SILVA DE CARVALHO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. SUELY LOPES GOMES
IQ – USP

Prof. Dr. JOSÉ ERNESTO BELIZÁRIO
ICB – USP

Prof. Dr. SANG WON HAN
UNIFESP

Prof. Dr. LUIZ FERNANDO LIMA REIS
LUDWIG

SÃO PAULO
27 DE MAIO 2002

*À minha mãe, Ivete, e meus irmãos, Andrea, Adriana e
André Luiz, amores eternos...*

À minha orientadora, Mari, otimista sempre!

"com bruxas ou sem elas, acabava de varrer da
minha viagem a pior espécie de poeira que uma
vassoura pode afastar: a de nunca começar."

Amyr Klink

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra. Mari C. Sogayar, pela oportunidade, orientação e incentivo.

Ao Marcos A. A. Demasi, pela imprescindível ajuda com os experimentos de clonagem, revisão desta tese, discussões e amizade.

Ao Christian Colin, pela revisão desta tese, críticas, opiniões e amizade, tão dramáticas quanto ele mesmo!

À Silvy Stuchi Maria-Engler, pela ajuda com os experimentos de apoptose, pela força e amizade.

Aos amigos e colegas do laboratório, pela orientação não-oficial, cumplicidade e diversão.

À Zizi de Mendonça, Sandra Regina de Souza, Débora Cristina J. Costa, Irenice Cairo da Silva e Helena M. F. Ribeiro, pelo excelente apoio técnico e pelo carinho.

À toda equipe da Secretaria de Pós-Graduação e da Secretaria do Departamento de Bioquímica, em particular, à Cibele, ao Milton, à Inês, ao Fábio e à Simone.

Aos laboratórios do Dr. Hugo A. Armelin e Dr. Paulo Lee Ho, pela troca de informações.

À Regina Maki Sasahara, Beatrice A. Lépine, Marina Bongioanni e Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella, que não estão mais por perto, mas sempre presentes.

Ao grande Mauro Granjeiro, enfim, pelo seu enorme coração e otimismo.

Aos meus queridos amigos, Zizi, Renato, Junior e Luciano, pelo carinho e por me ouvirem com o coração.

Em especial, ao Antero Ferreira de Almeida Macedo, pela revisão desta tese e, mais que isto, por seu sorriso, seu olhar, seu amor e pelas aventuras...

"quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só."

Amyr Klink

APOIO FINANCEIRO

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

PADCT-SBIO II - Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Subprograma de Biotecnologia.

ICGEB - International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology.

CABBIO - Centro Argentino-Brasileiro de Biotecnologia.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

FBB - Fundação Banco do Brasil.

PRP-USP - Pró-Reitoria de Pesquisa - USP.

Índice

Resumo	i
Summary	ii
Abreviaturas	iii
1. Introdução	11
1.1. Hormônios glicocorticóides	13
1.2. O fator de transcrição GR	14
1.3. NF- κ B: um mediador induzível do controle da expressão gênica	19
1.3.1. Atividade NF- κ B	22
1.3.2. NF- κ B e oncogênese	25
1.3.3. NF- κ B e GR	27
1.4. O complexo de transcrição AP-1	29
1.5. Modelo celular	31
1.6. Proposta	33
1.7. Objetivos específicos	35
2. Material e Métodos	36
2.1. Soluções e meios de cultura para células de mamífero	36
2.2. Linhagens celulares	36
2.3. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares	36
2.4. Congelamento e descongelamento das linhagens celulares	37
2.4.1. Congelamento	37
2.4.2. Descongelamento	37
2.5. Meio de cultura para bactérias	38
2.6. Plasmídeos	38
2.7. Preparação de bactérias competentes por tratamento com CaCl_2	39
2.8. Preparação de bactérias eletrocompetentes	40
2.9. Transformação de bactérias <i>E. coli</i> com DNA plasmideal por eletroporação	40
2.10. Preparação de DNA plasmideal de p65# e pOPI3-CAT a partir de bactérias transformadas	41
2.11. Purificação dos vetores e insertos a partir do gel de agarose	41
2.12. Sub-clonagem do cDNA codificante da proteína RelA no vetor pOPI3	42
2.13. PCR do produto de ligação	43
2.14. Análise das colônias recombinantes	44
2.14.1. PCR de colônia	44
2.14.2. Digestão com enzima de restrição	45
2.14.3. Seqüenciamento	45
2.15. Transfecção do plasmídeo pOPI3-RelA em células ST1 mediada por lipossomos e isolamento de clones transfectantes	45
2.16. Extração de proteínas celulares	46
2.17. Western blotting	47
2.18. Curvas de crescimento	47
2.19. Crescimento em suspensão de agarose	48
2.20. Extração de proteínas nucleares	48
2.21. Ensaio de mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA)	49
2.22. Ensaio de atividade mitogênica	50

2.23. Fixação e coloração celular com azul de toluidina.....	51
2.24. Soluções.....	51
3. Resultados	53
3.1. Análise do envolvimento da proteína RelA na proliferação de células ST1	53
3.1.1. Sub-clonagem do cDNA codificante da proteína RelA no vetor de expressão em mamífero pOPI3.....	53
3.1.2. Estabelecimento e caracterização de bactérias recombinantes contendo a construção pOPI3-RelA.....	56
3.1.2.1. Transformação de bactérias com a construção pOPI3-RelA.....	56
3.1.2.2. Análise das colônias recombinantes por PCR	56
3.1.2.3. Análise da orientação do inserto de cDNA RelA no vetor pOPI3.....	58
3.1.2.3.1. por digestão com enzima de restrição	58
3.1.2.3.2. por seqüenciamento.....	59
3.1.3. Estabelecimento e caracterização de clones celulares que expressam a construção pOPI3-RelA.....	63
3.1.3.1. Transfecção, mediada por lipossomos, do plasmídeo pOPI3-RelA em células ST1	63
3.1.3.2. Análise, por PCR, dos DNAs genômicos dos clones celulares	63
3.1.4. Análise da expressão da proteína RelA nos clones isolados através de ensaios de Western blot	64
3.1.5. Análise da inibição da expressão da proteína RelA na proliferação de células ST1.....	70
3.1.5.1. Análise da curva de crescimento dos clones celulares	70
3.1.5.2. Análise dos clones celulares quanto à eficiência de formação de colônias em suspensão de agarose.....	70
3.2. Análise da atividade do complexo de transcrição AP-1 em células ST1 de glioma de rato sob ação de hidrocortisona	71
3.3. Estudo da ação de curcumina na atividade NF- κ B apresentada pelas células ST1 e P7	73
3.4. Estudo do efeito de agentes inibidores de NF- κ B na proliferação celular	76
3.5. Estudo do efeito de TNF- α no crescimento das células ST1.....	78
3.6. Análise morfológica das células ST1 e P7 na presença de hidrocortisona e TNF- α para avaliação de apoptose.....	79
4. Discussão.....	82
4.1. Análise da proteína RelA na proliferação de células ST1.....	84
4.2. Análise da atividade do complexo de transcrição AP-1 em células ST1 de glioma de rato sob ação de hidrocortisona	88
4.3. Estudo do efeito de TNF- α no crescimento das células ST1.....	88
4.4. Estudo do efeito do agente inibidor de NF- κ B, curcumina, no crescimento celular e na atividade NF- κ B apresentada pelas células ST1 e P7	89
4.5. Análise morfológica das células ST1 e P7 na presença de hidrocortisona e TNF- α para avaliação de apoptose.....	90
5. Conclusões	92
6. Referências Bibliográficas	93
7. Curriculum vitae	104

Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1.	Domínios funcionais do receptor de glicocorticóide humano	15
Figura 2.	Estrutura das proteínas da família Rel/NF- κ B	21
Figura 3.	Modelo da regulação das atividades NF- κ B e I κ B	24
Figura 4.	Efeito de hidrocortisona (Hy) sobre: (A) morfologia celular e (B) atividade de ligação ao DNA do fator de transcrição NF- κ B, em células ST1 de glioma de rato.....	34
Figura 5.	Análise do vetor pOPI3 desfosforilado e do fragmento correspondente ao cDNA de RelA.....	54
Figura 6.	Análise da reação de ligação pOPI3-RelA, por PCR.....	55
Figura 7.	Análise das colônias recombinantes quanto a orientação do cDNA de RelA no vetor pOPI3, por PCR.....	57
Figura 8.	Análise da orientação do inserto RelA no vetor pOPI3 por digestão com a enzima de restrição <i>Bam</i> H I	59
Figura 9.	Análise da orientação do inserto de cDNA RelA no vetor pOPI3 através de seqüenciamento	60
Figura 10.	Alinhamento múltiplo contra o banco não-redundante do GeneBank (BlastN) da seqüência do cDNA do gene <i>rela</i>	62
Figura 11.	Análise por PCR dos DNAs genômicos dos clones celulares, transfectados com o vetor pOPI3-RelA(as) ou o vetor parental pOPI3CAT	64
Figura 12.	Análise da expressão da proteína RelA por Western blotting em células ST1 transfectadas com a construção pOPI3-RelA(as)	66
Figura 13.	Análise da expressão da proteína RelA por Western blotting em células ST1 transfectadas com o vetor pOPI3CAT	67
Figura 14.	Curva de crescimento dos clones celulares obtidos após transfecção de células ST1 com o vetor pOPI3-RelA(as).....	68
Figura 15.	Curva de crescimento dos clones celulares obtidos após transfecção de células ST1 com o vetor pOPI3CAT	69
Figura 16.	Análise da proliferação dos clones transfectados com o vetor pOPI3-RelA(as) ou o vetor vazio por ensaio de crescimento em suspensão de agarose.....	70
Figura 17.	Repressão da atividade AP-1 mediada por Hy na linhagem celular ST1.....	72
Figura 18.	Repressão da atividade NF- κ B mediada por Hy e CCM na linhagem celular ST1	74
Figura 19.	Análise do efeito de Hy e CCM sobre a atividade NF- κ B na linhagem celular P7 por EMSA	75
Figura 20.	Análise do efeito de Hy, TNF- α e CCM na proliferação de células ST1	77
Figura 21.	Análise do efeito de CCM na proliferação de células P7.....	77
Figura 22.	Células ST1 na presença de Hy e TNF- α	81
Figura 23.	Células P7 na presença de Hy e TNF- α	82
Tabela 1.	Fatores de transcrição que interagem com GR.....	18
Tabela 2.	Proteínas das famílias Rel/NF- κ B e I κ B	20
Tabela 3.	Efeito de Hy, TNF- α e CCM na proliferação de células ST1	78

Resumo

Hormônios glicocorticóides (GCs), através do receptor de glicocorticóide (GR), bloqueiam o processo de inflamação, suprimem a ativação do sistema imune e atuam como agentes inibidores do crescimento, *in vitro* e *in vivo*. GR interage com outros fatores de transcrição, como AP-1 e NF- κ B.

Para estudar o mecanismo de ação de GCs, utilizamos o modelo celular ST1, variante da linhagem C6 de glioma de rato, que é hiper-sensível a GCs. O tratamento hormonal induz completa reversão fenotípica tumoral-normal, bem como inibição dos níveis basal e induzido por TNF- α da atividade de ligação a DNA do fator de transcrição NF- κ B.

O papel de NF- κ B na reversão fenotípica de células ST1, induzida por GCs, foi analisado por: (1) bloqueio da expressão da subunidade RelA de NF- κ B através de construções "antisense"; (2) inibição da atividade NF- κ B com o anti-oxidante curcumina.

Após transfecção estável, foram isolados 12 clones transfectados com o vetor pOPI3-RelA(as), expressando o mRNA de RelA na orientação reversa, e 9 clones transfectados com o vetor parental pOPI3CAT. A proliferação destes clones foi analisada através de curvas de crescimento e eficiência de plaqueamento em suspensão de agarose. Não foi possível correlacionar a expressão de RelA com a proliferação celular, pois tanto os clones ST1-RelA(as) como alguns clones ST1-pOPI3CAT apresentaram menor taxa de crescimento e eficiência de plaqueamento em agarose, quando comparados com a célula parental ST1.

Curcumina foi capaz de inibir a proliferação e a atividade de ligação a DNA do fator de transcrição NF- κ B, indicando que este fator é importante no controle da proliferação das células ST1.

A atividade de AP-1 também é modulada negativamente por GC, sugerindo que a inibição da proliferação mediada por GC em células ST1 se dá através da inibição conjunta de NF- κ B e AP-1.

Summary

Glucocorticoid hormones (GC) bind to their receptor (GR), which acts as a transcription factor in the nucleus, blocking the inflammation process, suppressing activation of the immune system and acting as a growth-repressor and as anti-tumor agent both *in vivo* and *in vitro*. GR interacts with other transcription factors, such as AP-1 and NF- κ B.

To study the mechanism of action of GC, we have been using the ST1 cell model, a variant of the C6 glioma cell line, which is hyper-responsive to GC. Hormonal treatment leads ST1 cells to a dramatic tumoral-normal phenotypic reversion. We previously showed that GCs are able to repress both the basal and the TNF- α -induced levels of NF- κ B DNA binding activity in ST1 cells.

The role of NF- κ B in the tumoral-normal phenotypic reversion induced by GC in ST1 cells was analysed by: (1) blocking the RelA subunit of NF- κ B by expression of an antisense construct; (2) inhibition of NF- κ B activity by treatment with curcumin (anti-oxidant).

Upon stable transfection, we isolated 12 clones transfected with pOPI3-RelA(as) vector, which express reverse RelA mRNA, and 9 clones transfected with the empty pOPI3CAT vector. Cell proliferation of isolated clones was evaluated by growth curves and soft-agar assays. It was not possible to correlate RelA expression with cell proliferation since both types of clones (transfected with the pOPI3-RelA vector or with the empty vector) displayed a lower growth rate in monolayer culture, and decreased capacity to form colonies in semi-solid substrate, when compared to the non-transfected parental ST1 cell line.

Curcumin was able to inhibit ST1 cell proliferation, as well NF- κ B DNA-binding, indicating the importance of NF- κ B in ST1 cells' growth control.

AP-1 activity is also downregulated by GC, suggesting that GC-mediated inhibition of cell proliferation in ST1 cells is results from concomitant inhibition of NF- κ B and AP-1.

Abreviaturas

AF-1	Ativador funcional-1
AP-1	Proteína ativadora-1
ATP	Trifosfato de adenosina
CCM	Curcumina
C/EBP	Proteína de ligação ao elemento CCAAT
CIAP	Fosfatase alcalina de intestino de vitela
CMV	Citomegalovírus
CREB	Proteína de ligação ao elemento responsivo a cAMP (CRE)
DBD	Domínio de ligação a DNA
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodinitrilotetracético sal dissódico
EMSA	Ensaio de mobilidade eletroforética retardada em gel
FCS	Soro fetal bovino
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GC	Hormônio glicocorticóide
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos
GR	Receptor de glicocorticóide
GRE	Elemento de resposta a glicocorticóide
gro	Citocina estimulante do crescimento em melanomas
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana-1
HSP	Proteína de choque térmico
HTLV-1	Vírus da leucemia das células T humanas -1
Hy	Hidrocortisona
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina

I κ B	Inibidor kappa B
IKK	I κ B quinase
IL	Interleucina
LDB	Domínio de ligação ao ligante
LTR	"Long Terminal Repeat"
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
M-CSF	Fator estimulante de colônia para macrófagos
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
nGRE	Elemento de resposta negativa a glicocorticóide
NLS	Sequência de localização nuclear
pb	Pares de base
PBSA	Tampão salina fosfato sem cálcio e magnésio
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
RHD	Domínio de homologia a Rel
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sítio κ B	Elemento de resposta a NF- κ B
SP1	Proteína de especificidade 1
SV40	Vírus de Símio 40
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TBP	Proteína de ligação ao elemento TATA
TE	Tampão Tris-EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Luz ultravioleta

1. Introdução

Proliferação e diferenciação celular são dois aspectos fundamentais da existência multicelular. Interligado com esses processos está o fenômeno da proliferação ilimitada, que é a base do estado neoplásico. Boa parte do conhecimento sobre como as células crescem e se dividem vem do estudo de células cultivadas *in vitro*. O tempo requerido para uma célula sofrer um ciclo de divisão *in vitro* varia de uma linhagem para outra, estando, na maioria dos casos, entre 10 e 30h.

O ciclo da divisão celular compreende quatro fases principais: G_1 , S (período de síntese de DNA), G_2 e M (período da mitose). Diferenças na duração do ciclo entre os diferentes tipos celulares ou entre diferentes condições ambientais devem-se, principalmente, à variações no comprimento de G_1 , sendo a duração de S (6 a 8h) + G_2 (2 a 6h) + M (1h) relativamente constante. Além disso, há muita variabilidade entre o comprimento de G_1 entre células individuais de uma mesma população.

A fase S corresponde ao período de replicação do DNA, um processo que depende da atividade de diversos tipos de DNA polimerases, bem como de outras enzimas e fatores. G_1 é o intervalo pós-mitótico, entre M e S, durante o qual as células se preparam para iniciar a síntese de DNA. Este período, que corresponde à fase mais longa do ciclo celular, é caracterizado pela transcrição e tradução de diversos genes, levando à síntese de proteínas necessárias para a síntese de DNA. G_2 é o intervalo pós-síntese de DNA, entre S e M, durante o qual as células preparam-se para a divisão. As células que se encontram em G_2 contêm o dobro da quantidade de DNA, quando comparadas às células em G_1 . Na fase M, período da mitose, é que ocorre a divisão celular propriamente dita, gerando duas células-filhas com conteúdos de DNA iguais aos da célula-mãe. Quando o processo de mitose termina, as células podem permanecer no ciclo proliferativo, retomando a fase G_1 , ou deixá-lo, entrando num estado de quiescência (repouso) de duração indefinida, que convencionou-se chamar de G_0 .

O desenvolvimento de um organismo depende do balanço entre proliferação, diferenciação e morte celular, regido por alterações sucessivas e controladas no programa transcricional celular. Alterações nesta sinalização, que favoreçam a

proliferação, poderão desencadear o processo de tumorigênese^[1,2]. A maioria das células especializadas em um organismo multicelular é capaz de alterar seu padrão de expressão gênica em resposta a sinais extracelulares, como hormônios esteróides e tireoidianos, fatores peptídicos de crescimento e citocinas. Estes estímulos agem em vias de sinalização intracelulares, que regulam a progressão do ciclo celular, principalmente durante a fase G₁ do ciclo. Hormônios glicocorticóides inibem a proliferação e regulam a progressão do ciclo celular em muitos tipos celulares diferentes, sendo a maioria dos seus efeitos caracterizados em células de tumor mamário^[3,4,5], de hepatoma^[6,7], de osteosarcoma^[8] e de linfoma^[9].

Os tumores da neuroglia estão entre os mais freqüentes e fatais cânceres do sistema nervoso central^[10]. Os tumores derivados de astrócitos são classificados, de acordo com o grau de malignidade, em: astrocitoma, astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme. Glioblastoma é o mais comum e maligno tumor de origem astrocítica em humanos adultos, atingindo 50% dos tumores de glia em humanos^[11].

Hormônios glicocorticóides desempenham um importante papel no tratamento de muitos tipos de cânceres^[12,13], incluindo desordens linfoproliferativas^[14,15], câncer de mama^[16], gliomas e glioblastomas^[17]. Apesar da sua importância, o emprego terapêutico de glicocorticóides é empírico e os mecanismos que medeiam seus efeitos benéficos no tratamento do câncer são pouco conhecidos^[18,19].

1.1. Hormônios glicocorticóides

Glicocorticóides (GCs) constituem uma classe de hormônios esteróides, que influenciam uma ampla variedade de processos fisiológicos, tais como metabolismo intermediário (gliconeogênese), homeostase, desenvolvimento, diferenciação e resposta ao estresse, fazendo conexão direta entre sinais extracelulares e a resposta transcricional^[20,21]. Glicocorticóides bloqueiam, ainda, o processo de inflamação, suprimem a ativação do sistema imune e atuam como agentes inibidores do crescimento, *in vitro* e *in vivo*^[8,22].

Estes hormônios são comumente usados em terapêutica, desempenhando um papel essencial em terapia aguda e crônica de diversas doenças imunes, como asma e

artrite reumatóide, sendo usados, também, em quimioterapia de neoplasias linfóides, por causarem apoptose nestas células, e contribuindo, consideravelmente, na prevenção da rejeição após transplante de órgãos^[23]. Diversas linhagens leucêmicas sofrem morte celular em resposta a GC^[24]. Além disso, GCs são indutores de apoptose em timócitos maduros ativados e linfócitos T periféricos^[25]. De fato, a indução de apoptose pode ser um dos mecanismos-chave mediadores dos efeitos terapêuticos de GCs no tratamento de leucemias, linfomas e diversas desordens auto-imunes.

Os hormônios glicocorticóides participam do controle da proliferação celular através da regulação de diversos genes ligados ao crescimento e à diferenciação celular^[26,27,28], tendendo a promover diferenciação e inibir proliferação. Assim, glicocorticóides induzem diferenciação de osteoblastos^[29,30], inibem a proliferação de células epiteliais mamárias^[31,5], fibroblastos^[32] e células de hepatoma^[6,33]. Inibem, também, o crescimento de tumores induzidos por carcinógenos em pulmão^[34] e pele^[35] de camundongo e em cólon de rato^[36], bem como em linfomas^[37] e glioblastomas^[38]. Em contraste, glicocorticóides amplificam a transformação de culturas celulares epiteliais humanas pelo vírus do sarcoma de Kirsten murino^[39], ativam fortemente a transcrição gênica e a produção do vírus do tumor mamário de camundongo^[40] e potencializam o efeito de FGF de estimular a síntese de DNA^[41].

O estudo da ação de GCs forneceu informações importantes sobre os mecanismos utilizados pelos receptores nucleares e outros fatores de transcrição seqüência-específicos que regulam a transcrição gênica. Exemplos bem estudados de proteínas reguladoras da transcrição gênica induzível são os membros da superfamília de receptores de hormônios esteróides e a família AP-1 (Jun/Fos) de fatores de transcrição. Outro fator de transcrição induzível é Rel/NF- κ B, que está envolvido na sinalização nuclear/citoplasmática, controlando a expressão de uma grande variedade de genes e, também, de vírus, como o HIV-1^[42].

1.2. O fator de transcrição GR

O efeito transcricional dos glicocorticóides se processa através do receptor de glicocorticóide (GR), uma proteína intracelular pertencente à superfamília de receptores de hormônios esteróides^[43]. GR foi o primeiro fator de transcrição a ser isolado e estudado em detalhes^[44,45]. Uma característica desses receptores é o fato de serem ativados transitoriamente apenas após a exposição das células aos respectivos hormônios (ligantes).

Na ausência do hormônio, os GRs se encontram no citoplasma na forma inativa, associados a um grande complexo multiprotéico, composto de duas proteínas Hsp90 (Proteína de choque térmico-90), uma Hsp70, uma Hsp56, p23 e eventuais ciclofilinas, o qual mantém os receptores em uma conformação capaz de se ligar ao ligante^[46]. A associação da Hsp90 com o receptor mascara as seqüências de localização nuclear (NLSs), seqüestrando o receptor no citoplasma^[47]. Quando o hormônio se liga ao receptor, ocorre uma mudança conformacional e a interação com Hsp90 e as outras proteínas é desfeita, expondo as NLSs, permitindo assim que o complexo hormônio-receptor, agora na forma ativa, migre para o núcleo e interaja com seqüências específicas no DNA, denominadas GREs (elementos de resposta a glicocorticóides), modulando a transcrição de diferentes genes responsivos a glicocorticóides^[48,49].

Os receptores esteróides são estruturalmente organizados em três principais domínios funcionais: DBD, domínio de ligação ao DNA; LBD, domínio de ligação ao ligante e AF-1/tau 1, ativador funcional-1^[50]. O domínio DBD é o mais conservado entre os membros da família de receptores esteróides, enquanto o LBD é relativamente conservado e o domínio AF-1 é bastante variável.

Figura 1. Domínios funcionais do receptor de glicocorticóide humano. DBD, domínio de ligação ao DNA; LBD, domínio de ligação ao ligante; AF-1, domínio de transativação 1. As linhas sólidas indicam as regiões de GR exibindo diferentes funções. A linha tracejada indica a possível contribuição do LBD na repressão da atividade NF-κB^[51].

O domínio DBD, rico em cisteínas, está localizado na região central da proteína, contém 66-68 aminoácidos e apresenta dois dedos de zinco, sendo que cada átomo de zinco está tetraedricamente coordenado com 4 cisteínas, formando um domínio estrutural único. Este domínio é responsável pela ligação do receptor ao DNA. Uma das funções do DBD é discriminar entre os diferentes elementos responsivos no DNA, determinando, assim, os genes-alvo a serem ativados. Esta função é efetuada por três aminoácidos localizados na porção C-terminal do dedo de zinco N-terminal, conhecidos como P-box. Um segundo sub-domínio, denominado D-box, localizado na região N-terminal do dedo de zinco C-terminal, compreende aminoácidos importantes para homodimerização^[52]. O complexo receptor-DNA foi estruturalmente determinado através de cristalografia de raio-X^[53] e ressonância magnética nuclear^[54].

Na porção C-terminal da proteína encontra-se o domínio multifuncional LBD. Neste domínio estão localizados os sítios de ligação ao hormônio e à proteína Hsp90.

Este domínio é responsável pela homodimerização do receptor e translocação do complexo hormônio-receptor para o núcleo. Além disso, este domínio desempenha funções de transativação, através do sub-domínio AF-2, uma pequena α -hélice anfipática^[55,50].

Por último, o domínio N-terminal AF-1 está relacionado com a modulação da transativação^[56], o qual esconde uma região acídica importante para a transcrição^[57].

O elemento de resposta a glicocorticóide (GRE) é uma seqüência palindrômica parcial com o consenso GGTACAnnnTGTTCT^[58]. A cada metade da palíndrome liga-se um monômero do receptor. A formação de dímeros de GR no GRE é importante, pois apenas esta forma liga-se com uma afinidade suficientemente alta ($K_d = 10^{-9}M$) para induzir a transcrição gênica^[59].

Dependendo do tipo de GRE e do contexto do promotor, a ligação de GR a estes elementos pode resultar em indução ou repressão gênica, por transativação dependente de ligação a DNA ou via interação proteína-proteína^[60]. Em algumas interações com fatores de transcrição, a expressão gênica pode ser controlada por GR independente de ligação a DNA^[61,62].

GREs já foram encontrados em diversos promotores virais e celulares. Entre os promotores celulares que contém GREs e são induzidos por glicocorticóides destacam-se aqueles relacionados às seguintes proteínas: metalotioneína humana (HMT), uteroglobina de rato (RUG), gene de *Drosophila* responsivo a ecdisona (DSC-7), tirosina aminotransferase de rato (rTAT), hormônio de crescimento humano (HGH), triptofano oxigenase de rato (rTO), ovoalbumina de galinha (COV), alfa-amilase de camundongo (amy 1 e 2), gene da glucocortina do timo de rato, gene do receptor de interleucina-1 em linfócitos B humano, gene do receptor de insulina da linhagem IM-9 de linfócito humano e gene da glutamina sintetase da linhagem leucêmica CME-C7^[45,63,64].

Por outro lado, hormônios glicocorticóides podem reprimir a transcrição gênica. Este efeito inibitório foi descrito para a expressão dos proto-oncogenes *c-myc*, *c-myb* e *c-ki-ras* na linhagem S49 de linfoma de camundongo^[26]. Os hormônios glicocorticóides também reprimem a transcrição *de novo* de genes que codificam para citocinas como IL-1, -2, -6 (interleucina-1, -2 e -6), GM-CSF (fator estimulante de colônia para granulócitos e macrófagos), TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e interferon gama^[65].

Ainda, o gene *JE/MCP-1*, que codifica a citocina JE/MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos), também sofre modulação negativa por glicocorticóides em células Balb/c-3T3^[27,66] e em células ST1 de glioma de rato^[67]. Porém, em nenhum desses sistemas, os mecanismos que levam aos efeitos inibitórios do hormônio são totalmente esclarecidos.

Foram descritas, inicialmente, seqüências nGRE (elementos de resposta negativa a glicocorticóides), que teriam ação oposta a GRE e que estariam localizadas no promotor de genes reprimidos por GR. A interação destes elementos com o receptor alteraria a conformação do último, inibindo sua atividade positiva^[68,69]. Entretanto, quando a atividade destas seqüências foi estudada, observou-se que ela era negativa em determinados tipos celulares e positiva em outros^[60]. Algumas citocinas inibidas por glicocorticóides não apresentam seqüências nGREs em seus promotores, sugerindo um outro mecanismo para tal ação.

A regulação da expressão gênica por glicocorticóides parece, portanto, envolver mecanismos complexos, que não dependem apenas da presença de seus receptores (GR) ou de seus elementos responsivos específicos no DNA (GREs ou nGREs).

Diversos pesquisadores têm relatado a interação de GR com outros fatores de transcrição (ver Tabela 1), resultando em modulação da ação hormonal, através de mecanismos de reguladores compostos^[70,60,71,72]. Desse modo, numa mesma célula, reguladores individuais podem atuar independentemente em seus elementos de resposta simples ou, ainda, juntos com outros fatores em diferentes elementos compostos.

Existem, no mínimo, três mecanismos gerais de reguladores compostos: (1) "co-occupancy", no qual fatores de diferentes famílias regulatórias interagem especificamente com o DNA bem como um com o outro^[60]; (2) "factor tethering", onde dois reguladores diferentes estabelecem contato proteína-proteína, mas apenas um dos dois liga-se ao DNA; (3) "mutual inhibition", neste mecanismo dois fatores de distintas famílias regulatórias interagem na ausência de DNA, cada um bloqueando a atividade de ligação a DNA do outro. Este esquema é análogo a mecanismos nos quais fatores que não se ligam a DNA, como IκB (inibidor-κB), podem regular as atividades de ligação a DNA dos reguladores transcricionais com os quais eles interagem (no caso, NF-κB).

Tabela 1. Fatores de transcrição que interagem com GR.

Compartimento celular	receptor/proteína	referências
citoplasma	GR/calreticulina	73,74
membrana nuclear	GR/proteínas do poro nuclear	75
fatores de transcrição	GR&PR/OTF-1 GR/AP-1 GR/RelA GR&ER/GATA-1 CREB	76,60,77,78,79,80,81,82,83
coativadores (TIFs)	GR/GRIP170	84
fatores da cromatina	GR/SW12/Brahma	85,86

Repressão transcricional mediada por GR envolvendo interação física entre GR e AP-1 tem sido amplamente descrita (ver Tabela 1). Esta interação evita transativação, resultando em repressão da transcrição gênica mediada por glicocorticóides através de elementos responsivos a AP-1.

Desde a descoberta deste mecanismo em 1990, um número crescente de estudos para este modelo de ação tem sido descrito, incluindo interação de GR com AP-1, NF- κ B, GATA-1 e CREB (ver Tabela 1). Além disso, trans-repressão, independente de ligação a DNA, também foi mostrada para a interação entre GR e Stat-5 no promotor de β -caseína^[87].

Outros mecanismos têm sido propostos para interação de GR com outros fatores de transcrição, dos quais um é a interferência com as propriedades transcricionais de um segundo fator de transcrição ou competição por um cofator como sugerido para CBP/p300^[88]. Outro mecanismo de repressão usado por GR é a inibição da fosforilação de Jun, um pré-requisito para ativação de AP-1^[89].

1.3. NF- κ B: um mediador induzível do controle da expressão gênica

O fator de transcrição NF- κ B foi originalmente identificado e nomeado por interagir com a sequência 5'-GGGGACTTCC-3' encontrada no "enhancer" intrônico do gene da cadeia leve kappa da imunoglobulina, denominada κ B, e estimular sua transcrição, durante o desenvolvimento de linfócitos B^[90]. Subsequentemente, foi mostrado que este fator se liga a pequenas variações dessa sequência em regiões regulatórias de diversos outros genes celulares e virais. Assim, NF- κ B modula a expressão gênica através da interação com elementos "cis-acting" (sítios κ B) que compartilham a sequência consenso 5'-GGGRNYYYCC-3' (R indica purina e Y, pirimidina)^[91].

Inicialmente, NF- κ B foi caracterizado como um heterodímero, composto de duas subunidades, uma de 50kDa (p50; NF κ B1) e outra de 65kDa (p65; RelA)^[92]. A clonagem dos genes que codificam para p50 e RelA permitiu que outros membros da família Rel/NF- κ B fossem identificados: Rel, ν -Rel, p52, RelB, as proteínas Dorsal, Dif e Relish de *Drosophila* e um variante de RelA (p65 Δ) gerado por "splicing"-alternativo^[93,94].

NF- κ B está constitutivamente presente e ativo no núcleo de células B maduras e em algumas linhagens de células T e de monócitos. Em outros tipos celulares, NF- κ B se encontra no citoplasma, em uma forma inativa, associado a uma proteína inibidora da sua atividade, a I κ B^[95]. Assim como as proteínas Rel/NF- κ B, existem várias proteínas I κ B^[96]. Tratamento das células com diversos agentes, como citocinas inflamatórias, ésteres de forbol, toxinas bacterianas, vírus, luz UV e uma variedade de mitógenos, induz a translocação de NF- κ B para o núcleo e, conseqüentemente, sua atividade.

A Tabela 2 apresenta todos os membros conhecidos da família Rel/NF- κ B e da família das proteínas inibidoras I κ B, conservados de *Drosophila* a humanos, estando ausentes em levedura e *C. elegans*.

Tabela 2. Proteínas das famílias Rel/NF- κ B e I κ B.

Proteínas	Outros nomes	Genes
p50 ou p105 (NF- κ B1)	p110, KBF1, EBP-1	<i>nfkb1</i>
p52 ou p100 (NF- κ B2)	p50B ou p97, p49 ou p100, p55 ou p98, Lyt10, H2TF1	<i>nfkb2</i>
Relish	-	<i>relish</i>
Rel	c-Rel	<i>c-rel</i>
v-Rel	-	<i>v-rel</i>
RelA	p65	<i>rela</i>
RelB	I-Rel	<i>relb</i>
Dorsal	-	<i>dorsal</i>
Dif, Cif	dorsal-related immunity factor, cecropia immunoresponsive factor	<i>dif</i>
I κ B- α	MAD-3, pp40, RL/IF-1, ECI-6	<i>ikba</i>
I κ B- β	-	<i>ikbb</i>
I κ B- ϵ	-	<i>ikbe</i>
I κ B- γ	p105/pdI, porção C-terminal de p105	<i>nfkb1</i>
Bcl-3	-	<i>bcl-3</i>
cactus	-	<i>cactus</i>

A família Rel/NF- κ B é caracterizada pela presença de um domínio N-terminal, denominado RHD (domínio de homologia a Rel) de cerca de 300 aminoácidos, o qual apresenta cerca de 35 a 61% de identidade entre os vários membros da família. O RHD, a única região compartilhada entre todos os membros da família Rel/NF- κ B, determina a ligação aos elementos κ B no DNA, dimerização com o mesmo ou outros membros da família, assim como interação com as proteínas da família I κ B. Esta região contém, também, a sequência de localização nuclear (NLS).

Os membros da família Rel/NF- κ B podem ser agrupados em duas classes, em relação às seqüências C-terminal ao RHD: (I) uma constituída das proteínas p105 (NF- κ B1) e p100 (NF- κ B2) e da proteína Relish de *Drosophila*, que contém um domínio C-terminal de repetições de anquirinas. As proteínas p105 e p100 são processadas proteoliticamente em p50 e p52, respectivamente; (II) outra que inclui as proteínas Rel (c-Rel), v-Rel, RelA (p65) e RelB, assim como as proteínas Dorsal e Dif de *Drosophila*. Uma diferença fundamental entre as classes I e II reside na capacidade de transativação.

As proteínas da primeira classe, quando associadas como homodímeros, são ativadores gênicos fracos ou inertes. Por outro lado, dímeros contendo no mínimo uma subunidade da segunda classe funcionam como potentes ativadores da expressão gênica, pois apresentam um domínio de transativação na porção C-terminal posterior ao RHD^[97]. Uma representação esquemática da estrutura dos membros das famílias Rel/NF- κ B está apresentada na Figura 2.

p50 e p52 não apresentam um domínio de transativação. Além disso, seus precursores citoplasmáticos, p105 e p100, respectivamente, se comportam como proteínas I κ B. O processamento proteolítico das proteínas p105 e p100 em suas formas maduras é regulado positivamente durante estimulação de NF- κ B por sinais extracelulares^[98] sendo, a reação, dependente de ATP^[99]. As proteínas maduras terminam em uma região, diretamente adjacente ao RHD, rica em glicina. Esta região parece funcionar como uma dobradiça flexível nas proteínas precursoras e também prover um acesso potencial para clivagem por endoproteases.

Figura 2. Estrutura das proteínas da família Rel/NF- κ B.

A estrutura tri-dimensional da ligação do fator de transcrição NF- κ B ao seu respectivo sítio κ B, tem sido obtida por análise cristalográfica de raio-X dos homodímeros p50, RelA, p52 e Rel e do heterodímero p50/RelA complexados ao DNA^[91]. O reconhecimento do DNA é peculiar, sendo mediado por "loops" peptídicos que entram nos sulcos maiores do DNA alvo. Além das bases do DNA, muitos grupos fosfato do esqueleto também estão envolvidos na estabilização do complexo DNA-proteína. As bases e os grupos fosfato da sequência de DNA consenso (sítio κ B) são reconhecidos por resíduos conservados por todo RHD de p50. A dimerização de p50 é exclusivamente mediada por um domínio de ~ 100 aminoácidos na região C-terminal do RHD, sendo estabilizada por uma série de estruturas β -pregueadas, que incluem um "core" hidrofóbico e resíduos hidrofílicos periféricos.

1.3.1. Atividade NF- κ B

A atividade dos complexos Rel/NF- κ B é regulada pela interação com os membros da família das proteínas inibidoras I κ B, os quais interagem com a NLS, localizada na extremidade C-terminal do RHD, das subunidades de NF- κ B, inibindo a translocação do fator de transcrição do citoplasma para o núcleo. A NLS é constituída por um conjunto ("cluster") conservado de aminoácidos com carga positiva importante para interação com as proteínas inibidoras I κ B.

As formas ativas de NF- κ B que se ligam ao DNA são complexos diméricos compostos de várias combinações entre os polipeptídeos da família Rel/NF- κ B. Os membros da família Rel/NF- κ B podem formar quase todos os tipos de homo- e heterodímeros, teoricamente possíveis. O complexo p50/RelA (p50/p65) está presente em praticamente todas as células sendo, geralmente, o dímero mais abundante. Entre os outros dímeros possíveis, homodímeros de RelA ou Rel e heterodímeros RelA/Rel geralmente são detectados em baixos níveis, entretanto desempenham papéis únicos e significantes em promotores específicos. Homodímeros de RelB e heterodímeros RelB/RelA ou RelB/Rel ainda não foram detectados *in vitro* e/ou *in vivo*^[100].

Os vários dímeros NF- κ B diferem quanto a afinidade por seqüências κ B específicas, potencial trans-ativador, cinética de translocação nuclear, níveis de expressão célula-específicos e interação com as diferentes formas de I κ B^[97]. A capacidade de dímeros diferentes de reconhecer pequenas diferenças nos DNAs alvos aumenta a habilidade das subunidades NF- κ B de regular diferencialmente a expressão gênica. Os complexos apresentam alta afinidade por seus sítios de ligação, com uma constante de dissociação de $\sim 10^{-12}$ M.

Os sítios κ B estão presentes em regiões regulatórias de genes envolvidos em resposta imune (Ig κ , IL-2 e IL-2Ra, interferon beta), inflamatória e fase aguda (IL-1, IL-6, TNF- α , TNF- β e proteína amilóide A do soro), vírus (HIV-LTR, SV40, CMV, adenovírus), membros Rel/NF- κ B (Rel, p50, p52 e RelB), membros I κ B (I κ B α , I κ B γ , p105, p100 e Bcl-3), proteínas do controle do crescimento (p53, c-Myc, ciclina D1, JunB) e moléculas de adesão celular (I-CAM, V-CAM e E-selectina), como em muitos outros genes^[42].

Na maioria dos tipos celulares, NF- κ B se encontra retido no citoplasma em uma forma inativa associado a uma das várias proteínas inibidoras I κ B. Atividade NF- κ B pode ser induzida por uma ampla variedade de estímulos, tais como: citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-2), ésteres de forbol (PMA), lipopolissacarídeo (LPS), infecção viral (HIV-I, HTLV-I e vírus da hepatite B), proteínas virais (tax, X e E1A), luz UV, uma variedade de mitógenos, entre outros^[42]. Em resposta a estes estímulos, o complexo I κ B quinase (IKK) é ativado, levando à rápida fosforilação de I κ B. A proteína I κ B- α é fosforilada nos resíduos de serina N-terminal Ser-32 e Ser-36, enquanto I κ B- β é fosforilada nos resíduos Ser-19 e Ser-23^[101]. Fosforilação dos resíduos de serina N-terminal em I κ B α sinaliza para a rápida multiubiquitinação de resíduos de lisina próximos (lys-21 e Lys-22). I κ B ubiquitinada, então, é degradada pelo proteassomo 26S dependente de ubiquitina, provavelmente ainda complexada com NF- κ B. Remoção de I κ B α expõe as NLSs das subunidades de NF- κ B, permitindo que o complexo transloque para o núcleo, ligue-se ao DNA e module a expressão gênica. Uma vez no núcleo, as proteínas NF- κ B não apenas se ligam às seqüências κ B mas também interagem com muitas outras proteínas. Por exemplo, c-Rel liga-se diretamente a proteína de ligação ao elemento TATA (TBP) e

TFIIB. A associação direta entre c-Rel e TBP é essencial para ativação transcricional^[102]. Outras proteínas ativadoras, como C/EBP^[103], SP1^[104], AP-1^[105] e GR, podem interagir com NF- κ B para modular a transcrição de vários genes. Interação de NF- κ B e AP-1 resulta em ativação sinérgica da função dos elementos de resposta κ B e AP-1, enquanto a interação de NF- κ B e C/EBP resulta no aumento da função de C/EBP e na repressão do elemento de resposta κ B.

Figura 3. Modelo da regulação das atividades NF- κ B e I κ B.

1.3.2. NF- κ B e oncogênese

Atividade NF- κ B está presente em muitos tipos celulares; entretanto, como os membros da família são diferentemente expressos, a composição e, conseqüentemente, a atividade dos complexos Rel/NF- κ B varia dependendo do tipo celular. Embora todos os homo- e heterodímeros Rel/NF- κ B possam se ligar à sequência consenso κ B, eles diferem quanto a afinidade por seqüências específicas, resultando em uma ativação diferencial de seus genes alvos^[106]. Desse modo, as diferentes combinações das proteínas Rel/NF- κ B, nos diferentes tipos celulares, sugerem funções distintas destes complexos na regulação dos genes-alvos.

Os mecanismos moleculares de ação de NF- κ B e, mais recentemente, as cascatas de transdução de sinal da superfície da célula até a ativação de NF- κ B têm sido objetos de intensa investigação. Vários trabalhos têm descrito NF- κ B como uma molécula sinalizadora no controle do balanço entre ciclo celular normal, apoptose e oncogênese.

Em fibroblastos 3T3 quiescentes, NF- κ B é transitoriamente ativado em resposta a fatores de crescimento do soro, sugerindo um papel para este fator de transcrição na transição G₀-G₁^[107]. NF- κ B ativa a transcrição de vários genes que codificam para fatores de crescimento hematopoiéticos. Estes incluem os fatores estimulantes de colônia M-CSF, G-CSF e GM-CSF; o fator de crescimento de células T, IL-2; e o fator de crescimento de células T e B, IL-6. As citocinas estimulantes do crescimento em melanomas, gro- α , gro- β e gro- γ , também são controladas por NF- κ B. Os sítios κ B estão presentes em regiões regulatórias de genes que codificam para proteínas do controle do crescimento (p53, c-Myc, Ras) e moléculas de adesão celular (I-CAM, V-CAM e E-selectina)^[42].

NF- κ B responde a muitos sinais que ativam células T e B, levando a diferenciação e proliferação. Cerca de 10% das neoplasias de células B e T humanas possuem alterações nos genes que codificam para as proteínas Rel/NF- κ B e I κ B^[108]. v-Rel, a contraparte viral de c-Rel, é um potente oncogene, causando tumores agressivos em aves^[109,110]. A inibição da expressão do mRNA de RelA, por oligonucleotídeo

"antisense", reduz a adesão celular de muitas linhagens celulares transformadas e seu crescimento em animais^[111,112].

Genes que codificam as proteínas c-Rel, p100/p52, RelA e Bcl-3 estão localizados dentro de regiões do genoma envolvidas em rearranjos ou ampliações, freqüentemente alteradas em neoplasias^[113]. O gene para c-Rel aparece amplificado em algumas linhagens celulares tumorais e rearranjado em outras. O gene Bcl-3 foi originalmente identificado como uma translocação cromossomal [t(14,19) (q32;q13.1)] em um "subset" de leucemias linfocíticas crônicas de células-B^[114] e é superexpresso em alguns neoplasmas de células-B^[115]. A translocação cromossomal t(10,14) associada a NF- κ B2, originalmente encontrada em um caso de linfoma de células-B non-Hodgkin's, é encontrada em vários neoplasmas linfóides, particularmente em linfomas cutâneos^[113].

NF- κ B está também diretamente associado à transformação celular independente de eventos de translocação cromossomal. Por exemplo, foi mostrado que NF- κ B é ativado por proteínas transformantes virais e, em alguns casos, é necessário para a transformação induzida por vírus. Assim, a ativação transcricional de NF- κ B pela proteína Tax, codificada pelo vírus da leucemia de células T humanas-1 (HTLV-1), é necessária para a transformação de fibroblastos de murino^[116] e de rato^[117]. Parece que Tax ativa NF- κ B através de interação direta com o complexo IKK^[118,119,120,121,122]. Além disso, outras proteínas transformantes virais, tais como o antígeno 2 da proteína nuclear EBV e a proteína latente de membrana (LPM), codificados pelo vírus de Epstein-Barr (EBV), a proteína large-T, codificada pelo vírus de Síbio-40 (SV-40), e E1A, codificada por adenovírus, estimulam a atividade transcricional de NF- κ B. Consistente com o fato de NF- κ B estar envolvido na transformação e tumorigênese, muitas linhagens celulares derivadas de tumores sólidos humanos apresentam aumento do nível nuclear e/ou aumento da atividade repórter dependente de NF- κ B em comparação às linhagens celulares controle não transformadas^[123,124,125,126].

Foi mostrado que inibição de NF- κ B pela expressão de uma forma modificada de I κ B α (super-repressor I κ B α) bloqueia a formação de foco induzida por Ha-Ras oncogênico em células NIH3T3^[127]. Também foi mostrado que a proteína de fusão oncogênica BCR-ABL ativa NF- κ B e que a tumorigênese dirigida por BCR-ABL pode ser

bloqueada pela expressão do super-repressor I κ B- α ^[128]. NF- κ B também está ativado em linfoma de Hodgkin e a inibição de NF- κ B bloqueia o crescimento destas células^[125].

Os mecanismos pelos quais as proteínas Rel/NF- κ B e I κ B contribuem para desregular o crescimento celular permanecem vagos, em parte porque tem sido difícil correlacionar a função de NF- κ B com um efeito positivo definitivo na proliferação celular. Atualmente existem indicações de que as proteínas NF- κ B estão mais intimamente envolvidas na proteção contra morte celular apoptótica^[129].

1.3.3. NF- κ B e GR

A interação entre GR e NF- κ B geralmente resulta em repressão mútua da atividade transcricional de ambos os fatores de transcrição. O principal interesse da maioria dos pesquisadores está voltado para a repressão de NF- κ B por GR ativado, procurando entender o mecanismo das ações imunossupressora e anti-inflamatória dos esteróides. Muitos dos genes imunologicamente relevantes induzidos por NF- κ B, como IL-2, IL-6, IL-8 e E-selectin, são reprimidos por GCs. Da mesma forma, NF- κ B é capaz de diminuir as ações do hormônio esterol por reprimir a atividade dos receptores de esteróides. Foi mostrado que dexametasona, um glicocorticóide sintético, bloqueia a indução da atividade de ligação ao DNA de NF- κ B por diferentes indutores em vários tipos celulares, por exemplo, por TNF- α (fator de necrose tumoral- α) em células HeLa^[81,130]. Por outro lado, foi descrita que a ativação de GR, por dexametasona, aumenta a atividade de ligação ao DNA de NF- κ B, induzida por PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), levando à indução da interleucina-1 β em uma linhagem celular de leucemia monocítica^[131].

O efeito inibitório que glicocorticóides exercem na transcrição mediada por NF- κ B pode ocorrer por dois mecanismos distintos: um dependente da interação proteína-proteína de ambos fatores, enquanto o outro envolve a indução, por GR, da expressão do inibidor de NF- κ B, I κ B, e subsequente manutenção de NF- κ B em um complexo citoplasmático inativo, de forma hormônio e célula específico. Por exemplo, glicocorticóides e progesterona, mas não testosterona e estradiol, reprimem a atividade

NF- κ B estimulada por TNF- α e LPS, por induzir a expressão de I κ B α e, assim, manter NF- κ B como um complexo citoplasmático inativo, em monócitos e linfócitos T^[132, 133].

Receptores de hormônios esteróides também inibem a degradação de I κ B, assim, glicocorticóides são capazes de prejudicar a degradação de I κ B α em células L929^[134] e o receptor de estrógeno (ER) inibe a degradação de I κ B α após indução de IL-6 em células HeLa^[135]. Em contraste, I κ B β não é afetado pelo glicocorticóide dexametasona^[133]. Em estudos de células epiteliais pulmonares A549 de humano foi determinado que dexametasona induz expressão do mRNA de I κ B α , mas o I κ B α induzido não foi capaz de prevenir a translocação nuclear ou a ligação ao DNA de NF- κ B^[136]. Em um número de tipos celulares (fibrosarcoma, fibroblasto, célula-T e células endoteliais) testosterona e glicocorticóides são capazes de inibir atividade NF- κ B, mas sem indução de I κ B α ^[136,137,138,139,140].

Outro mecanismo que conta para o mútuo antagonismo das ações de NF- κ B e receptor de hormônio esteróide envolve interação física entre RelA e receptores esteróides, de forma DNA-independente^[80,81,141]. Experimentos de "protein cross-linking" e co-imunoprecipitação demonstraram que a repressão transcricional de NF- κ B, mediada por GR (receptor de glicocorticóide), se deve à interação física entre GR e a proteína RelA, *in vitro* e *in vivo*^[80,130,142,143]. Subseqüentemente, foi mostrado que apenas RelA, mas não outros membros da família Rel, participa deste "cross-talk" negativo e que o domínio de ligação ao DNA de GR é essencial, mesmo se a ligação direta ao DNA não for necessária^[81]. Entretanto, existe também evidência da interação entre GR e a subunidade p50 de NF- κ B^[130]. Aparentemente, GR bloqueia a atividade de ligação ao DNA de NF- κ B não apenas quando ligado a ligantes agonistas mas também quando complexado ao anti-glucocorticóide RU486.

Ambos os domínios de ligação ao DNA (particularmente o dedo de zinco C-terminal) e os domínios de ligação aos receptores de hormônio glicocorticóide (GR) e de progesterona (PR) interagem com o RHD e domínios de transativação de RelA^[81,141,144]. Os heterodímeros formados ligam-se ao DNA, mas o domínio de transativação de RelA é mascarado por GR e é incapaz de interagir com cofatores essenciais ou com a maquinaria de transcrição basal. GR e RelA competem pela ligação às proteínas

coativadoras CBP e SRC-1 ("steroid receptor coactivator"). A superexpressão de CBP ou SRC-1 alivia os efeitos inibitórios de GR na transcrição mediada por RelA e a inibição da expressão gênica mediada dependente de GR^[145].

Estudos da regulação de NF- κ B por ER apresenta diferenças célula-específicas. Por exemplo, ER é capaz de reprimir 80% da expressão mediada por TNF- α em células HeLa mas não em células embrionárias 293 de rim humano^[146].

1.4. O complexo de transcrição AP-1

O complexo AP-1 foi primeiramente identificado como um fator de transcrição que se liga especificamente a elementos-*cis* no promotor do gene da metalotioneína IIa humana. Posteriormente, o sítio de ligação de AP-1 no DNA foi reconhecido como o elemento de resposta a TPA (13-acetato de 12-*o*-tetradecanoil forbol, indutor de tumor) presente em vários genes celulares e virais, incluindo o gene da collagenase humana e da interleucina 2 (IL-2). A comparação de vários TREs (elemento responsivo a TPA) levou à identificação da sequência consenso reconhecida por AP-1: 5'-TGA^G/C-TCA-3'. A inserção de oligonucleotídeos sintéticos correspondentes ao sítio de ligação de AP-1 no promotor da timidina quinase torna-o responsivo a TPA, enquanto que sequências mutadas em regiões importantes para a ligação de AP-1 não exercem este efeito. Estes fatos contribuíram para o estabelecimento do papel de AP-1 no controle da transcrição basal e induzível de vários genes. É importante ressaltar, entretanto, que AP-1 é apenas um dos elementos-*cis* que participam da regulação da transcrição gênica por fatores externos. Outros elementos incluem SRE (elemento de resposta a soro), sítio κ B e o sítio de ligação de AP-2 (proteína ativadora-2)^[147].

O fator de transcrição AP-1 é um complexo dimérico, formado pelas proteínas das famílias Fos e Jun. A família Fos é constituída por quatro proteínas: cFos, FosB, Fra-1 e Fra-2, enquanto a família Jun inclui três membros: cJun, JunB e JunD. As proteínas da família Fos não são capazes de formar dímeros entre si, sendo apenas capazes de dimerizar com as proteínas da família Jun. Por outro lado, as proteínas Jun, identificadas até o presente, formam homo e heterodímeros entre si, bem como heterodímeros com as proteínas da família Fos. Assim, as proteínas Fos isoladamente

não são capazes de se ligar ao DNA e ativar a transcrição, entretanto, formam dímeros altamente estáveis com as proteínas Jun, os quais apresentam atividade de ligação ao DNA maior que os dímeros Jun^[148].

Experimentos de mutagênese sítio dirigida indicam que a dimerização das proteínas Jun e Fos ocorre por interações hidrofóbicas entre regiões conhecidas como zíper de leucinas, comum às duas famílias de proteínas. O zíper de leucinas é um domínio estrutural que forma uma α hélice, na qual os resíduos de leucina são separados por intervalos de seis aminoácidos^[148]. Desta forma, as cadeias laterais das leucinas formam uma superfície hidrofóbica que medeia a dimerização. Além das interações hidrofóbicas, pontes salinas também fazem parte da interação, proporcionando a estabilidade dos dímeros. Assim, apesar de outras proteínas como Myc, CREB e mesmo Fos apresentarem zíper de leucinas, somente Fos é capaz de gerar dímeros com as proteínas Jun.

Alguns estudos *in vitro* mostram que a maior atividade de ligação ao DNA dos dímeros Fos/Jun é devida a sua maior termo-estabilidade em relação aos dímeros Jun/Jun. Enquanto Fos/Jun dissociam-se em temperaturas entre 37°C e 42°C, Jun/Jun dissociam-se entre 25°C e 37°C. Por outro lado, homodímeros cFos não ocorrem nem a 4°C. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de cFos apresentar muitos resíduos com cargas negativas na região do zíper de leucinas, que provocam repulsão entre essas proteínas. Esses mesmos resíduos são responsáveis pelo alto número de pontes salinas formadas com os resíduos básicos presentes no zíper de leucinas das proteínas Jun.

Enquanto o zíper de leucina medeia a dimerização entre as proteínas, a interação com o DNA ocorre através de um domínio básico, constituído de muitos resíduos com cargas positivas. Esta região é altamente conservada entre as proteínas Fos e Jun e mesmo entre outros fatores de transcrição que interagem com seqüências similares a TRE, como, por exemplo, CREB^[148].

No contexto celular, a ativação ou repressão de determinados genes não é resultante apenas da ação de um fator de transcrição, podendo haver interação entre eles, levando a diferentes respostas celulares. A associação de AP-1 com fatores de transcrição como os receptores hormonais GR, PR (receptor de progesterona) e THR (receptor de hormônios tireoidianos) entre outros, foi descrita^[60,77,149]. Assim, os produtos

dos oncogenes *fos* e *jun* desempenham um papel crítico na regulação da expressão de genes celulares específicos no controle do crescimento de células normais, interagindo com outros fatores de transcrição para produzir uma atividade controlada dos seus genes alvos, a qual é necessária para o controle normal do crescimento celular.

1.5. Modelo celular

O fenômeno da reversão de células transformadas e tumorais para um fenótipo normal, tem permitido abordar a análise do papel de oncogenes e de genes supressores de tumor não só na transformação celular como, também, no controle da proliferação celular normal e nos mecanismos de transdução de sinal^[150].

A linhagem celular C6 foi estabelecida em cultura a partir de um glioma (astrocitoma) de rato, induzido quimicamente por metilnitrosouréia^[151]. Uma característica importante das células C6 é apresentarem receptores para hormônios corticosteróides, tanto do tipo I para mineralocorticóides como do tipo II, para hormônios glicocorticóides^[152]. A regulação positiva e negativa dos glicocorticóides na transcrição de genes celulares é resultado da ligação do hormônio aos receptores. Assim, esta linhagem tem sido utilizada para estudos dos efeitos de hormônios glicocorticóides em gliomas^[153,154,155].

O estudo do mecanismo de ação de hormônios glicocorticóides e de fatores de crescimento sobre o controle da proliferação tumoral levou o grupo da Dra. Mari Sogayar a isolar variantes da linhagem C6 com diferentes respostas a reguladores extracelulares. As variantes ST1 e P7 são de particular interesse, uma vez que se mostram, respectivamente, hiper-responsivas e resistentes ao tratamento com glicocorticóides^[154,155].

O tratamento hormonal leva as células ST1 a uma completa reversão fenotípica tumoral-normal, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estas células recuperam a capacidade de entrar em G₀ na ausência de soro, à semelhança de fibroblastos normais 3T3, passam a ter sua proliferação regulada por fatores peptídicos de crescimento e se tornam incapazes de crescer em suspensão de agarose ou de gerar tumor quando injetadas em camundongos *nude*.

O controle da proliferação na linhagem ST1 é dependente de alteração da expressão gênica mediada por hormônios glicocorticóides. Estudos cinéticos mostraram que a inibição da proliferação das células ST1, mediada por hidrocortisona, se dá na fase G₁ do ciclo celular^[154,155]. Este resultado foi confirmado, também, por citometria de fluxo^[156].

O variante P7, por outro lado, mostra-se insensível à ação de glicocorticóides, mantendo-se transformado e tumorigênico na presença do hormônio.

Devido a estas características, as variantes ST1 e P7 constituem um modelo ímpar para se investigar a ação anti-tumoral de hormônios glicocorticóides ao nível molecular. Com este objetivo, algumas estratégias estão sendo utilizadas em nosso laboratório, como: a) clonagem de genes regulados por glicocorticóides em células ST1; b) análise da expressão de genes conhecidos, envolvidos no controle da proliferação e/ou reversão celular; c) "knock-out" genético, por recombinação homóloga ou inibição da expressão gênica por RNA antisense, para se verificar o papel de um determinado gene na reversão, proliferação ou diferenciação celular.

A clonagem de genes regulados por glicocorticóides em células ST1, em nosso laboratório, utilizando uma biblioteca de cDNA de células ST1 tratadas com hidrocortisona, tem permitido o isolamento de genes possivelmente envolvidos na reversão fenotípica tumoral-normal e associados ao controle da proliferação celular^[157,158,159].

1.6. Proposta

A repressão transcricional mediada por GR, envolvendo interação física entre GR e AP-1, bem como entre GR e NF- κ B, tem sido amplamente descrita (ver Tabela 1). Esta interação resulta em inibição da ativação de ambos os fatores de transcrição, AP-1 e NF- κ B, independente da ligação de GR ao DNA^[160]. AP-1 e NF- κ B controlam um conjunto de genes surpreendentemente diverso. Entretanto, estes fatores de transcrição compartilham algumas propriedades comuns, como, por exemplo, estimular processos inflamatórios e promover proliferação e transformação celular^[161,108]. Além disso, a maioria dos agentes que ativam NF- κ B também ativam AP-1^[162].

A inibição de AP-1 por um dominante negativo Jun (TAM67) em queratinócitos humanos demonstrou a inibição associada de NF- κ B durante a supressão do seu fenótipo transformado^[161]. A redução das atividades AP-1 e NF- κ B ocorre concomitantemente quando uma das duas é inibida. A interação entre a subunidade RelA de NF- κ B e os componentes c-Fos/c-Jun de AP-1 foi demonstrada^[105]. O fato da inibição de AP-1 ser invariavelmente acompanhada pela inibição de NF- κ B, durante a supressão da transformação em queratinócitos humanos, sugere que a expressão gênica regulada por NF- κ B possa ser necessária, também, para transformação neoplásica.

Por outro lado, GR possui ação anti-inflamatória e anti-tumoral. Diversos autores sugerem que a modulação negativa da atividade dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B medeia as atividades anti-inflamatória e anti-tumoral de GCs.

Hormônios glicocorticóides induzem a completa reversão fenotípica tumoral-normal, tanto *in vitro* como *in vivo*, na linhagem celular ST1. O tratamento das células ST1 com hidrocortisona leva, também, a uma inibição dos níveis basal e induzido por TNF- α da atividade de ligação ao DNA do fator de transcrição NF- κ B, como apresentado na Figura 4^[163]. Por outro lado, o hormônio não é capaz de induzir a reversão fenotípica ou de inibir a atividade de ligação ao DNA de NF- κ B na linhagem celular P7. Estes dados sugerem que a reversão fenotípica tumoral-normal induzida por glicocorticóides em células ST1 pode ser mediada, em parte, pela repressão da atividade do fator de transcrição NF- κ B.

A. Reversão fenotípica tumoral-normal
mediada por Hy

B. Repressão da atividade NF-κB
mediada por Hy

Figura 4. Efeito de hidrocortisona (Hy) sobre: (A) morfologia celular e (B) atividade de ligação ao DNA do fator de transcrição NF-κB, em células ST1 de glioma de rato.

AP-1 e NF-κB poderiam estar atuando de forma sinérgica na reversão fenotípica tumoral-normal mediada por glicocorticóides em células ST1.

O variante celular ST1 apresenta dois complexos (I e II) com atividade NF-κB, enquanto o variante P7 apresenta apenas um, conforme demonstrado em ensaios de mobilidade eletroforética em gel (EMSA)^[163]. Verificou-se que o complexo com atividade NF-κB, nas células P7, apresenta uma migração correspondente àquela observada para o complexo II nas células ST1. A diferença de migração entre os dois complexos é devida à composição protéica diferente. Esta diferença na composição protéica de NF-κB entre os dois variantes celulares e entre os complexos apresentados pelas células ST1, pode apontar para uma correlação entre inibição da atividade NF-κB por

hidrocortisona e a presença (ou não) de determinada proteína Rel/NF- κ B no complexo. A análise por "supershift" revelou diferenças na composição de NF- κ B entre os dois variantes celulares.

Experimentos de "protein cross-linking" e co-imunoprecipitação demonstraram que a repressão transcricional de NF- κ B, mediada por GR (receptor de glicocorticóide), se deve à interação física entre GR e a proteína RelA, *in vitro* e *in vivo* ^[80,130,142,143]. Visto que a proteína RelA está presente no complexo NF- κ B apresentado pelas células ST1, mas não pelas células P7, o objetivo principal deste trabalho foi estudar o papel desempenhado pela proteína RelA na reversão fenotípica tumoral-normal induzida por glicocorticóides na linhagem celular ST1. A abordagem proposta consiste em bloquear a expressão desta proteína, na linhagem celular ST1, através de construções "antisense"^[164] que expressem o mRNA correspondente à sequência complementar ao gene *rela*.

1.7. Objetivos específicos

- construção do vetor pOPI3-RelA(as), contendo o cDNA correspondente à proteína RelA na orientação "antisense";
- análise da expressão da proteína RelA nos clones obtidos a partir de células ST1 transfectadas com a construção pOPI3-RelA(as);
- análise da proliferação dos clones obtidos a partir de células ST1 transfectadas com a construção pOPI3-RelA(as);
- análise da atividade AP-1 em células ST1 sob a ação do hormônio glicocorticóide hidrocortisona.
- análise morfológica das células ST1 e P7 na presença de diferentes concentrações de hidrocortisona e TNF- α ;
- análise do efeito de TNF- α e de agentes inibidores de NF- κ B (hidrocortisona e curcumina) na proliferação celular das células ST1 e P7, medido através de ensaios de incorporação de ³H-timidina ao DNA;
- análise do complexo com atividade NF- κ B de ligação ao DNA nas linhagens celulares ST1 e P7, sob ação de agentes anti-tumorais (hidrocortisona e curcumina), através de EMSA.

2. Material e Métodos

2.1. Soluções e meios de cultura para células de mamífero

- DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco - Life Technologies).
- FCS: Soro fetal bovino (Cultilab Materiais para Cultura de Células).
- Tripsina (Gibco - Life Technologies).
- PBSA: Tampão Salina Fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , pH 7,2.

2.2. Linhagens celulares

- ST1: Clone derivado de células C6 de glioma de rato, hipersensível ao hormônio glicocorticóide, transformado e tumorigênico ^[153,154,155].
- P7: Clone derivado da linhagem C6, não responsivo ao tratamento com hidrocortisona, transformado e tumorigênico ^[153,154,155].
- ST1-pOPI3-1 a -9: Clones isolados a partir da transfecção de células ST1 com o vetor parental pOPI3CAT.
- ST1-RelA-1 a -12: Clones isolados a partir da transfecção de células ST1 com o vetor pOPI3-RelA(as).

2.3. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram mantidas em frascos plásticos descartáveis em DMEM suplementado com 5% FCS, 1,2g/L de bicarbonato de sódio, 25mg/L de ampicilina e 100mg/L de estreptomicina, em atmosfera de 5% CO_2 /95% ar para manutenção do pH próximo ao fisiológico, a 37°C. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiam 80% da densidade de saturação. Para tal o meio de cultura foi removido, as células lavadas, uma vez, com PBSA e, então, a cultura foi tripsinizada (0,1% tripsina em PBSA contendo 1mM EDTA). Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo

contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) a -190°C , em reservatório contendo nitrogênio líquido.

2.4. Congelamento e descongelamento das linhagens celulares

2.4.1. Congelamento

As culturas celulares foram lavadas 1x com PBSA, tripsinizadas e as células foram ressuspendidas em 2mL de 10% FCS-DMEM, para inativar a tripsina, e sedimentadas a 1.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspendidas em meio 10% DMSO-10% FCS-DMEM, de modo que a concentração celular estivesse entre $1-2 \times 10^6$ células/mL. Essa suspensão de células foi transferida para ampola de congelamento (NUNC) e incubada por 30 minutos a 4°C . Após esse período a ampola foi transferida para -80°C onde permaneceu por 24 horas antes de ser transferida para o reservatório de nitrogênio líquido.

2.4.2. Descongelamento

A ampola contendo a cultura celular de interesse foi retirada do nitrogênio líquido e colocada em banho a 37°C . Logo que o conteúdo da ampola descongelou, a suspensão de células foram homogeneizadas cuidadosamente e transferidas para frascos de cultura contendo 10% FCS-DMEM. As culturas celulares foram mantidas a 37°C em atmosfera 5% CO_2 /95% ar até que as células aderissem. Assim que as células aderiram, o meio foi trocado para 5% FCS-DMEM, de maneira que as células tivessem permanecido o menor tempo possível em contato com o DMSO, já que este é tóxico para as mesmas.

2.5. Meio de cultura para bactérias

- LB: Meio de Lúria-Bertani: 1% tripton; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl, pH7,5.
- LB-A: Meio LB sólido contendo 1,5% ágar, para cultivo em placas.

2.6. Plasmídeos

a) pBluescript SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

b) p65#: Contém o cDNA de RelA clonado no sítio *Not* I do plasmídeo pBluescript SK(+), cedido pelo Dr. Rodrigo Bravo (Bristol-Meyers Squibb Institute for Pharmaceutical Research, Princeton, New Jersey, EUA).

vetor p65# (2,44Kbp)

c) pOPI3-CAT (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

2.7. Preparação de bactérias competentes por tratamento com CaCl₂

Bactérias *Escherichia coli* (linhagem XL1BlueMRF⁺), de uma colônia isolada em LB sólido, foram pré-cultivadas em 5mL de meio LB a 37°C, sob agitação de 200-250rpm por 16h. Esta pré-cultura foi diluída 100 vezes em 100mL de meio LB e incubada a 37°C, sob agitação de 200-250rpm, até a fase exponencial de crescimento ($OD_{600nm} = 0,8$). Uma vez confirmada a entrada na fase exponencial de crescimento, as bactérias foram coletadas por centrifugação (2.500xg, 5min, 4°C). O sedimento de bactérias foi suavemente ressuspensionado em 80mL de tampão de competência gelado e deixadas por 40min no gelo. As bactérias foram novamente coletadas por centrifugação (2.500xg, 5min, 4°C), ressuspensionadas em 2mL do mesmo tampão (gelado) e incubadas em gelo por 30min. Em seguida foram mantidas a 4°C por 16-24h, obtendo-se, portanto, uma suspensão de bactérias competentes. Esta suspensão de bactérias

competentes foi usada para transformação ou aliquotada em 40% glicerol e congelada a -80°C.

2.8. Preparação de bactérias eletrocompetentes

Inoculou-se 400mL de meio LB com 1/100 de volume de uma pré-cultura de *E coli* crescida a 37°C, sob agitação de 200-250rpm, por 16h. As bactérias foram crescidas a 37°C, sob agitação de 200-250rpm, até $OD_{600nm} = 0,8$ (antes da fase log). Após alcançada a densidade óptica de 0,8 a cultura foi transferida para o gelo onde foi mantida até o final do processo. Esta cultura foi centrifugada (2500xg, 15min, 4°C) e as bactérias sedimentadas foram ressuspensas em 200mL de H₂O gelada. A suspensão foi novamente centrifugada (2.500xg, 15min, 4°C) e o sedimento de bactérias foi ressuspensado em 200mL de H₂O gelada. Seguiu-se mais uma centrifugação e o sedimento foi lavado mais duas vezes com 10% glicerol gelado, nas mesmas condições das lavagens anteriores. Por último, o sedimento de bactérias foi, então, ressuspensado em um pequeno volume de 10% glicerol gelado, de modo que a OD_{600nm} estivesse entre 100 e 200, sendo que uma densidade de 10 unidades corresponde à cerca de $4-8 \times 10^9$ bactérias por mL^[165]. Esta suspensão de bactérias eletrocompetentes foi congelada a -80°C em alíquotas de 50µL.

2.9. Transformação de bactérias *Escherichia coli* com DNA plasmideal por eletroporação

O DNA plasmideal de interesse (1 a 50ng) foi adicionado a uma alíquota de 50µL de bactérias eletrocompetentes. Para transformação, estas bactérias eletrocompetentes com DNA plasmideal, foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (gap 1mm). A cubeta foi deixada em gelo por alguns minutos. O eletroporador (EC100 Eletroporator) foi ajustado, conforme o manual do aparelho, para 1.800V. Colocou-se a cubeta no eletroporador e após a aplicação de um pulso, adicionou-se imediatamente às bactérias 1mL de meio LB. As bactérias foram incubadas a 37°C por 1h, sob agitação (agitação a 225rpm favorece a recuperação das bactérias). Por fim, as bactérias

transformadas foram plaqueadas em meio LB-A contendo 75µg/mL ampicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16-20 horas.

2.10. Preparação de DNA plasmideal de p65# e pOPI3-CAT a partir de bactérias transformadas

Uma colônia bem isolada de cada placa de bactérias transformadas, com os respectivos vetores, foi inoculada em 3mL de meio LB contendo 75µg/mL ampicilina e incubada a 37°C, sob agitação de 200-250rpm, por 16h. Um inóculo (1/100) destas pré-culturas foi crescido em 50mL de meio LB contendo ampicilina (75µg/mL) nas mesmas condições anteriores. Para a preparação dos DNAs plasmideais, em média escala, utilizou-se o Kit Flexi Prep (Amersham Pharmacia Biotech). Os DNAs foram quantificados por espectrofotometria a 260nm, sendo que uma OD₂₆₀ de 1 corresponde a 50µg/mL de DNA. A pureza desses DNAs foi estimada utilizando-se a relação 260nm/280nm, considerando-se uma pureza satisfatória uma relação 260nm/280nm de pelo menos 1,8. A identidade dos DNAs foi analisada através de digestões com enzimas de restrição apropriadas e eletroforese em gel 0,8% agarose, 1X TBE. Como padrão de peso molecular foi usado 1Kb DNA Ladder (Amersham Pharmacia Biotech ou MBI Fermentas).

2.11. Purificação dos vetores e insertos a partir do gel de agarose

Foram utilizadas as preparações de DNA plasmideal obtidas no item 2.10. Escolheu-se as enzimas de restrição apropriadas para linearizar o DNA e excisar o inserto e montou-se a reação de digestão, que foi incubada por 2,5 horas a 37°C e armazenada a -20°C. Uma alíquota desta preparação foi analisada em gel 0,8% agarose para confirmar a digestão e, em seguida, foi feito um gel preparativo e as bandas de interesse cortadas com lâmina estéril. Os insertos e vetores (RelA e pOPI3 defosforilado) foram removidos do gel por eletroeluição ou por Concert rapid Gel Extraction System (Life Technologies). Os DNAs assim obtidos foram quantificados e tiveram suas respectivas purezas avaliadas por espectrofotometria, como descrito no item 2.10., e uma alíquota

dos mesmos foi analisada em gel 1,0% agarose, 1X TBE. Como padrão de peso molecular foi usado 1kb DNA Ladder (Amersham Pharmacia Biotech ou MBI Fermentas).

2.12. Sub-clonagem do cDNA codificante da proteína RelA no vetor pOPI3

Primeiramente, os plasmídeos pOPI3-CAT e p65# foram digeridos com a enzima de restrição *Not* I.

O produto da reação de digestão do plasmídeo pOPI3-CAT foi, então, submetido a uma reação de defosforilação com a enzima fosfatase alcalina CIAP (Fosfatase alcalina de intestino de vitela - Life Technologies) a 37°C por 30 minutos. Esta reação de defosforilação foi inativada a 70°C por 10 minutos.

As reações de digestão do plasmídeo p65# e de defosforilação do plasmídeo pOPI3 foram submetidas a eletroforese em gel 1% agarose, 1X TBE. O vetor pOPI3 defosforilado (de 5,5Kbp) e o fragmento de 2,4Kbp correspondente ao cDNA RelA de camundongo foram purificados do gel por eletroeluição ou por Concert Rapid Gel Extraction System (Life Technologies), conforme descrito no item 2.11.

Para sub-clonagem do fragmento RelA no vetor pOPI3, seguiu-se com as reações de ligação vetor-inserto utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase. As reações de ligação foram incubadas a 16°C por 16h e a enzima foi inativada a 70°C por 10min.

Alíquotas das reações de ligação foram usadas para transformação de bactérias (XL1BlueMRF') por choque térmico ou por eletroporação, sendo que por eletroporação o produto de ligação foi dessalinificado por Microspin columns S-200 (Amersham Pharmacia Biotech).

2.13. PCR do produto de ligação

As reações de ligação foram analisadas por PCR. Foram usados 3 pares de "primers", sendo que o "primer" direto ou "forward" (F) é comum aos três pares desenhados. O "primer" F (5'-TGGTGGTGCAAATCAAAGAA-3') se anela ao vetor pOPI3-CAT, na região do "intron", próximo ao sítio de clonagem com a enzima de restrição *Not* I. Cada um dos 3 pares é diferenciado pelo "primer" reverso (R), como descrito a seguir:

- (1) "primer" R-vetor: 5'-CGGTATTGTCTCCTTCCGTG-3'. Se anela ao vetor pOPI3-CAT na região "TK polyA", próximo ao sítio de clonagem com a enzima de restrição *Not* I, e foi usado para checar o plasmídeo pOPI3-CAT, definindo um fragmento de 850bp, como controle da PCR.
- (2) "primer" R-S: 5'-CACTGTACCTGGAAGCAGA-3'. Complementar ao cDNA RelA, que quando inserido no vetor na orientação "sense", define um fragmento de 628bp.
- (3) "primer" R-AS: 5'-CCATGCTGATGGAGTACCCT-3'. Complementar ao cDNA RelA, que quando inserido no vetor na orientação "antisense", define um fragmento de 969bp.

As PCRs foram feitas em volume final de 20 μ L, contendo 1 μ L da reação de ligação (diluições de 1/10, 1/100 e 1/200), 1X tampão da enzima, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,5 μ M de cada "primer" (F e R) e 0,6U de Taq Polimerase (Amersham Pharmacia Biotech). A amplificação do DNA foi conduzida a (1) 95°C por 4min, (2) 95°C por 45seg, (3) 55°C por 45seg, (4) 72°C por 1,3min, (5) 72°C por 5min, sendo que os passos de 2 a 4 foram repetidos por 30 vezes. Para análise da PCR, uma alíquota da reação foi submetida a eletroforese em gel 1,5% agarose. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado em um transluminador UV e fotografado. Como padrão de peso molecular foi usado 1Kb DNA Ladder (Amersham Pharmacia Biotech ou MBI Fermentas).

2.14. Análise das colônias recombinantes

As bactérias *E. coli* foram transformadas com o produto da ligação pOPI3-RelA, conforme descrito no item 2.12. As colônias recombinantes, obtidas a partir desta transformação, foram inoculadas em 100µL de meio LB (contendo 75µg/mL ampicilina) e incubadas em estufa a 37°C por 16h. Estas culturas de bactérias foram congeladas em 15% glicerol a -80°C.

As colônias recombinantes foram analisadas por PCR ou através de uma mini-preparação plasmideal e digestão desta com a enzima de restrição apropriada.

2.14.1. PCR de colônia

Foram feitos dois conjuntos de PCR para cada colônia obtida. Um deles consistia na verificação da presença do cDNA que codifica RelA e o outro para verificar a orientação deste cDNA no vetor.

- (1) O par de "primers" utilizados para verificar a presença do cDNA que codifica para RelA foram 5'-CGCTGCTCTAGAACACAATGGCCACTTGTCG-3' e 5'-GCGGCCAAGCTTCAAGATCTGCCGAGTTG-3', os quais definem um fragmento de 176 pares de base. O meio reacional foi o mesmo já descrito no item 2.13. As condições reacionais foram (1) 95°C por 4min, (2) 95°C por 1min, (3) 58°C por 2min, (4) 72°C por 1min, (5) 72°C por 5min, sendo que os passos de 2 a 4 foram repetidos por 30 vezes.
- (2) Os pares de "primers" utilizados para verificar a orientação do inserto foram os mesmos utilizados no item 2.13., assim como foram os mesmos o meio e as condições reacionais.

Apenas um toque na cultura de bactérias com uma ponteira estéril (~ 1µL) e, logo em seguida, um toque no meio reacional foi necessário para se efetuar a PCR. A análise das PCRs foi feita por eletroforese em gel 1,5% ou 3% agarose. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em um transluminador UV. Como padrão de peso

molecular foram usados 1Kb ou 100bp DNA Ladder (Amersham Pharmacia Biotech ou MBI Fermentas).

2.14.2. Digestão com enzima de restrição

Primeiramente foi feita uma mini-preparação de DNA plasmideal das colônias recombinantes, utilizando o Kit GFX™ Micro Plasmid Prep (Amersham Pharmacia Biotech).

Estes DNAs plasmideais foram digeridos com a enzima de restrição *Bam*H I, em uma reação a 37°C por 2 horas. Esta enzima digere o cDNA de RelA em dois pontos, posições 296bp e 409bp, e digere o vetor pOPI3 também em 2 pontos, posições 2.842bp e 3.065bp.

2.14.3. Seqüenciamento

Os plasmídeos das colônias recombinantes foram purificados e sequenciados pelo método de Sanger, utilizando-se o Thermo Sequenase cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech). Foram usados "primers upstream" (F) e "downstream" (R) ao sítio de clonagem do vetor pOPI3.

- primer F: 5'-TGGTGGTGCAAATCAAAGAA-3'
- primer R: 5'-CGGTATTGTCTCCTTCCGTG-3'

2.15. Transfecção do plasmídeo pOPI3-RelA em células ST1 mediada por lipossomos e isolamento de clones transfectantes

Células ST1 foram plaqueadas em placas de Petri de 60mm de diâmetro (3x10⁵/placa), na presença de 5% FCS-DMEM.

Os DNAs (2µg) foram complexados aos lipossomos (12µL) em meio sem soro por 15min a temperatura ambiente, num volume final de 500µL, de acordo com instruções do fabricante (Lipofectamine Plus Reagent- Life Technologies).

O meio de cultura foi removido das placas e a cada cultura foi adicionada uma mistura DNA-lipossomo:

- (1) pOPI3-CAT
- (2) pOPI3-RelA
- (3) controle (sem adição de DNA)

Para a transfecção, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 4,5h. Soro foi, então, adicionado a cada cultura para 5% concentração final e as culturas foram incubadas em estufa a 37°C até o dia seguinte (~ 20h). Após este período, as culturas foram replaqueadas em diluições seriadas (1/100, 1/200, 1/400 e 1/1000) de cada placa original em meio seletivo contendo 1mg/mL geneticina (G418).

O meio seletivo contendo geneticina foi renovado a cada 3 dias por um período de 3 semanas. Com a morte de todas as células das placas que não receberam DNA e o aparecimento de colônias isoladas (G418^r) em algumas das diluições realizadas, iniciou-se o processo de clonagem celular.

O processo de clonagem celular foi realizado com anéis de aço de aproximadamente 3 a 4mm de diâmetro. Estes anéis de aço foram fixados sobre colônias isoladas em placas lavadas com PBSA. Estas colônias foram, então, tripsinizadas e passadas para uma bandeja de 48 poços e, depois, expandidas para placas de 60mm de diâmetro. Foram clonadas, ao acaso, aproximadamente 9 colônias isoladas da condição (1) e 12 colônias da condição (2) dos transfectantes.

2.16. Extração de proteínas celulares

Os lisados foram preparados a partir de culturas celulares, em placas de Petri de 100mm de diâmetro, mantidas em 5% FCS-DMEM até a confluência e, então, tratadas ou não com Hy (100ng/mL).

As células foram lavadas 2 vezes em PBSA, raspadas das placas em PBSA com o auxílio de um "cell scraper", transferidas para um tubo cônico e sedimentadas por centrifugação (236xg, 5min). O sedimento celular foi ressuspenso em 200µL de tampão RIPA e incubado em gelo por 30min, para lise celular. Esses lisados foram transferidos para tubos de microcentrífuga e centrifugados (15000xg, 30min) para remoção dos

detritos celulares. O sobrenadante, extrato protéico total, foi aliquoteado e estocado a -80°C . Todo processo foi realizado a 4°C . Alíquotas de $2\mu\text{l}$ de cada lisado foram submetidas a quantificação de proteínas pelo método de Bradford^[166] através do kit Bio-Rad Protein Assay.

2.17. Western blotting

As amostras de proteínas foram fervidas (100°C , 5min) em 1X tampão de amostra e aplicadas em gel 10% SDS-PAGE^[167]. Após a corrida, o gel foi colocado em tampão de transferência e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, via semi-seca, por eletroforese (90min, 500mA) em tampão de transferência^[165]. A membrana foi corada com Ponceau para localização das proteínas transferidas e, em seguida, descorada com água destilada.

Os sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose foram bloqueados com 1% leite-TBST a 4°C , durante a noite, sob agitação. A membrana foi, então, lavada com TBST (4 x 10min, temperatura ambiente, sob agitação) e incubada com o anticorpo de interesse diluído 1:4000 em TBST (2 horas, temperatura ambiente, sob agitação). Novamente a membrana foi lavada (4 x 10min com TBST, sob agitação) e, então, incubada com um segundo anticorpo (anti-IgG de coelho) conjugado com peroxidase diluído 1:20.000 em TBST (1 hora, temperatura ambiente, sob agitação). Após quatro lavagens com TBST (10min cada, sob agitação), a membrana foi revelada com sistema quimioluminescente (kit ECL-Amersham). Um filme de raioX foi exposto sobre a membrana até a obtenção do sinal adequado.

2.18. Curva de crescimento

5×10^4 células de cada linhagem celular foram plaqueadas em placas de Petri de 35mm e as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 /95% ar. O meio de cultura, 5% FCS-DMEM, foi renovado a cada três dias. No dia seguinte ao plaqueamento e a cada dois dias após o 1º dia, duplicatas das culturas de cada linhagem celular foram coletadas através de tripsinização e fixadas em solução 3,7% formaldeído-

PBSA. A contagem das suspensões de células foi realizada com o auxílio de um contador eletrônico modelo CC530 da CELM.

2.19. Crescimento em suspensão de agarose

Foram utilizadas soluções de agarose (1,2% e 0,6%), 2X DMEM e FCS. A agarose foi derretida e mantida em banho a 45°C. Foram misturados 2X DMEM, FCS e 1,2% agarose de modo a obter a chamada agarose dura (0,6% agarose em 10% FCS-DMEM). Esta solução foi distribuída em bandejas de 24 poços (0,5mL/poço). A agarose semi-sólida (0,3% agarose em 10% FCS-DMEM) foi mantida no banho 45°C. Uma suspensão de células foi preparada de modo a se obter células bem isoladas, para garantir que cada colônia se origine a partir de uma única célula. Diluições seriadas desta suspensão de células foram feitas, distribuindo-se as células (em duplicatas) nos poços, sobre a agarose dura. Rapidamente, colocou-se a agarose semi-sólida por cima das células. Após completa gelificação, a bandeja foi incubada em câmara úmida, 5% CO₂ a 37°C. No dia seguinte adicionou-se 0,5mL de meio de cultura líquido (10% FCS-DMEM) em cada poço. O meio de cultura líquido foi renovado a cada três dias e, ao final de duas semanas, as colônias foram fixadas com formaldeído e analisadas com o auxílio de um microscópio Nikon Diaphot invertido e com contraste de fase. Quantificou-se o crescimento através da contagem do número de colônias desenvolvidas em relação ao número de células plaqueadas (eficiência de plaqueamento em suspensão).

2.20. Extração de proteínas nucleares

As linhagens celulares ST1 e P7, foram plaqueadas em placas de Petri de 150mm de diâmetro. Os lisados foram preparados a partir de culturas sub-confluentes não-tratadas (controle) ou tratadas com curcumina (CCM), hidrocortisona (Hy) e/ou TNF- α na presença de 5% FCS-DMEM.

As células foram lavadas 2 vezes com PBS, removidas das placas em PBS, com o auxílio de um rodo de borracha e transferidas para um tubo cônico. Os tubos foram

centrifugados (236xg, 5min), o sobrenadante descartado e o sedimento celular ressuspense em 1ml de tampão hipotônico. As células foram sedimentadas por centrifugação (16.000xg, 15seg.). O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 400µL de tampão hipotônico e incubadas em gelo por 10min. As células foram lisadas por adição de 0,1% Nonidet P-40 e agitação por 30seg. na velocidade máxima do agitador de tubos. A suspensão foi centrifugada (16.000xg, 30seg.), obtendo-se assim a fração nuclear (sedimento) e a fração citoplasmática (sobrenadante). A fração citoplasmática foi descartada e o sedimento nuclear foi lavado com tampão hipotônico, sem que fosse quebrado. Os núcleos foram ressuspensos em 100µL de tampão de extração nuclear, incubados em gelo por 30min e centrifugados (17.500xg, 30min) para clarificação do lisado. O extrato nuclear obtido foi aliqotado e estocado a -80°C. Todo o processo foi realizado a 4°C.

Alíquotas do extrato nuclear foram submetidas a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (kit Bio-Rad Protein Assay).

2.21. Ensaio de mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA)

▪ Reação de marcação radioativa do oligonucleotídeo

Os oligonucleotídeos complementares utilizados contêm o sítios de reconhecimento dos complexos

NF-κB: 5' AGT TGAGGGG GAC TTT CCCAGG C 3'
 3' TCA ACTCCC CTG AAA GGGTCC G 5'

AP-1: 5' AAGCTATTGACTCATTCCGGTC 3'
 3' TTCGATACTGAGTAGGCCAG 5'

Cada oligonucleotídeo foi marcado através de fosforilação da extremidade 5' com [γ ^{32}P]-ATP, catalisada pela enzima T4 Polinucleotídeo Kinase, na seguinte reação:

- 1pmol de oligonucleotídeo;
- 1,5pmol de [γ ^{32}P]-ATP;
- 1U de T4 Polinucleotídeo Kinase;
- 1X tampão PNK.

A reação foi incubada a 37°C por 1 hora. Adicionou-se TE/0,1 M NaCl, para parar a reação. Fez-se, então, uma extração fenol/clorofórmio (1:1) e a fração aquosa foi purificada em MicroSpin S-300 HR Columns (Pharmacia).

▪ **Reação de ligação DNA-proteína e eletroforese em gel de poliacrilamida**

As reações foram preparadas em gelo, contendo:

- 5 μg de proteína do extrato nuclear;
- 6 μg de DNA de timo;
- 1pmol de oligonucleotídeo marcado com ^{32}P ;
- 5 μL de tampão de amostra.

A seguir, foram incubadas a 30°C por 15min. Adicionou-se 2 μL de uma solução de azul de bromofenol em TE/50% glicerol, a cada reação.

As amostras foram aplicadas em gel 4% poliacrilamida (30 poliacrilamida: 1 bisacrilamida) em 0,4X TBE (pré-corrido a 100V por 2 horas) e submetidas a eletroforese a 170V (30mA). Após a corrida, o gel foi seco a vácuo a 80°C por 2 horas. Sobre o gel foi exposto um filme de raioX a -80°C até obtenção do sinal adequado.

2.22. Ensaio de atividade mitogênica

As células foram plaqueadas em uma bandeja de 24 poços (10⁴ células/mL) usando-se 1mL/poço de 5% FCS-DMEM. As culturas celulares foram, então, tratadas com CCM, Hy e/ou TNF- α ou carenciadas. 12-18 horas antes de lisar as células, timidina tritiada foi adicionada ao meio de cultura (na concentração final 2,5 $\mu\text{Ci/mL}$), para incorporação ao DNA.

O meio de cultura foi removido e as culturas foram lavadas 2 vezes com 5% TCA gelado. As células foram lisadas com 0,4mL/poço de 0,5M NaOH e incubadas a 37°C por 30min. A seguir, colocou-se, em cada poço, um papel de filtro grosso de 1,0x1,5cm, numerado, para absorção do material.

Os filtros foram lavados, sucessivamente, 1x com 5% TCA gelado, 2x com 90% álcool gelado e 1x com acetona. Após secagem em estufa, cada filtro foi colocado em frascos de cintilação (numerados) com 3mL de líquido de cintilação/frasco e a radioatividade incorporada em DNA foi medida em um contador de cintilação (Hewlett-Packard).

2.23. Fixação e coloração celular com azul de toluidina

Culturas de células crescidas sobre lamínulas foram fixadas e permeabilizadas com metanol a -20°C, por 10min, seguido por duas lavagens com PBSA gelado. Após fixação, as células foram lavadas em PBSA e coradas com solução de azul de toluidina em tampão Mc Ilvaine pH 4,0.

2.24. Soluções

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, segundo formulações descritas em manuais de laboratório^[165,168].

- *PBSA (Tampão Salina Fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+}), pH 7,2*
137mM NaCl; 2,7mM KCl; 8,0mM Na_2HPO_4 ; 1,4mM KH_2PO_4
- *Ponceau*
0,1% Ponceau; 10% ácido acético glacial
- *Tampão de amostra para proteínas (3 vezes concentrado)*
150mM Tris-HCl, pH 6,8; 3% SDS; 30% glicerol; 15% β -mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol

- *Solução de azul de toluidina*
0,025% azul de toluidina em tampão Mc Ilvaine, pH 4,0
- *Tampão de competência*
20mM NaAc; 0,1M CaCl₂; pH6,5
- *Tampão de corrida para SDS-PAGE*
25mM Tris-base; 250 mM glicina (pH 8,3); 0,1% SDS
- *Tampão de extração nuclear*
20mM Hepes, pH 7,9; 0,4M NaCl; 1,0mM EDTA; 1,0mM EGTA; 1,0mM DTT;
1,0mM PMSF; 2µg/mL aprotinina; 2µg/mL leupeptina
- *Tampão de ligação DNA-proteína*
20mM HEPES, pH 7,9; 20% glicerol; 100mM KCl; 0,2mM EDTA; 1,0mM PMSF;
0,5mM DTT
- *Tampão de transferência pH 8,3 para Western blot*
48mM Tris-base; 39mM glicina; 0,037% SDS; 20% metanol
- *Tampão Hipotônico*
10mM Hepes, pH 7,9; 10mM KCl; 0,1mM EDTA; 0,1mM EGTA; 1,0mM DTT;
1,0mM PMSF; 2µg/mL aprotinina; 2µg/mL leupeptina
- *Tampão RIPA sem SDS*
10mM Tris-HCl, pH 7,5; 1% deoxicolato de sódio, 1% Nonidet P-40; 150mM NaCl;
1mM ortovanadato de sódio; 1mM PMSF; 2µg/mL aprotinina; 2µg/mL leupeptina
- *TBE (Tampão Tris-Borato-EDTA) - 5 vezes concentrado*
446mM Tris-base; 445mM ácido bórico; 10mM EDTA; pH8,0
- *TBS (Tampão Tris-Salina)*
150mM NaCl; 50mM Tris-Cl; pH 7,5
- *TBST (Tampão Tris-Salina-Tween)*
1% Tween-20 em TBS
- *TE (Tampão Tris-EDTA)*
10mM Tris-Cl; 1mM EDTA; pH8,0

3. Resultados

3.1. Análise do envolvimento da proteína RelA na proliferação de células ST1

O ensaio funcional proposto, para determinar a relevância da subunidade RelA de NF- κ B na reversão fenotípica induzida por glicocorticóides, consiste em bloquear a expressão desta proteína, na linhagem ST1, através de uma construção "antisense", com o intuito de promover a expressão do mRNA correspondente à sequência complementar ao gene *rela*. Para tanto, um fragmento *Not* I de 2,44Kbp, correspondente à região que codifica o cDNA *rela*, foi subclonado, na orientação reversa, no vetor pOPI3, de expressão em mamíferos, dando origem à construção pOPI3-RelA(as).

3.1.1. Sub-clonagem do cDNA codificante da proteína RelA no vetor de expressão em mamífero pOPI3

Primeiramente, foi necessário preparar os plasmídeos pOPI3CAT, de expressão em mamíferos, e p65#, que contém o cDNA correspondente a RelA de camundongo. O fragmento de 2,4Kbp, correspondente ao cDNA RelA de camundongo, foi removido do plasmídeo p65# e o vetor pOPI3 (5,5Kbp) teve sua porção CAT (777bp) removida, ambos através de digestão com a enzima de restrição *Not* I. Após a digestão, o fragmento correspondente a RelA foi separado e purificado através de eletroforese em gel preparativo de 1% agarose. O vetor pOPI3 foi desfosforilado, por tratamento com a enzima fosfatase alcalina CIAP, separado por eletroforese em gel preparativo 1% agarose e purificado. A Figura 5 mostra os resultados de digestão, separação e purificação dos fragmentos de interesse (pOPI3 e RelA). Os fragmentos obtidos apresentaram os tamanhos esperados.

A ligação entre o vetor pOPI3 desfosforilado e o cDNA correspondente a RelA foi feita, utilizando-se T4 DNA Ligase e alíquotas do vetor e do inserto RelA, numa relação molar inserto:vetor entre 2:1 e 5:1, em uma reação a 16°C por 16h. Testes de clivagem e re-ligação foram realizados tanto com pOPI3 como com p65#. Foi utilizado, como

controle da reação de ligação, a re-ligação do vetor pOPI3 aberto, e, como controle da reação de desforilação, a re-ligação do vetor desfosforilado. Para checar a ligação, foram desenhados "primers" que reconhecem uma região "upstream" ao sítio de clonagem no vetor pOPI3 e uma porção interna do cDNA RelA clonado.

Figura 5. Análise do vetor pOPI3 desfosforilado e do fragmento correspondente ao cDNA de RelA. (1) vetor pOPI3 desfosforilado de aproximadamente 5,5Kbp. (2) fragmento correspondente a RelA de cerca de 2,4Kbp. As reações foram fracionadas por eletroforese em gel 1% agarose, 1X TBE.

A Figura 6 apresenta os resultados da análise da reação de ligação pOPI3-RelA por PCR. Nos canais 1, 2 e 3 foram utilizadas diluições 1/10, 1/100 e 1/200 da ligação numa reação com o par de "primers" (ver item 2.13) que amplifica um fragmento de 628bp, quando ocorre a inserção do inserto no vetor na orientação "sense". No canal 4 utilizou-se 1µL da ligação numa reação com o par de "primers" que amplifica um fragmento de 969bp, quando ocorre a inserção do inserto no vetor na orientação "antisense". No canal 5, como controle positivo da PCR, foi utilizada uma alíquota de 1,8ng do vetor pOPI3CAT e um par de "primers" que flanqueia o sítio de inserção do fragmento CAT, o qual amplifica um fragmento de 850pb. Os fragmentos obtidos foram todos do tamanho esperado, sendo que, analisando-se a intensidade das bandas obtidas

para as diluições da ligação utilizadas na PCR, pode-se se ter uma idéia da eficiência da etapa de ligação, já que quando a etapa de ligação não é eficiente, não é possível observar os fragmentos de amplificação a partir da diluição de 1/100.

Figura 6. Análise da reação de ligação pOPI3-RelA, por PCR. (1), (2) e (3) fragmento amplificado de 628bp do vetor+inserto inserido na orientação "sense". (4) fragmento amplificado de 969pb do vetor+inserto inserido na orientação "anti-sense". (5) fragmento amplificado de 850pb do vetor pOPI3CAT, como controle positivo da PCR. As reações foram fracionadas por eletroforese em gel 1,5% agarose, 1X TBE.

3.1.2. Estabelecimento e caracterização de bactérias recombinantes contendo a construção pOPI3-RelA

3.1.2.1. Transformação de bactérias com a construção pOPI3-RelA

Bactérias *E. coli* foram transformadas por eletroporação. Antes da transformação por eletroporação, as reações de ligação foram dessalinizadas através de colunas Microspin columns S-200 (Amersham Pharmacia) e volumes variando desde uma alíquota até todo o volume recuperado, foram utilizados. Foram feitas transformações com os produtos das reações de ligação pOPI3-RelA, re-ligação do vetor pOPI3 aberto e re-ligação do vetor pOPI3 desfosforilado. Como controle positivo da transformação, uma alíquota de cada preparação de bactérias competentes foi transformada com os plasmídeos pOPI3CAT e p65# fechados.

Diversas transformações foram realizadas, obtendo-se, em média, 9 colônias recombinantes/transformação, as quais eram negativas para a presença do cDNA correspondente a RelA. A linhagem bacteriana utilizada foi mudada, então, de Dh5 α para XL1BlueMRF'. Esta linhagem apresentou uma eficiência de transformação por eletroporação de, aproximadamente, 10^8 transformantes/ μ g de DNA, utilizando-se o vetor pOPI3CAT, estando dentro da faixa de eficiência esperada, segundo Sambrook *et al*.^[165]. Novas transformações com o produto da ligação pOPI3-RelA foram feitas, obtendo-se 73 colônias no total.

3.1.2.2. Análise das colônias recombinantes por PCR

Todas as colônias recombinantes obtidas foram analisadas por PCR para verificar a presença do inserto RelA e a orientação deste no vetor pOPI3, utilizando-se os pares de "primers" e as condições já descritas no item 2.14.1. Conforme apresentado na Figura 7, apenas 3 colônias confirmaram a presença do cDNA de RelA inserido no vetor pOPI3, sendo que a inserção ocorreu na orientação "antisense" (canais C4, E7 e F3 da Fig. 7-A). Para cada colônia foram realizadas duas PCRs, uma para analisar se o inserto se inseriu na orientação "antisense" (Figura 7-A) e, a outra, para analisar se o inserto se inseriu na

orientação "sense" (Figura 7-B). Como controle positivo da PCR, nos canais X, foi aplicada uma pequena alíquota do vetor pOPI3CAT (1,8ng), amplificando um fragmento de 850bp.

Figura 7. Análise das colônias recombinantes quanto a orientação do cDNA de RelA no vetor pOPI3, por PCR. Foram analisadas 73 colônias (A1-G3) e o vetor pOPI3CAT (X), como controle da PCR. (A) representa PCRs utilizando "primers" que amplificam o fragmento de 969bp, correspondente a inserção do cDNA no vetor na orientação "anti-sense". (B) PCRs utilizando "primers" que amplificam o fragmento de 628bp, correspondente a inserção do cDNA no vetor na orientação "sense". As reações foram fracionadas por eletroforese em gel 1,5% agarose, 1X TBE.

3.1.2.3. Análise da orientação do inserto de cDNA RelA no vetor pOPI3

3.1.2.3.1. por digestão com enzima de restrição

Para confirmar o resultado obtido por PCR, preparações de DNA plasmídeos dos clones recombinantes, positivos para a presença de RelA inserido na orientação "antisense" no vetor pOPI3, foram analisados, através da digestão com a enzima de restrição *BamH* I. Esta enzima digere o cDNA de RelA em dois pontos, a 296bp e 409bp, e digere o vetor pOPI3 também em 2 pontos, a 2,8Kbp e 3,0Kbp. Os possíveis fragmentos liberados após digestão do plasmídeo com *BamH* I estão listados na tabela abaixo:

Inserção do cDNA RelA no vetor pOPI3	Tamanhos dos fragmentos liberados após digestão do plasmídeo com <i>BamH</i> I
orientação "sense"	7,3Kbp, 338bp, 223bp e 113bp
orientação "antisense"	5,5Kbp, 2,1Kbp, 223bp e 113bp

Como pode ser observado na Figura 8, as 3 colônias analisadas (canais 3, 4 e 5) apresentaram os fragmentos de 5,5Kbp e 2,1Kbp, confirmando que o cDNA de RelA se encontra na orientação "antisense". Não foi possível visualizar as bandas de 223bp e 113bp devido a concentração do gel de agarose utilizada nesta análise (gel 1% agarose). No canais 1 e 2 foram utilizadas, respectivamente, alíquotas da digestão dos vetores pOPI3CAT e p65# com a enzima de restrição *BamH* I, como controle da reação de digestão. A digestão do vetor pOPI3CAT (canal 1) produz os fragmentos de 6,1Kbp e 223pb (não visualizado no gel) e a digestão do vetor p65# (canal 2) produz os fragmentos de 5,0Kbp, 3,2Kbp, 2,0Kbp, 315bp e 113bp (os dois últimos não visualizados no gel). Os fragmentos de maior peso molecular que aparecem nos canais 1, 2 e 5 são, provavelmente, devidos a digestão parcial.

Figura 8. Análise da orientação do inserto RelA no vetor pOPI3 por digestão com a enzima de restrição *BamH* I. (1) plasmídeo pOPI3CAT (~200ng) como controle, produzindo os fragmentos esperados de 6,1Kbp e 223bp (ausente neste gel). (2) plasmídeo p65# (~200ng) como controle, produzindo os fragmentos esperados de 5,0Kbp, 3,2Kbp, 2,0Kbp, 315bp e 113bp (os dois últimos ausentes neste gel). (3), (4) e (5) colônias obtidas positivas para a presença de RelA, obtendo-se os fragmentos de 5543 e 2057bp, evidenciando a orientação "antisense" de RelA. As reações foram fracionadas por eletroforese em gel 1% agarose, 1X TBE

3.1.2.3.2. por seqüenciamento

Os plasmídeos dos clones recombinantes, que se mostraram positivos para a presença de RelA inserido na orientação "antisense" no vetor pOPI3, foram purificados e seqüenciados pelo método de Sanger (Figura 9), utilizando-se o Thermo Sequenase cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech). Esta etapa permitiu a confirmação da integridade do cDNA de RelA, bem como sua orientação, no plasmídeo recombinante obtido (Figuras 10-A e -B).

Figura 9. Análise da orientação do inserto de cDNA RelA no vetor pOPI3 através de seqüenciamento. C4, F3 e E7 correspondem a três colônias recombinantes.

A.

ref|NM_009045.1| Mus musculus avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene homolog A (Rela), mRNA
Length = 2424

Score = 184 bits (93), Expect = 3e-45
Identities = 93/93 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cagcgtgataagacattttattagttcagagctagaaagagcaagagtccaatagcttttt 60
|||||
Sbjct: 2424 cagcgtgataagacattttattagttcagagctagaaagagcaagagtccaatagcttttt 2365

Query: 61 cagtaaaggctgtcttgtggctgagcatctagc 93
|||||
Sbjct: 2364 cagtaaaggctgtcttgtggctgagcatctagc 2332

gb|M61909.1|MUSNFKP65 Mouse transcription factor p65 (NF-kappa-B p65) mRNA, complete cds
Length = 2424

Score = 184 bits (93), Expect = 3e-45
Identities = 93/93 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cagcgtgataagacattttattagttcagagctagaaagagcaagagtccaatagcttttt 60
|||||
Sbjct: 2424 cagcgtgataagacattttattagttcagagctagaaagagcaagagtccaatagcttttt 2365

Query: 61 cagtaaaggctgtcttgtggctgagcatctagc 93
|||||
Sbjct: 2364 cagtaaaggctgtcttgtggctgagcatctagc 2332

B.

ref|NM_009045.1| Mus musculus avian reticuloendotheliosis viral (v-rel)
 oncogene homolog A (Rela), mRNA
 Length = 2424

Score = 111 bits (56), Expect = 5e-23
 Identities = 96/96 (100%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 1 tgggctcagctgcgacccccggccccgccccgggaccctgaccatggacgatctgtttcc 59
 ||
 Sbjct: 18 tgggctcagctgcgacccccggccccgccccgggaccctgaccatggacgatctgtttcc 77

Query: 60 cctcatctttccctcagagccagcccaggcttctgg 91
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 78 cctcatctttccctcagagccagcccaggcttctgg 113

gb|M61909.1|MUSNFKP65 Mouse transcription factor p65 (NF-kappa-B p65) mRNA,
 complete cds
 Length = 2424

Score = 111 bits (56), Expect = 5e-23
 Identities = 96/96 (100%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 1 tgggctcagctgcgacccccggccccgccccgggaccctgaccatggacgatctgtttcc 59
 ||
 Sbjct: 18 tgggctcagctgcgacccccggccccgccccgggaccctgaccatggacgatctgtttcc 77

Query: 60 cctcatctttccctcagagccagcccaggcttctgg 91
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 78 cctcatctttccctcagagccagcccaggcttctgg 113

Figura 10. Alinhamento múltiplo contra o banco não-redundante do GeneBank (BlastN) da sequência do cDNA do gene *rela*. BlastN da leitura do sequenciamento do cDNA clonado no vetor pOPI3, a partir de reações utilizando (A) um "primer upstream" ou F e (B) um "primer downstream" ou R ao sítio de clonagem, confirmando a identidade e orientação do cDNA de *rela* no vetor pOPI3.

3.1.3. Estabelecimento e caracterização de clones celulares que expressam a construção pOPI3-RelA

3.1.3.1. Transfecção, mediada por lipossomos, do plasmídeo pOPI3-RelA em células ST1

Células ST1 foram transfectadas com os plasmídeos pOPI3CAT ou pOPI3-RelA complexados a lipossomos, em 3 experimentos independentes. Das duas primeiras transfecções não foi possível isolar clones, uma vez que não ocorreu morte celular nas placas controle, ou seja, de células ST1 que não foram transfectadas com o marcador genético (G418^r), ao final do período de seleção (3 semanas), variando-se a concentração do antibiótico do meio seletivo de 0,5 a 1mg/mL. Adquirindo-se um novo antibiótico, uma nova transfecção foi feita. O meio seletivo contendo geneticina foi renovado a cada 3 dias por um período de 3 semanas, obtendo-se a morte de todas as células das placas controle. A seleção dos transfectantes de ST1 com os plasmídeos pOPI3CAT ou pOPI3-RelA foi feita a partir do aparecimento de colônias isoladas (G418^r) em algumas das diluições realizadas, iniciando-se o processo de clonagem celular.

Foram clonadas, ao acaso, aproximadamente 9 colônias isoladas de células ST1 transfectadas com o vetor pOPI3CAT e 12 colônias de células ST1 transfectadas com o plasmídeo pOPI3-RelA. Estes clones foram expandidos para posterior rastreamento dos clones expressando mRNA "antisense" de RelA.

3.1.3.2. Análise, por PCR, dos DNAs genômicos dos clones celulares

A identidade do vetor transfectado nos diferentes clones isolados foi verificada através de ensaios de PCR de DNA genômico dos clones, usando "primers" que flanqueiam o sítio de inserção do cDNA de RelA no vetor pOPI3, os quais definem um fragmento de, aproximadamente, 2,6Kbp no caso da inserção do vetor pOPI3-RelA, ou de 800bp, se o vetor inserido for o pOPI3CAT. Os resultados, apresentados na Figura

11, mostram que os clones celulares apresentam exatamente os vetores esperados integrados em seu genoma.

Figura 11. Análise por PCR dos DNAs genômicos dos clones celulares, transfectados com o vetor pOPI3-RelA(as) ou o vetor parental pOPI3CAT. Utilizou-se um par de primers que reconhece as regiões flanqueadoras do sítio de clonagem do vetor pOPI3. A2 e E7 correspondem ao "pool" de células ST1 transfectadas com o vetor parental ou o vetor pOPI3-RelA(as), respectivamente. A linhagem parental ST1 foi utilizada como controle. As reações foram fracionadas por eletroforese em gel 1% agarose, 1X TBE

3.1.4. Análise da expressão da proteína RelA nos clones isolados através de ensaios de Western blot

Com o objetivo de analisar o possível papel da proteína RelA na reversão fenotípica tumoral→normal induzida por hormônios glicocorticóides, células ST1 foram transfectadas, de forma constitutiva, com o vetor de expressão pOPI3 contendo o cDNA de RelA sub-clonado na orientação "antisense". A partir das células ST1 transfectadas com o vetor parental (pOPI3CAT), foram isolados 9 clones e, a partir das células ST1

transfectadas com o vetor de expressão pOPI3-RelA(as), foram isolados 12 clones. O nível de expressão de RelA nos clones isolados foi analisado por Western blot.

Para os ensaios de Western Blot foi utilizado o anticorpo policlonal anti-NF- κ B p65 subunidade da BIOMOL Research Laboratories, Inc., ao qual nos referiremos como anti-RelA. A padronização do ensaio, para minimizar a reação de fundo, foi feita variando-se a concentração do anticorpo na solução de "blotting", bem como a concentração de leite da solução de bloqueio e o tempo de bloqueio da membrana, chegando-se a uma condição considerada ideal, apresentada em Material e Métodos.

Os clones isolados foram sub-cultivados no meio seletivo até atingirem densidade suficiente para congelamento. Para extração de proteínas, os clones foram descongelados e mantidos em meio sem agente seletivo.

As preparações de extrato protéico celular dos clones celulares foram obtidas, a partir de lise celular com tampão RIPA, e submetidas a SDS-PAGE. Como controle, foi utilizado extrato protéico celular da linhagem parental ST1. As proteínas fracionadas, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada e incubada com o anticorpo anti-RelA. Para verificação das proteínas transferidas, as membranas preparadas foram coradas com Ponceau. Os resultados estão mostrados nas Figuras 12 e 13.

Pode-se observar, na Figura 12, que todos os clones "antisense", pOPI3-RelA(as), expressam a proteína RelA (65KDa), porém a maioria apresenta uma tendência a possuir níveis menores (clones ST1-RelA(as)-1, -2, -3, -4, -5, -6, -8, -9, -10, -11, -12) quando comparados com a linhagem parental ST1. A diferença entre os níveis de expressão de RelA apresentados pelos clones celulares foi quantificada por densitometria, utilizando-se o programa ImageQuant (Molecular Dynamics).

A Figura 13 apresenta a análise da expressão da proteína RelA dos clones ST1-pOPI3CAT e das populações mistas A2 e E7, derivadas da transfecção de células ST1 com o vetor pOPI3CAT e pOPI3-RelA, respectivamente. Observa-se que não há diferença de expressão entre as populações A2 e E7. Todos os clones ST1-pOPI3CAT apresentam expressão de RelA e, ao contrário dos clones ST1-RelA(as), os níveis de expressão de RelA, na maioria dos clones, não são menores quando comparados com a linhagem parental ST1.

Figura 12. Análise da expressão da proteína RelA por Western blotting em células ST1 transfectadas com a construção pOPI3-RelA(as). Canais 1-12: clones celulares isolados a partir da transfecção de células ST1 com o vetor pOPI3-RelA(as). A linhagem parental ST1 foi utilizada como controle. Extratos celulares foram obtidos a partir de culturas mantidas em 5% FCS-DMEM. Em cada canal foram aplicados 100µg de extrato protéico celular.

Figura 13. Análise da expressão da proteína RelA por Western blotting em células ST1 transfectadas com o vetor pOPI3CAT. Canais 1-9: clones celulares isolados a partir da transfecção de células ST1 com o vetor pOPI3CAT. A2 e E7 correspondem ao "pool" de células ST1 transfectadas com o vetor parental ou o vetor pOPI3-RelA(as), respectivamente. A linhagem parental ST1 foi utilizada como controle. Extratos celulares foram obtidos a partir de culturas mantidas em 5% FCS-DMEM. Em cada canal foram aplicados 100µg de extrato protéico celular.

3.1.5. Análise da inibição da expressão da proteína RelA na proliferação de células ST1

3.1.5.1. Análise da curva de crescimento dos clones celulares

A proliferação celular destes clones celulares foi analisada através de curvas de crescimento em meio contendo 5% FCS e os resultados são mostrados nas Figuras 14 e 15. De forma geral, a maioria dos clones ST1-RelA(as) apresentam taxas de crescimento inferiores àquela apresentada pela célula parental ST1 (Fig 14). Contudo, não foi possível correlacionar a expressão de RelA com a diminuição da proliferação celular, pois alguns clones ST1-pOPI3CAT também apresentaram taxas de crescimento menores quando comparados com a célula parental ST1 (Fig 15).

Figura 14. Curva de crescimento dos clones celulares obtidos após transfecção de células ST1 com o vetor pOPI3-RelA(as). As células foram plaqueadas e cultivadas em 5% FCS-DMEM. Duplicatas de cada clone celular foram coletadas por tripsinização nos tempos indicados e o número de células, de cada ponto, contado com o auxílio de um contador eletrônico de células CELM.

Figura 15. Curva de crescimento dos clones celulares obtidos após transfecção de células ST1 com o vetor pOP3CAT. As células foram plaqueadas e cultivadas em 5% FCS-DMEM. Duplicatas de cada clone celular foram coletadas por tripsinização nos tempos indicados e o número de células, de cada ponto, contado com o auxílio de um contador eletrônico de células CELM.

3.1.5.2. Análise dos clones celulares quanto à eficiência de formação de colônias em suspensão de agarose

Os clones celulares foram comparados quanto à eficiência de formação de colônias em suspensão de agarose (Figura 16). Nestes experimentos, cada linhagem celular foi plaqueada em baixa densidade, em substrato semi-sólido e as colônias formadas foram contadas após 15 dias em cultura. Verifica-se que, tanto os clones ST1-pOPI3CAT quanto os clones ST1-RelA(as) apresentaram uma eficiência de formação de colônia menor, quando comparados à linhagem parental ST1, impossibilitando qualquer conclusão a respeito do efeito da inibição da expressão de RelA na proliferação de células ST1.

Figura 16 Análise da proliferação dos clones transfectados com o vetor pOPI3-RelA(as) ou o vetor parental por ensaio de crescimento em suspensão de agarose. 10^2 células foram plaqueadas em 0.6% agarose-DMEM-10%FCS e recobertas com 0.3% agarose-DMEM -10% FCS. As colônias formadas foram fixadas e contadas após 15 dias em cultura, com o auxílio de um microscópio Nikon Diaphot invertido, sob contraste de fase.

BRUNO LOPES DE ALMEIDA
 Mestrando em Microbiologia
 Universidade de São Paulo

3.2. Análise da atividade do complexo de transcrição AP-1 em células ST1 de glioma de rato sob ação de hidrocortisona

A repressão transcricional mediada por GR envolvendo interação física entre GR e AP-1, bem como entre GR e NF- κ B, tem sido amplamente descrita (Tabela 1).

Para analisar se AP-1 e NF- κ B estariam atuando de forma sinérgica na reversão fenotípica tumoral→normal mediada por glicocorticóides em células ST1, a atividade AP-1, como será referida a capacidade de ligação do complexo AP-1 ao seu elemento responsivo no DNA *in vitro*, foi analisada em células ST1, sob a ação do glicocorticóide hidrocortisona, através de ensaio de mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA). Nestes ensaios foram utilizados extratos nucleares da linhagem ST1 e oligonucleotídeos sintéticos, correspondentes à região consenso AP-1, marcados com 32 P, conforme descrito em Material e Métodos. Estes oligonucleotídeos possuem o sítio de ligação para os complexos AP-1, homo- e heterodímeros, formados pelas proteínas Fos e Jun.

É possível observar, na Figura 17, que a atividade AP-1, nas células ST1, é modulada negativamente por hidrocortisona (canais 3, 4 e 5), dependendo do tempo de exposição das células ao hormônio.

Figura 17. Repressão da atividade AP-1 mediada por Hy na linhagem celular ST1. Análise por EMSA a partir de extratos nucleares obtidos de culturas, mantidas em 5% FCS-DMEM, não-tratadas (controle) e tratadas com Hy (100ng/mL) por períodos de tempo indicados.

3.3. Estudo da ação de curcumina na atividade NF- κ B apresentada pelas células ST1 e P7

Inibidores da via de Rel/NF- κ B incluem uma variedade de moléculas naturais ou desenhadas, que atuam como anti-oxidantes, inibidores de proteassomo e protease, inibidores de fosforilação e/ou degradação de I κ B, inibidores da translocação de NF- κ B, entre outros^[169].

Hidrocortisona, uma droga anti-inflamatória, é capaz de inibir atividade NF- κ B em células ST1, mas não em células P7^[163]. Alguns autores sugerem que a inibição de NF- κ B por hidrocortisona se dá via interação física entre GR e a proteína RelA^[80,130,142,143].

Curcumina (diferuloilmetano, CCM), um composto isolado do rizoma *Curcuma longa*, é um agente anti-inflamatório e anti-carcinogênico^[170,171] que também inibe NF- κ B, diferentemente de hidrocortisona, em um passo anterior à fosforilação de I κ B^[171]. Assim, torna-se interessante analisar o efeito de curcumina sobre a atividade NF- κ B apresentada pelas células P7.

O efeito de curcumina sobre a atividade de ligação ao DNA do complexo NF- κ B foi analisado por EMSA, a partir de extratos nucleares obtidos de culturas de células ST1 e P7 tratadas com 20 e 30 μ M curcumina, respectivamente. Os resultados são apresentados nas Figuras 18 e 19.

Na Figura 18 (canal 6 comparado ao canal 2 e canais 7 e 8 comparados ao canal 1) pode-se observar que curcumina, numa concentração de 20 μ M, foi capaz de inibir tanto a atividade basal como a atividade induzida por TNF do complexo NF- κ B (I) apresentado pelas células ST1. Por outro lado, como pode ser visto na Figura 19, curcumina (30 μ M) não teve efeito inibitório sobre a atividade NF- κ B apresentada pelas células P7.

Figura 18. Repressão da atividade NF-κB mediada por Hy e CCM na linhagem celular ST1. A atividade de ligação a DNA foi analisada por EMSA, utilizando extratos nucleares obtidos de culturas de células ST1, mantidas em 5% FCS-DMEM, sob as condições de tratamento indicadas. TNF-α (2,5ng/mL); Hy (100ng/mL); CCM (20μM).

Figura 19. Análise do efeito de Hy e CCM sobre a atividade NF-κB na linhagem celular P7 por EMSA. Extratos nucleares foram obtidos a partir de culturas mantidas em 5% FCS-DMEM, sob as condições de tratamento indicadas. TNF-α (2,5ng/mL); Hy (100ng/mL); CCM (30μM).

3.4. Estudo do efeito de agentes inibidores de NF- κ B na proliferação celular

As linhagens celulares ST1 e P7 são tumorigênicas e apresentam atividade NF- κ B basal alta. Para analisar o papel do fator de transcrição NF- κ B no controle da proliferação celular, células ST1 e P7 foram tratadas com os inibidores de NF- κ B, hidrocortisona e curcumina, e o efeito destes agentes na proliferação celular foi analisado através de ensaios de incorporação de 3 H-timidina ao DNA.

Três experimentos independentes, apresentados na Figura 20, mostram que curcumina diminui o crescimento celular da linhagem ST1, de forma dose dependente. Os dados destes três experimentos independentes foram resumidos na Tabela 3. Esta tabela mostra a porcentagem relativa média de cada condição de tratamento comparada à condição controle (sem tratamento). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Como esperado, podemos observar também, na mesma Figura 20, que hidrocortisona diminui a incorporação de timidina ao DNA em relação à condição controle (sem tratamento) nas células ST1.

Resultados preliminares, de um ensaio em triplicata, indicam que curcumina também é capaz de inibir o crescimento celular da linhagem P7 (Figura 21).

Figura 20. Análise do efeito de Hy, TNF- α e CCM na proliferação de células ST1. As células foram mantidas em 5% de soro, tratadas com CCM (10 e 20µM), Hy (100ng/mL) e/ou TNF- α (2,5ng/mL) ou, ainda, carenciadas e submetidas ao ensaio de incorporação de ^3H -timidina ao DNA. Os dados foram analisados estatisticamente através dos Testes F e P, sendo * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$.

Figura 21. Análise do efeito de CCM na proliferação de células P7. As células foram mantidas em 5% de soro, tratadas com CCM (10µM) e submetidas ao ensaio de incorporação de ^3H -timidina ao DNA.

3.5. Estudo do efeito de TNF- α no crescimento das células ST1

Com o objetivo de analisar se a indução de NF- κ B por TNF- α interfere no efeito de hidrocortisona na proliferação de células ST1, estas células foram tratadas com Hy e/ou TNF- α e submetidas ao ensaio de incorporação de timidina tritiada ao DNA.

A Figura 20 mostra que TNF- α induz um aumento da proliferação de células ST1, de 15 a 20%, dependendo do tempo de exposição das células à citocina. Quando as células foram tratadas com hidrocortisona e TNF- α , verificou-se que também há um aumento de 15 a 30% da incorporação de timidina ao DNA em relação à condição de tratamento apenas com hidrocortisona. A análise estatística desses dados foi feita, indicando que este aumento é significativo. Os dados estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Efeito de Hy, TNF- α e CCM na proliferação de células ST1. Média de 3 experimentos independentes.

Condições	Porcentagem Relativa
controle	100
10 μ M CCM 18h	67,4
10 μ M CCM 24h	39,7
10 μ M CCM 48h	36,8
20 μ M CCM 18h	32,3
20 μ M CCM 24h	18,8
20 μ M CCM 48h	12,9
Hy 18h	86,2
Hy 24h	77,8
Hy 48h	40,4
TNF- α 18h	121
TNF- α 24h	110,7
TNF- α 48h	116,4
Hy + TNF- α 18h	116,3
Hy + TNF- α 24h	91,9
Hy + TNF- α 48h	67,3
0,2% FCS 18h	67,5
0,2% FCS 24h	44,8
0,2% FCS 48h	36,8

3.6. Análise morfológica das células ST1 e P7 na presença de hidrocortisona e TNF- α para avaliação de apoptose

Glicocorticóides afetam a capacidade das células de resistir a apoptose^[172,173]. Diversas linhagens leucêmicas^[24] e timócitos maduros ativados e linfócitos T periféricos^[25] sofrem morte celular em resposta a GC. A indução de apoptose pode ser um dos mecanismos-chave mediadores dos efeitos terapêuticos de GCs no tratamento de leucemias, linfomas e diversas desordens auto-imunes. Por outro lado, dexametasona, um glicocorticoide sintético, induz resistência parcial a certas drogas anti-tumorais em linhagens celulares de glioma^[174,175,176].

Para avaliar o possível efeito de diferentes concentrações de Hy e TNF- α em células ST1 e P7, quanto a apoptose, estas células foram cultivadas em lamínulas, submetidas a técnicas rotineiras de fixação e coradas com azul de toluidina, como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão apresentados nas Figuras 22 e 23.

A morte celular por apoptose é caracterizada pela contração da célula, dramática reorganização celular e pela fragmentação nuclear^[177].

As células ST1 são sensíveis a Hy^[154,155]. É possível observar, na Figura 22, a manutenção desta morfologia diferenciada, mantendo-se a morfologia fusiforme e achatada em monocamada, nas diferentes concentrações de Hy. Poucas figuras apoptóticas foram observadas nas células ST1 tratadas com Hy.

Considerando-se o critério morfológico, as células ST1 quando cultivadas na presença de TNF- α apresentaram alterações citoplasmáticas e nucleares, sendo evidente as figuras apoptóticas mesmo nas doses mais baixas.

As células P7 (Figura 23) apresentaram alterações citoplasmáticas e nucleares, que remetem à figuras em processo de apoptose. Para o tratamento com Hy, tais fenótipos apoptóticos são evidentes a partir da concentração de 250ng/mL e para TNF- α , a partir de 2,5ng/mL.

ST1 + Hy

100ng/ml

250ng/ml

500ng/ml

750ng/ml

1000ng/ml

ST1 + TNF- α

2,5ng/ml

25ng/ml

50ng/ml

75ng/ml

100ng/ml

Figura 22. Células ST1 na presença de Hy e TNF- α . Análise morfológica obtida por coloração com azul de toluidina a partir de culturas mantidas em 5% FCS-DMEM tratadas com Hy nas concentrações indicadas. Fenótipos apoptóticos estão indicados pelas setas. Aumento x 40.

P7 + Hy

100ng/ml

250ng/ml

500ng/ml

750ng/ml

1000ng/ml

P7 + TNF- α

2,5ng/ml

25ng/ml

50ng/ml

75ng/ml

100ng/ml

Figura 23. Células P7 na presença de Hy e TNF- α . Análise morfológica obtida por coloração com azul de toluidina a partir de culturas mantidas em 5% FCS-DMEM tratadas com Hy nas concentrações indicadas. Fenótipos apoptóticos estão indicados pelas setas. Aumento x 40.

4. Discussão

O efeito transcricional dos glicocorticóides (GCs) se processa através do receptor de glicocorticóides (GR), uma proteína intracelular. A repressão da expressão gênica mediada por GR pode ser direta, via sequências nGRE, as quais têm ação oposta a GRE e que estão localizadas no promotor de genes reprimidos por GR^[60,68,69], ou indireta, através de interação proteína-proteína, de GR com outros fatores de transcrição^[70,71].

A repressão transcricional mediada por GR, envolvendo interação física entre GR e AP-1, bem como entre GR e NF- κ B, tem sido amplamente descrita (ver Tabela 1). Esta interação resulta em inibição da ativação de ambos os fatores de transcrição, AP-1 e NF- κ B, independente da ligação de GR ao DNA^[160]. AP-1 e NF- κ B controlam um conjunto de genes surpreendentemente diverso. Entretanto, estes fatores de transcrição compartilham algumas propriedades comuns como, por exemplo, estimular processos inflamatórios e promover proliferação e transformação celular^[161,108]. Além disso, a maioria dos agentes que ativam NF- κ B também ativam AP-1^[162].

AP-1 e NF- κ B poderiam estar atuando de forma sinérgica na reversão fenotípica tumoral-normal mediada por glicocorticóides em células ST1.

Inicialmente, foi descrita a interação entre GR e NF- κ B resultando em repressão mútua da atividade transcricional de ambos os fatores de transcrição^[81,130]. Por outro lado, foi descrita a ativação de GR por dexametasona e estímulo da atividade de ligação a DNA de NF- κ B, levando à indução da interleucina-1 β em uma linhagem celular de leucemia monocítica^[131].

Os estudos têm sido voltados para a repressão de NF- κ B por GR ativado, procurando entender o mecanismo das ações imunossupressora e anti-inflamatória de esteróides. Muitos dos genes imunologicamente relevantes induzidos por NF- κ B, como IL-2, IL-6, IL-8 e E-selectina, são reprimidos por GCs.

Os mecanismos pelos quais as proteínas Rel/NF- κ B e I κ B contribuem para desregular o crescimento celular permanecem vagos, em parte porque tem sido difícil correlacionar a função de NF- κ B com um efeito positivo definitivo na proliferação celular. Atualmente existem indicações de que as proteínas NF- κ B estão mais

intimamente envolvidas na proteção contra morte celular apoptótica^[129]. Entretanto, inibição ou indução de apoptose por NF- κ B depende do tipo celular e do tipo de indutor^[178].

Hormônios glicocorticóides são usados em quimioterapia de neoplasias linfóides, por causarem apoptose nestas células^[23]. Diversas linhagens leucêmicas sofrem morte celular em resposta a GC^[24]. Por outro lado, dexametasona, um glicocorticoide sintético, inibe apoptose em células de astrocitoma^[179,180].

O objetivo principal deste trabalho foi entender o papel de Rel/NF- κ B na ação anti-tumoral de GCs usando, como modelo celular, os variantes celulares ST1 e P7 derivados da linhagem C6 de glioma de rato^[151]. Estes variantes foram obtidos por clonagem celular, sendo, respectivamente, hiper-sensíveis e resistentes a glicocorticóides^[153,154,155].

Ambas as linhagens estudadas, ST1 e P7, apresentam alto nível basal de atividade NF- κ B. O tratamento com hidrocortisona leva à inibição tanto da atividade basal de NF- κ B como, também, da atividade NF- κ B induzida por TNF- α , apenas na linhagem celular ST1, que apresenta reversão fenotípica tumoral-normal induzida por glicocorticoide^[163].

Qual a correlação entre a inibição de NF- κ B e a reversão fenotípica tumoral-normal, ambas mediadas por glicocorticóides nas células ST1?

O variante celular ST1 apresenta dois complexos (I e II) com atividade NF- κ B, enquanto o variante P7 apresenta apenas um^[163]. A diferença de migração entre os dois complexos é devida à composição protéica diferente. Esta diferença na composição protéica de NF- κ B entre os dois variantes celulares e entre os complexos apresentados pelas células ST1 pode apontar para uma correlação entre inibição da atividade NF- κ B por hidrocortisona e a presença (ou não) de determinada proteína Rel/NF- κ B no complexo.

Foi demonstrado, por experimentos de co-imunoprecipitação e "protein cross-linking", que a repressão transcricional de NF- κ B, mediada por GR, se deve à interação física entre GR e a proteína RelA, *in vitro* e *in vivo*^[81,130,143].

Visto que a proteína RelA está presente no complexo NF- κ B apresentado pelas células ST1, mas não pelas células P7^[163], é possível que RelA desempenhe papel importante na reversão fenotípica induzida por glicocorticóides na linhagem celular ST1.

O papel desempenhado por uma determinada proteína no controle da proliferação celular e/ou neoplasia pode ser analisado bloqueando-se a expressão de sua sequência gênica específica nas células, através da inibição da tradução por mecanismo "antisense"^[164].

A inibição de genes por "antisense" baseia-se no emprego de uma sequência de ácido nucléico, que pode ser um oligonucleotídeo de DNA ou mesmo um transcrito complementar ao mRNA que se pretende inibir. Assim, é possível reduzir os níveis de um produto gênico, ao qual se atribui determinado papel biológico, através da transfecção de oligos complementares a tal mRNA ou de uma construção que expresse o mRNA no sentido "antisense".

4.1. Análise da proteína RelA na proliferação de células ST1

O papel desempenhado pela proteína RelA na reversão fenotípica tumoral-normal induzida por glicocorticóides foi verificado através de inibição do transcrito endógeno de RelA em células ST1 de glioma de rato. Foram estabelecidas linhagens celulares estáveis, contendo a construção do cDNA na orientação "antisense" no vetor plasmideal pOPI3.

Foram feitas diversas tentativas de subclonar o cDNA de RelA no vetor pOPI3CAT, a maioria das quais sem sucesso. Pelos resultados obtidos, a eficiência de ligação entre inserto e vetor mostrou ser muito baixa. Inicialmente, as ligações eram feitas com quantidades menores de inserto e vetor e a transformação feita por choque térmico, mas, depois de várias tentativas e dos resultados obtidos com os controles, verificou-se que seria necessário uma quantidade maior tanto de inserto como de vetor, assim como um processo de transformação de alta eficiência como a eletroporação^[165]. Utilizando-se, então, a eletroporação como método de transformação e uma nova linhagem de *E. coli* (XL1BlueMRF') foram obtidos bons resultados com os controles:

- (a) nenhuma colônia foi obtida a partir da transformação realizada com a re-ligação do vetor pOPI3 desfosforilado, indicando que a etapa de desfosforilação do vetor ocorreu sem problemas.
- (b) um número muito pequeno de colônias foi obtido a partir da transformação realizada com a re-ligação do vetor pOPI3 aberto. Segundo o manual da Stratagene, o vetor pOPI3 sem o fragmento CAT é instável, o que pode ser uma explicação para o baixo número de colônias obtido. Esta instabilidade do vetor pOPI3 religado prejudicou as análises da etapa de ligação.
- (c) a eficiência de transformação obtida por eletroporação foi de aproximadamente 10^8 transformantes/ μ g de DNA, utilizando os plasmídeos pOPI3CAT ou p65#, a qual está dentro da faixa de eficiência esperada, segundo Sambrook^[165].

Após inúmeras tentativas, o cDNA de RelA foi sub-clonado no vetor pOPI3. Assim, partiu-se para o estabelecimento e caracterização de bactérias recombinantes contendo a construção pOPI3-RelA. Foram obtidas e analisadas 73 colônias da transformação de bactérias *E. coli* com o produto da ligação do cDNA de RelA com o vetor pOPI3 (construção pOPI3-RelA). Apenas 3 colônias foram encontradas como sendo positivas para RelA, evidenciando a baixa eficiência da ligação entre inserto e vetor. As 3 colônias recombinantes obtidas apresentam o vetor com o cDNA RelA inserido na orientação "antisense".

O vetor plasmideal parental, pOPI3CAT, ou a construção contendo o cDNA de RelA sub-clonado na orientação "antisense", pOPI3-RelA(as), foram preparados e transfectados em células ST1, complexados a lipossomos. Este tipo de transfecção é mais eficiente do que o método de co-precipitação do DNA exógeno com fosfato de cálcio. Porém, nem todas as células recebem o DNA exógeno durante a transfecção, sendo necessário, portanto, selecionar os clones transfectantes. Esta seleção é possível porque os vetores carregam um marcador genético que confere resistência ao antibiótico geneticina (G418').

A partir das células ST1 transfectadas com o vetor parental, foram isolados 9 clones e a partir das células ST1 transfectadas com o vetor de expressão de RelA "antisense" foram isolados 12 clones. A inibição da expressão de RelA nos clones

isolados foi analisada por Western-blot. Os clones expressando a construção pOPI3-RelA(as) tendem a apresentar uma inibição parcial da expressão da proteína RelA (65KDa) quando comparados com a linhagem parental ST1, indicando que a estratégia utilizada, ou seja, uma construção expressando o cDNA RelA completo na orientação "antisense", não inibiu eficientemente a expressão da proteína. Os clones transfectados com o vetor parental pOPI3CAT apresentam níveis variáveis da proteína RelA.

Estes dados colocam em questão se a tendência à menor expressão da proteína RelA observada nos transfectantes da construção "antisense" se deve a uma inibição efetiva da expressão da proteína ou a múltiplas outras variáveis como a não inibição da expressão da proteína RelA por interação pouco eficiente do RNA "antisense" com o mensageiro endógeno de RelA e /ou a uma expressão insuficiente da construção pOPI3-RelA(as). Por outro lado, a inibição da expressão de RelA pode estar inibindo fortemente a proliferação celular, de tal forma que os clones expressando eficientemente o mRNA de RelA "antisense" sejam inviáveis e, portanto, não selecionados em detrimento àqueles clones que integraram estavelmente o vetor mas, que por algum mecanismo, não tiveram a expressão de RelA endógena bloqueada. Como a pressão seletiva na seleção de clones estáveis é sobre a expressão do gene marcador de resistência (G418^r) e não sobre a expressão do fragmento clonado, este pode ser um fator negativo adicional na seleção de clones de ST1 deficientes em RelA.

Embora a expressão da construção pOPI3-RelA(as) não tenha inibido eficientemente a expressão da proteína RelA na linhagem celular ST1, com o objetivo de verificar se esta inibição seria suficiente para interferir na capacidade proliferativa das células ST1, seguimos com os experimentos de curva de crescimento e crescimento em suspensão de agarose.

Uma característica observada dos clones pOPI3-RelA(as) obtidos é a redução na taxa de crescimento quando comparados à linhagem parental ST1. Em vista deste fato, despende-se muito tempo para obtenção de quantidade de células suficiente para os experimentos.

A proliferação dos clones celulares foi analisada e quantificada através de ensaios de curva de crescimento e eficiência de plaqueamento em suspensão de agarose. Não foi possível correlacionar a expressão de RelA com a proliferação celular, pois tanto os

clones ST1-RelA(as) como alguns clones ST1-pOPI3CAT apresentaram taxas de crescimento menores quando comparados com a célula parental ST1.

Da mesma forma, tanto os clones ST1-pOPI3CAT quanto os clones ST1-RelA(as) apresentaram uma eficiência de formação de colônia menor, quando comparados à linhagem parental ST1. Portanto, a ineficiência da inibição de expressão de RelA através da metodologia utilizada, aliada ao efeito do próprio vetor parental pOPI3CAT nas células ST1, impossibilitaram conclusões a respeito do efeito da inibição da expressão de RelA na proliferação de células ST1.

Porém, não se pode descartar a hipótese de um envolvimento funcional da proteína RelA na reversão fenotípica destas células, uma vez que hidrocortisona, ao interagir com seu receptor intracelular inibe a atividade de NF- κ B^[163], além de modular a transcrição de inúmeros genes^[157], cujo resultado final, no caso de células ST1, é a completa reversão fenotípica tanto *in vitro* como *in vivo*, caracterizado por um crescimento totalmente dependente de soro e ancoragem, morfologia normal e incapacidade de gerar tumor em camundongos nude^[154,155].

O comportamento dos clones, contendo apenas o vetor parental pOPI3CAT, nos ensaios funcionais de proliferação celular, é intrigante, sugerindo como possíveis causas que resultam em alterações na proliferação das células ST1: a) a possibilidade de alteração estrutural ou modificação transcricional de genes celulares endógenos devido à inserção preferencial deste vetor em sítios específicos no genoma destas células ou, ainda, b) a modificação inespecífica do fenótipo celular em resposta às diversas etapas do protocolo de transfecção estável, como inserção de DNA exógeno, interação dos lipossomos com a membrana celular, seleção com antibióticos, seleção clonal, entre outras variáveis.

O estudo do papel de NF- κ B na inibição da proliferação e, especificamente, da relevância biológica desta proteína na reversão fenotípica das células ST1, induzida por hidrocortisona, tem como fator limitante a obtenção de clones ou populações celulares deficientes em RelA. Portanto, novas estratégias são necessárias, como, por exemplo, a obtenção de construções "antisense" que permitam uma inibição mais eficiente da expressão da proteína RelA e não apresentem efeitos espúrios de vetor parental, incluindo: a) a utilização de um fragmento 5' do cDNA de RelA na orientação "antisense"

ao invés do cDNA completo, visando a expressão de um RNA antisense que interaja mais eficientemente com o transcrito endógeno codificante de RelA^[181]; b) a subclonagem do fragmento do cDNA "antisense" em vetores de expressão com promotores mais fortes para direcionar um alto nível de expressão do RNA "antisense"^[182]; c) a utilização de vetores de expressão induzíveis do fragmento "antisense" que permitam a seleção de clones, uma vez que a repressão de RelA pode ser deletéria para a seleção de clones estáveis e d) a seleção de populações mistas ao invés da seleção de clones, tendo em vista minimizar os efeitos de variação clonal.

Outras possibilidades para se estudar o papel de NF- κ B na reversão fenotípica mediada por glicocorticóide são: a) superexpressar o inibidor I κ B em células ST1 e b) superexpressar RelA na linhagem celular P7.

4.2. Análise da atividade do complexo de transcrição AP-1 em células ST1 de glioma de rato sob ação de hidrocortisona

Os resultados mostram que a atividade AP-1, nas células ST1, é modulada negativamente por hidrocortisona, dependendo do tempo de exposição das células ao hormônio. Da mesma forma, o tratamento com hidrocortisona inibe a atividade NF- κ B nestas células. Estes dados sugerem que a repressão conjunta das atividades dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 parece ser importante para a inibição da proliferação mediada por glicocorticóides.

Assim, torna-se muito interessante fazer uma cinética do efeito de hidrocortisona sobre as atividades AP-1 e NF- κ B, bem como analisar o efeito de inibidores específicos das vias de cada um dos fatores, verificando se há interferência da inibição da atividade de um sobre a atividade do outro.

4.3. Estudo do efeito de TNF- α no crescimento das células ST1

TNF- α induz NF- κ B enquanto Hy inibe a atividade de ligação ao DNA desse fator de transcrição. Se a inibição de NF- κ B é importante para a reversão fenotípica induzida por Hy em células ST1, é possível que a indução de NF- κ B por TNF- α interfira com o

efeito de Hy nessa reversão fenotípica. Essa hipótese foi analisada através de ensaio de incorporação de timidina tritiada ao DNA. Os resultados mostram que TNF- α induz a proliferação das células ST1 e interfere como efeito inibitório de Hy sobre proliferação destas células. Nestas condições, a ativação de NF- κ B por TNF- α suprime a ação de hidrocortisona, indicando que, pelo menos, alguns dos genes modulados por Hy, durante o processo de reversão fenotípica, devem também ser modulados por NF- κ B, de forma antagonica.

4.4. Estudo do efeito do agente inibidor de NF- κ B, curcumina, no crescimento celular e na atividade NF- κ B apresentada pelas células ST1 e P7

A inibição da ativação de NF- κ B pode ocorrer por: (1) bloqueio do sinal estimulatório em um estágio precoce e assim bloqueio do seu efeito geral; (2) interferência em algum passo da via de ativação de NF- κ B por bloqueio de um membro específico da cascata ou (3) inibição da atividade nuclear de NF- κ B por inibição da sua translocação para o núcleo, da ligação ao DNA ou da interação com a maquinaria de transcrição basal.

Em muitos, mas não em todos os tipos celulares, NF- κ B pode ser ativado por agentes oxidantes e sua atividade induzida pode ser inibida por anti-oxidantes ^[169]. Curcumina (CCM), um agente anti-oxidante, com ação anti-inflamatória e anti-carcinogênica, possui ação inibitória sobre a atividade NF- κ B, assim como hidrocortisona. Diferentemente de hidrocortisona, curcumina inibe a ativação de NF- κ B em um passo anterior à fosforilação de I κ B ^[171].

Ao examinar a ação de curcumina na proliferação das células ST1, por ensaios de incorporação de ³H-timidina ao DNA, verificou-se que este agente anti-oxidante diminui o crescimento celular destas células, de forma dose dependente.

Curcumina, assim como hidrocortisona, inibiu tanto a atividade basal de ligação do complexo NF- κ B ao seu sítio no DNA, como a atividade induzida por TNF- α , apresentadas pelas células ST1. Por outro lado, CCM não teve efeito inibitório sobre a atividade NF- κ B apresentada pelas células P7.

Dois agentes inibidores da atividade NF- κ B, CCM e Hy, agindo de forma distinta na cascata de transdução de sinal de NF- κ B, inibem o crescimento das células ST1, enquanto a indução de NF- κ B por TNF- α induz a proliferação destas células. Estes dados indicam que o fator NF- κ B desempenha um importante papel na ativação da proliferação celular.

Alguns autores sugerem que a inibição de NF- κ B por hidrocortisona se dá via interação física entre GR e a proteína RelA^[80,130,142,143]. A proteína RelA não é modulada por curcumina, mas sua translocação para o núcleo é inibida, provavelmente devido à inibição da degradação de I κ B^[171].

Foi mostrado que a proteína RelA está presente no complexo NF- κ B apresentado pelas células ST1, mas não pelas células P7^[163]. Interessantemente, a atividade basal NF- κ B de ligação ao DNA, medido por EMSA, apresentada pelas células P7, não sofre qualquer tipo de modulação, seja por TNF- α , Hy ou CCM, sugerindo que o complexo NF- κ B, identificado nesta linhagem celular, deve estar constitutivamente no núcleo, não respondendo a estes sinais extracelulares. Assim, torna-se muito importante rastrear todos os possíveis dímeros NF- κ B presentes nas linhagens celulares ST1 e P7.

Resultados preliminares mostram que CCM também é capaz de inibir o crescimento celular da linhagem P7. Sendo CCM um agente anti-oxidante, a inibição da proliferação de células P7 estaria envolvendo uma outra via, que não a de ativação de NF- κ B, uma vez que este fator não é modulado por CCM nesta linhagem celular.

4.5. Análise morfológica das células ST1 e P7 na presença de hidrocortisona e TNF- α para avaliação de apoptose

Apoptose é um processo fisiológico de morte celular que pode ser induzido por condições adversas como estresse oxidativo, ausência de fator de crescimento e exposição a agentes anti-tumorais.

Glicocorticóides induzem apoptose em timócitos^[177], podem aumentar a sensibilidade de neurônios à morte celular^[183,184,185] e podem exacerbar a neurotoxicidade da proteína gp120 do HIV^[186]. Por outro lado, dexametasona, um

glicocorticoide sintético, induz parcial resistência a várias drogas anti-tumorais em linhagens celulares de glioma humano e de rato^[174,175,176] e inibe apoptose mediada por Fas^[179]. A inibição da indução de apoptose em células de astrocitoma, provavelmente, é devida a uma regulação positiva de Bcl-x_L^[180].

NF-κB é ativado em resposta a vários estímulos pró-apoptóticos, por exemplo, TNF-α, estresse oxidativo e radiação ionizante^[42]. O papel de NF-κB no controle de vias pró- e anti-apoptóticas em células normais e tumorais tem sido objeto de muito estudo. Embora existam dados claros de que NF-κB está envolvido em processos de oncogênese, em parte, pela capacidade deste fator de transcrição de bloquear apoptose, existem também evidências na literatura que indicam que NF-κB pode evitar oncogênese e promover apoptose. Recentemente, foi mostrado que a inibição de NF-κB em células epiteliais via expressão de uma forma super-repressora de IκBα leva a carcinomas de células escamosas e aumenta apoptose^[187]. Consistente com a idéia de que a ativação de NF-κB pode promover efeitos pró-apoptóticos, a transcrição do gene que codifica o ligante Fas (FasL) é regulada por ambos os fatores de transcrição AP-1 e NF-κB em resposta a agentes quimoterápicos e sinais de ativação de células-T^[188,189].

O possível efeito de diferentes concentrações de Hy e TNF-α em células ST1 e P7, quanto a apoptose, foi analisado nestas células. Apesar desta análise ser ainda preliminar, é interessante notar que as células ST1 e P7 tratadas com TNF-α, bem como as células P7 tratadas com Hy, apresentaram figuras em processo de apoptose e que, as células ST1 tratadas com Hy, não. Sabendo-se que a atividade NF-κB é inibida por Hy na linhagem celular ST1, este resultado preliminar abre novas perspectivas. Para uma análise mais criteriosa e quantitativa, células ST1 e P7, deverão ser cultivadas na presença de Hy e/ou TNF-α, e submetidas ao método imunohistoquímico específico para detecção de apoptose, denominado TUNEL, e/ou FACS.

5. Conclusões

- Os clones pOPI3-RelA(as) apresentam uma tendência a expressar níveis menores da proteína RelA quando comparados com a linhagem parental ST1, o que não acontece com a maioria dos clones transfectados com o vetor vazio pOPI3CAT.
- Não foi possível correlacionar a expressão de RelA com a proliferação celular, pois tanto os clones ST1-RelA(as) como alguns clones ST1-pOPI3CAT apresentaram taxas de crescimento menores quando comparados com a célula parental ST1.
- Da mesma forma, tanto os clones ST1-pOPI3CAT quanto os clones ST1-RelA(as) apresentaram uma eficiência menor de formação de colônia em agarose, quando comparados à linhagem parental ST1.
- A construção pOPI3-RelA(as), contendo o cDNA completo de RelA na direção "antisense", não foi eficiente para a inibição da expressão do mRNA endógeno de RelA quando estavelmente transfectada na linhagem ST1.
- A atividade AP-1 foi modulada por hidrocortisona em células ST1. Esta modulação pode ser negativa ou positiva, dependendo do tempo de tratamento com o hormônio.
- Células ST1 e P7 tratadas com TNF- α , bem como as células P7 tratadas com Hy, apresentaram figuras em processo de apoptose enquanto as células ST1 tratadas com Hy, não.
- Resultados de três experimentos independentes, resumidos na Tabela 3, mostram que curcumina e hidrocortisona diminuem o crescimento celular da linhagem ST1.
- A citocina TNF- α induz um ligeiro aumento da proliferação na linhagem celular ST1. Este pequeno aumento interfere, na mesma proporção, no efeito de hidrocortisona na repressão do crescimento celular da linhagem ST1. A análise estatística mostrou que este aumento é significativo.
- Dois agentes anti-tumorais, hidrocortisona e curcumina, reprimem, na linhagem celular ST1, tanto o nível basal da atividade de ligação ao DNA do complexo NF- κ B, como o nível induzido por TNF- α .
- Por outro lado, hidrocortisona e curcumina não têm efeito inibitório sobre a atividade NF- κ B apresentada pelas células P7.

6. Referências Bibliográficas

1. Armelin, H.A. Peptide growth factors and cell cycle control. *Biomed. Pharmacother.*, 44:103-108, 1990.
2. Cross, M. and Dexter, T.M. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*, 64:271-280, 1991.
3. Webster, M.K.; Guthrie, J. and Firestone, G.L. Suppression of rat mammary tumor cell growth in vitro by glucocorticoids requires serum proteins. Characterization of wild type and glucocorticoid-resistant epithelial tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 265:4831-4838, 1990.
4. Webster, M.K.; Guthrie, J. and Firestone, G.L. Glucocorticoid growth suppression response in 13762NF adenocarcinoma-derived Con8 rat mammary tumor cells is mediated by dominant trans-acting factors. *Cancer Res.*, 51:6031-6038, 1991.
5. Goya, L.; Maiyar, A.C.; Ge, Y. and Firestone, G.L. Glucocorticoids induce a G1/G0 cell cycle arrest of Con8 rat mammary tumor cells that is synchronously reversed by steroid withdrawal or addition of transforming growth factor- α . *Mol. Endocrinol.*, 7:1121-1132, 1993.
6. Cook, P.W.; Swanson, K.T.; Edwards, C.P. and Firestone, G.L. Glucocorticoid receptor-dependent inhibition of cellular proliferation in dexamethasone-resistant and hypersensitive rat hepatoma cell variants. *Mol. Cell. Biol.*, 8:1449-1459, 1988.
7. Ramos, R.A.; Nishio, Y.; Maiyar, A.C.; Simon, K.E.; Ridder, C.C.; Ge, Y. and Firestone, G.L. Glucocorticoid-stimulated CCAAT/enhancer-binding protein alpha expression is required for steroid-induced G1 cell cycle arrest of minimal-deviation rat hepatoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, 16:5288-52301, 1996.
8. Rogatsky, I.; Trowbridge, J.M. and Garabedian, M.J. Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, 17:3181-3193, 1997.
9. Rhee, K.; Bresnahan, W.; Hirai, A.; Hirai, M. and Thompson, E.A. c-Myc and cyclin D3 (CcnD3) genes are independent targets for glucocorticoid inhibition of lymphoid cell proliferation. *Cancer Res.*, 55:4188-4195, 1995.
10. Akbasak, A. and Sunar-Akbasak, B. Oncogenes: cause or consequence in the development of glial tumors. *J. Neurol. Sci.*, 111:119-133, 1992.
11. Sasaki, M.; Wizigmann-Voos, S.; Risau, W. and Plate, K.H. Retrovirus producer cells encoding antisense VEGF prolong survival of rats with intracranial GS9L gliomas. *Int. J. Devl Neuroscience*, 17:579-591, 1999.
12. Carroll, R.S.; Zhang, J.; Dashner, K.; Sar, M. and Black, P.M. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery*, 37:503-504, 1995.
13. Sorensen, S.; Helweg-Larsen, S.; Mouridsen, H. and Hansen, H.H. Effect of high-dose dexamethasone in carcinomatous metastatic spinal cord compression treated with radiotherapy: a randomized trial. *Eur. J. Cancer*, 30A:22-27, 1994.
14. Gaynon, P.S. and Lustig, R.H. The use of glucocorticoids in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Molecular, cellular, and clinical considerations. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 17:1-12, 1995.
15. Kaspers, G.J.; Veerman, A.J.; Popp-Snijders, C.; Lomecky, M.; Van Zantwijk, C.H.; Swinkels, L.M.; Van Wering, E.R. and Pieters, R. Comparison of the antileukemic activity in vitro of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Pediatr. Oncol.*, 27:114-121, 1996.

16. Coleman, R.E. Glucocorticoids in cancer therapy. *Biotherapy*, 4:37-44, 1992.
17. Freshney, R.I. Effects of glucocorticoids on glioma cells in culture. *Exp. Cell Biol.*, 52:286-292, 1984.
18. Helmborg, A.; Auphan, N.; Caelles, C. and Karin, M. Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, 14:452-460, 1995.
19. Kaup, B.; Schindler, I.; Knupfer, H.; Schlenzka, A.; Preiss, R. and Knupfer, M.M. Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *J. Neurooncol.*, 51:105-110, 2001.
20. O'Malley, B. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol. Endocrinol.*, 4:363-364, 1990.
21. Walsh, D. and Avashia, J. Glucocorticoids in clinical oncology. *Cleve Clin J Med*, 59:505-15, 1992.
22. Cupps, T.R. and Fauci, A.S. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.*, 65:133-155, 1982.
23. Boumpas, D.T.; Chrousos, G.P.; Wilder, R.L.; Cupps, T.R. and Balow, J.E. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann. Int. Med.*, 119:1198-1208, 1993.
24. Norman, M. and Thompson, E. Characterization of a glucocorticoid-sensitive human lymphoid cell line. *Cancer Res.*, 37:3785-3791, 1977.
25. Galili, U. Glucocorticoid induced cytolysis of human normal and malignant lymphocytes. *J. Steroid Biochemistry*, 19:483-490, 1983.
26. Eastman-Reks, S.B. and Vedeckis, W.V. Glucocorticoid inhibition of *c-myc*, *c-myb*, and *c-kirras* expression in a mouse lymphoma cell line. *Cancer Res.*, 46:2457-2462, 1986.
27. Rameh, L.F.E. and Armelin, M.C.S. Downregulation of *JE* and *KC* genes by glucocorticoids does not prevent the $G_0 \rightarrow G_1$ transition in Balb/3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.*, 12:4612-4621, 1992.
28. Riva, M.A.; Fumagalli, F. and Racagni, G. Opposite regulation of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor gene expression in rat cortical astrocytes following dexamethasone treatment. *J. Neurochem.*, 64: 2526-2533, 1995.
29. Pockwinse, S.M.; Stein, J.L.; Lian, J.B. and Stein, G.S. Developmental stage-specific cellular responses to vitamin D and glucocorticoids during differentiation of the osteoblast phenotype: interrelationship of morphology and gene expression by *in situ* hybridization. *Exp. Cell Res.*, 216:244-260, 1995.
30. Shalhoub, V.; Conlon, D.; Tassinari, M.; Quinn, C.; Partridge, N.; Stein, G.S. and Lian, J.B. Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J. Cell. Biochem.*, 50:425-440, 1992.
31. Buse, P.; Woo, P.L.; Alexander, D.B.; Cha, H.H.; Reza, A.; Sirota, N.D. and Firestone, G.L. Transforming growth factor-alpha abrogates glucocorticoid-stimulated tight junction formation and growth suppression in rat mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 270:6505-6514, 1995.
32. Frost, G.H.; Rhee, K.; Ma, T. and Thompson, E.A. Expression of c-Myc in glucocorticoid-treated fibroblastic cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 50:109-119, 1994.
33. Sanchez, I.; Goya, L.; Vallergera, A.K. and Firestone, G.L. Glucocorticoids reversibly arrest rat hepatoma cell growth by inducing an early G1 block in cell cycle progression. *Cell Growth Differ.*, 4:215-225, 1993.
34. Droms, K.A.; Hanson, L.A.; Malkinson, A.M. and Beer, D.G. Altered dexamethasone responsiveness and loss of growth control in tumorigenic mouse lung cell lines. *Int. J. Cancer*, 53:1017-1022, 1993.

35. Strawhecker, J.M. and Pelling, J.C. Inhibition of mouse skin tumorigenesis by dexamethasone occurs through a Ha-ras-independent mechanism. *Carcinogenesis*, 13:2075-2080, 1992.
36. Denis, M.G.; Chadeneau, C.; Blanchardie, P. and Lustenberg, P. J. Biological effects of glucocorticoid hormones on two rat colon adenocarcinoma cell lines. *Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 41:739-745, 1992.
37. Distelhorst, C.W. and Dubyak, G. Role of calcium in glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes and lymphoma cells: resurrection of old theories by new findings. *Blood*, 91:731-734, 1998.
38. Zibera, C.; Gibelli, N.; Butti, G.; Pedrazzoli, P.; Carbone, M.; Magrassi, L. and Robustelli della Cuna, G. Proliferative effect of dexamethasone on a human glioblastoma cell line (HU 197) is mediated by glucocorticoid receptors. *Anticancer Res.*, 12:1571-1574, 1992.
39. Durst, M.; Gallahan, D.; Jay, G. and Rhim, J.S. Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene. *Virology*, 173:767-771, 1989.
40. Truss, M. and Beato, M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr. Rev.*, 14:113-130, 1993.
41. Armelin, H.A. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 2702-2706, 1973.
42. Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18:6853-6866, 1999.
43. Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.*, 63:451-486, 1994.
44. Evans, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240:889-895, 1988.
45. Beato, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56: 335-344, 1989.
46. Rexin, M.; Busch, W.; Segnitz, B. and Gehring, U. Structure of the glucocorticoid receptor in intact cells in the absence of hormone. *J. Biol. Chem.*, 267:9619-9621, 1992.
47. Silver, P.A. How proteins enter the nucleus. *Cell*, 64:489-497, 1991.
48. Yamamoto, K.R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.*, 19:209-252, 1985.
49. Beato, M.; Herrlich, P. and Schütz, G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, 83:851-857, 1995.
50. Dahlman-Wright, K.; Almlöf, T.; McEwan, I.J.; Gustafsson, J.-Å. and Wright, A.P.H. Delineation of a small region within the major transactivation domain of the human glucocorticoid receptor that mediates transactivation of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:1619-1623, 1994.
51. van der Burg, B.; Liden, J.; Okret, S.; Delaunay, F.; Wissink, S.; van der Saag, P.T. and Gustafsson, J.-Å. Nuclear Factor- κ B repression in antiinflammation and immunosuppression by glucocorticoids. *TEM*, 8:152-157, 1997.
52. Dahlman-Wright, K.; Wright, A.P.H.; Gustafsson, J.-Å. and Carlstedt-Duke, J. Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J. Biol. Chem.*, 266:3107-3112, 1991.
53. Luisi, B.F.; Xu, W.X.; Otwinowski, Z.; Freedman, L.P.; Yamamoto, K.R. and Sigler, P.B. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, 352:497-505, 1991.
54. Remerowski, M.L.; Kellenbach, E.; Boelens, R.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Maler, B.A.; Yamamoto, K.R.; Kaptein, R. 1H NMR studies of DNA recognition by the glucocorticoid receptor: complex of the DNA binding domain with a half-site response element. *Biochemistry*, 30:11620-4, 1991.

55. Danielian, P.S.; White, R.; Lees, J.A. and Parker, M.G. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.*, **11**:1025-1033, 1992.
56. Almlof, T.; Wallberg, A.E.; Gustafsson, J.-Å and Wright, A.P.H. Role of important hydrophobic amino acids in the interaction between the glucocorticoid receptor tau 1-core activation domain and target factors. *Biochemistry*, **37**:9586-9594, 1998.
57. Godowski, P.; Picard, D. and Yamamoto, K. Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science*, **241**:812-816, 1988.
58. Beato, M.; Chávez, S. and Truss, M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*, **61**:240-251, 1996.
59. Tsai, S.Y.; Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. Cooperative binding of the steroid hormone receptors contributes to transcriptional synergism at target enhancer elements. *Cell*, **57**:443-448, 1989.
60. Diamond, M.I.; Miner, J.N.; Yoshinaga, S.K. and Yamamoto, K.R. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science*, **249**:1266-1272, 1990.
61. Reichardt, H.M. and Schutz, G. Glucocorticoid signalling-multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol*, **146**:1-6, 1998.
62. Reichardt, H.M.; Tuckermann, J.P.; Bauer, A. and Schutz, G. Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo. *Z. Rheumatol.*, **50**:1-5, 2000.
63. Harrigan, M.T.; Baughman, G.; Campbell, N.F. and Bourgeois, S. Isolation and characterization of glucocorticoid- and cyclic AMP-induced genes in T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.*, **9**:3438-3446, 1989.
64. Samuelson, L.C.; Keller, P.R.; Darlington, G.J. and Meisler, M.H. Glucocorticoid and developmental regulation of amylase mRNAs in mouse liver cells. *Mol. Cell. Biol.*, **8**:3857-3863, 1988.
65. Baeuerle, P.A. and Henkel, T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**:141-179, 1994.
66. Kawahara, R.S.; Deng, Z.W. and Deuel, T.F. Glucocorticoids inhibit the transcriptional induction of JE, a platelet-derived growth factor-inducible gene. *J. Biol. Chem.*, **266**:13261-13266, 1991.
67. Valentini, S.R. Bases moleculares da reversão fenotípica induzida por hormônios glicocorticóides nas células C6 de glioma de rato. São Paulo, 1993. [Tese de Doutorado, Instituto de Química da USP].
68. Drouin, J.; Trifiro, M.A.; Plante, R.K.; Nemer, M.; Eriksson, P. and Wrange, O. Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **9**:5305-5314, 1989.
69. Sakai, D.D.; Helms, S.; Carlstedt-Duke, J.; Gustafsson, J.A.; Rottman, F.M. and Yamamoto, K.R. Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev.*, **2**:1140-1154, 1988.
70. Cavin, C. and Buetti, E. Tissue-specific and ubiquitous factors binding next to the glucocorticoid receptor modulate transcription from the mouse mammary tumor virus promoter. *J. Virol.*, **69**:3759-3770, 1995.
71. McEwan, I.J.; Wright, A.P. and Gustafsson, J.A. Mechanism of gene expression by the glucocorticoid receptor: role of protein-protein interactions. *Bioessays*, **19**:153-60, 1997.
72. Miner, J.N. and Yamamoto, K.R. Regulatory crosstalk at composite response elements. *Trends Biochem. Sci.*, **16**:423-426, 1991.

73. Burns, K.; Duggan B.; Atkinson E.A.; Famulski, K.S.; Nemer, M.; Nleackley, R.C. and Michalak, M. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature*, 367:476-480, 1994.
74. Dedhar, S.; Rennie, P.S.; Shago, M.; Hagesteijn, C.Y.; Yang, H.; Filmus, J.; Hawley, R.G.; Bruchovsky, N.; Cheng, H.; Matusik, R.J. et al. Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature*, 367:480-483, 1994.
75. LaCasse, E.C.; Lochnan, H.A.; Walker, P.; Lefebvre, Y.A. Identification of binding proteins for nuclear localization signals of the glucocorticoid and thyroid hormone receptors. *Endocrinology*, 132:1017-1025, 1993.
76. Bruggemeier, U.; Kalff, M.; Franke, S.; Scheidereit, C. and Beato, M. Ubiquitous transcription factor OTF-1 mediates induction of the MMTV promoter through synergistic interaction with hormone receptors. *Cell*, 64:565-72, 1991.
77. Jonat, C.; Rahmsdorf, H.J.; Park, K.K.; Cato, A.C.; Gebel, S.; Ponta, H. and Herrlich, P. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, 62:1189-1204, 1990.
78. Schüle, R.; Rangarajan, P.; Klierer, S.; Ransone, L.J.; Bolado, J.; Yang, N.; Verma, I.M. and Evans, R.M. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*, 62:1217-1226, 1990.
79. Yang-Yen, H.F.; Chambard, J.C.; Sun, Y.L.; Smeal, T.; Schimdt, T.J.; Drouin, J. and Karin, M. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of the DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*, 62:1205-1215, 1990.
80. Ray, A.; Siegel, M.D.; Prefontaine, K.E. and Ray, P. Anti-inflammation: direct physical association and functional antagonism between transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Chest*, 107:S139, 1995.
81. Caldenhoven, E.; Liden, J.; Wissink, S.; Van de Stolpe, A.; Raaijmakers, J.; Koenderman, L.; Okret, S.; Gustafsson, J.A. and Van der Saag, P.T. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.*, 9:401-412, 1995.
82. Chang, T.J.; Scher, B.M.; Waxman, S. and Scher, W. Inhibition of mouse GATA-1 function by the glucocorticoid receptor: possible mechanism of steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Mol Endocrinol*, 7:528-42, 1993. Erratum in: *Mol Endocrinol.*, 7:786, 1993.
83. Blobel, G.A.; Sieff, C.A. and Orkin, S.H. Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor. *Mol Cell Biol*, 15:3147-53, 1995.
84. Eggert, M.; Möws, C.C.; Tripier, D.; Arnold, R.; Michel, J.; Nickel, J.; Schmidt, S.; Beato, M. and Renkawitz, R. A fraction enriched in a novel glucocorticoid receptor-interacting protein stimulates receptor-dependent transcription in vitro. *J. Biol. Chem.*, 270:30755-30759, 1995.
85. Yoshinaga, S.K.; Peterson, C.L.; Herskowitz, I. and Yamamoto, K.R. Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science*, 258:1598-604, 1992.
86. Muchardt, C. and Yaniv, M. A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J*, 12:4279-90, 1993.
87. Stöcklin, E.; Wissler, M.; Gouilleux, F. and Groner, B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*, 383:726-8, 1996.
88. Kamei, Y.; Xu, L.; Heinzl, T.; Torchia, J.; Kurokawa, R.; Gloss, B.; Lin, S.C.; Heyman, R.A.; Rose, D.W.; Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85:403-14, 1996.

89. Caelles, C.; Gonzalez-Sancho, J.M. and Munoz, A. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev*, 11:3351-64, 1997.
90. Sen, R. and Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46:705-716, 1986.
91. Chen, F.E. and Ghosh, G. Regulation of DNA binding by Rel/NF- κ B transcription factors: structural views. *Oncogene*, 18:6845-6852, 1999.
92. Kawakami, K.; Scheidereit, C. and Roeder, R.G. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF- κ B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4700-4704, 1988.
93. Gilmore, T.D. The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*, 18:6842-6844, 1999.
94. Narayanan, R.; Klement, J.F.; Ruben, S.M.; Higgins, K.A. and Rosen, C.A. Identification of a naturally occurring transforming variant of the p65 subunit of NF- κ B. *Science*, 256:367-370, 1992.
95. Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science*, 242:540-546, 1988.
96. Karin, M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 18:6867-6874, 1999.
97. Siebenlist, U.; Franzoso, G. and Brown, K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 10:405-455, 1994.
98. Mercurio, F.; DiDonato, J.A.; Rosette, C. and Karin, M. p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF- κ B-mediated signal transduction. *Genes Dev.*, 7:705-718, 1993.
99. Fan, C.M. and Maniatis, T. Generation of p50 subunit of NF- κ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature*, 354:395-398, 1991.
100. Ryseck, R.P.; Weih, F.; Carrasco, D. and Bravo, R. RelB, a member of the Rel/NF- κ B family of transcription factors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29:895-903, 1996.
101. Mayo, M.W. and Baldwin, A.S. The transcription factor NF- κ B: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, 1470:M55-M62, 2000.
102. Verma, I.M.; Stevenson, J.K.; Schwarz, E.M.; Van Antwerp, D. and Miyamoto, S. Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.*, 9:2723-2735, 1995.
103. Stein, B.; Cogswell, P.C. and Baldwin, A.S. Jr. Functional and physical associations between NF- κ B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol. Cell. Biol.*, 13:3964-3974, 1993b.
104. Perkins, N.D.; Edwards, N.L.; Duckett, C.S.; Agranoff, A.B.; Schmid, R.M. and Nabel, G.J. A cooperative interaction between NF- κ B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.*, 12:3551-3558, 1993.
105. Stein, B.; Baldwin, A.S. Jr.; Ballard, D.W.; Greene, W.C.; Angel, P. and Herrlich, P. Cross-coupling of the NF- κ B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J.*, 12:3879-3891, 1993a.
106. Kunsch, C.; Ruben, S.M. and Rosen, C.A. Selection of optimal κ B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF- κ B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.*, 12:4412-4421, 1992.
107. Baldwin, A.S.; Azizkhan, J.C.; Jensen, D.E.; Beg, A.A. and Coodly, L.R. Induction of NF- κ B DNA-binding activity during the G₀-to-G₁ transition in mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 11:4943-4951, 1991.
108. Li, J.J.; Rhim, J.S.; Schlegel, R.; Vousden, K.H. and Colburn, N.H. Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF- κ B transactivation and suppresses anchorage

- independent growth of HPV immortalized human keratinocytes. *Oncogene*, 16:2711-2721, 1998.
109. Gilmore, T.D.; Koedood, M.; Piffat, K.A. and White, D.W. Rel/NF- κ B/I κ B proteins and cancer. *Oncogene*, 13:1367-1378, 1996.
110. Luque, I. and Gelinas, C. Rel/NF- κ B and I κ B factors in oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 8:103-111, 1997.
111. Higgins, K.A.; Perez, J.R.; Coleman, T.A.; Dorshkind, K.; McComas, W.A.; Sarmiento, U.M.; Rosen, C.A. and Narayanan, R. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF- κ B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:9901-9905, 1993.
112. Narayanan, R.; Higgins, K.A.; Perez, J.R.; Coleman, T.A. and Rosen, C.A. Evidence for differential functions of the p50 and p65 subunits of NF- κ B with a cell adhesion model. *Mol. Cell. Biol.*, 13:3802-3810, 1993.
113. Fracchiolla, N.S.; Lombardi, L.; Salina, M.; Migliazza, A.; Baldini, L.; Berti, E.; Cro, L.; Polli, E.; Maiolo, A.T. and Neri, A. Structural alterations of the NF-kappa B transcription factor I κ B in lymphoid malignancies. *Oncogene*, 8:2839-2845, 1993.
114. Ohno, H.; Takimoto, G. and McKeithan, T.W. The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell*, 60:991-997, 1990.
115. McKeithan, T.W.; Takimoto, G.S.; Ohno, H.; Bjorling, V.S.; Morgan, R.; Hecht, B.K.; Dube, I.; Sanderberg, A.A. and Rowley, J.D. BCL3 rearrangements and t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies: a molecular and cytogenetic study. *Genes Chromosomes Cancer*, 20:64-72, 1997.
116. Kitajima, I.; Shinohara, T.; Bilakovics, J.; Brown, D.A.; Xu, X. and Nerenberg, M. Ablation of transplanted HTLV-I Tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF-kappa B. *Science*, 258:1792-5, 1992.
117. Yamaoka, S.; Inoue, H.; Sakurai, M.; Sugiyama, T.; Hazama, M.; Yamada, T. and Hatanaka, M. Constitutive activation of NF-kappa B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *EMBO J.*, 15:873-887, 1996.
118. Yin, M.-J.; Christerson, L.B.; Yamamoto, Y.; Kwak, Y.-T.; Xu, S.; Mercurio, F.; Barbosa, M.; Cobb, M.H. and Gaynor, R.B. HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate I κ B kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell*, 93:875-884, 1998.
119. Chu, Z.-L.; DiDonato, J.A.; Hawiger, J. and Ballard, D.W. The tax oncoprotein of human T-cell leukemia virus type 1 associates with and persistently activates I κ B kinases containing IKK α and IKK β . *J. Biol. Chem.*, 273:15891-15894, 1998.
120. Geleziunas, R.; Ferrell, S.; Lin, X.; Mu, Y.; Cunningham, E.T.; Grant, M.; Connelly, M.A.; Hambor, J.E.; Marcu, K.B. and Greene, W.C. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF-kappaB involves activation of the I κ B kinase alpha (IKK α) and IKK β cellular kinases. *Mol. Cell. Biol.*, 18:5157-5165, 1998.
121. Uhlik, M.; Good, L.; Xiao, G.; Harhaj, E.W.; Zandi, E.; Karin, M. and Sun, S.-C. NF-kappaB-inducing kinase and I κ B kinase participate in human T-cell leukemia virus I Tax-mediated NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.*, 273:21132-21136, 1998.
122. Jin, D.-Y.; Giordano, V.; Kibler, K.V.; Nakano, H. and Jeang, K.-T. Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus type I Tax interacts directly with I κ B kinase gamma. *J. Biol. Chem.*, 274:17402-17405, 1999.
123. Wang, W.; Abbruzzese, J.L.; Evans, D.B.; Larry, L.; Cleary, K.R. and Chiao, P.J. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 5:119-127, 1999.

124. Sovack, M.A.; Bellas, R.E.; Kim, D.W.; Zanieski, G.J.; Rogers, A.E.; Traish, A.M. and Sonenshein, G.E. Aberrant nuclear factor- κ B/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J. Clin. Invest.*, 100:2952-2960, 1997.
125. Bargou, R.C.; Emmerich, F.; Krappmann, D.; Bommert, K.; Mapara, M.Y.; Arnold, W.; Royer, H.D.; Grinstein, E.; Greiner, A.; Scheidereit, C. and Dorken, B. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Invest.*, 100:2961-2969, 1997.
126. Duffey, D.C.; Chen, Z.; Dong, G.; Ondrey, F.G.; Wolf, J.S.; Brown, K.; Siebenlist, U. and Van Waes, C. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaB α of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Res.*, 59:3468-3474, 1999.
127. Finco, T.S.; Westwick, J.K.; Norris, J.L.; Beg, A.A.; Der, C.J. and Baldwin, A.S.Jr. Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF- κ B transcriptional activity, which is required for cellular transformation. *J. Biol. Chem.*, 272:24113-24116, 1997.
128. Reuther, J.Y.; Reuther, G.W.; Cortez, D.; Pendergast, A.M. and Baldwin, A.S. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev.*, 12:968-981, 1998.
129. Foo, S.Y. and Nolan, G.P. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet.*, 15:229-35, 1999.
130. Scheinman, R.I.; Gualberto, A.; Jewell, C.M.; Cidlowski, J.A. and Baldwin, A.S. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.*, 15:943-953, 1995a.
131. Wang, Y.; Zhang, J.J.; Dai, W.; Lei, K.Y. and Pike, J.W. Dexamethasone potently enhances phorbol ester-induced IL-1 β gene expression and nuclear factor NF-kappaB activation. *J. Immunol.*, 159:534-7, 1997.
132. Auphan, N.; DiDonato, J.A.; Rosette, C.; Helmberg, A. and Karin, M. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science*, 270:286-289, 1995.
133. Scheinman, R.I.; Cogswell, P.C.; Lofquist, A.K. and Baldwin, A.S. Jr. Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, 270:283-286, 1995b.
134. Hofmann, T.G.; Hehner, S.P.; Bacher, S.; Droge, W. and Schmitz, M.L. Various glucocorticoids differ in their ability to induce gene expression, apoptosis and to repress NF- κ B-dependent transcription. *FEBS Lett.*, 441:441-446, 1998.
135. Sun, W.H.; Keller, E.T.; Stebler, B.S. and Ershler, W.B. Estrogen inhibits phorbol ester-induced I κ B α transcription and protein degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244:691-695, 1998.
136. Wissink, S.; van Heerde, E.C.; van der Burg, B. and van der Saag, P.T. A dual mechanism mediates repression of NF- κ B activity by glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.*, 12:355-363, 1998.
137. Brostjan, C.; Anrather, J.; Csizmadia, V.; Stroka, D.; Soares, M.; Bach, F.H. and Winkler, H. Glucocorticoid-mediated repression of NF- κ B activity in endothelial cells does not involve induction of I κ B α synthesis. *J. Biol. Chem.*, 271:19612-19616, 1996.
138. Palvimo, J.J.; Reinikainen, P.; Ikonen, T.; Kallio, P.J.; Moilanen, A. and Janne, O.A. Mutual transcription interference between RelA and androgen receptor. *J. Biol. Chem.*, 271:24151-24156, 1996.

139. De Bosscher, K.; Schmitz, M.L.; Berghe, W.V.; Plaisance, S.; Fiers, W. and Haegeman, G. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- κ B-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13504-13509, 1997.
140. Heck, S.; Bender, K.; Kullmann, M.; Gottlicher, M.; Herrlich, P. and Cato, A.C.B. I κ B α -independent downregulation of NF- κ B activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, 16:4698-4707, 1997.
141. Kalkhoven, E.; Wissink, S.; van der Saag, P.T. and van der Burg, B. Negative interaction between the RelA(p65) subunit of NF-kappaB and the progesterone receptor. *J. Biol. Chem.*, 271:6217-24, 1996.
142. Mukaida, N.; Morita, M.; Ishikawa, Y.; Rice, N.; Okamoto, S.; Kasahara, T. and Matsushima, K. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. NF- κ B is a target for glucocorticoid-mediated IL-8 gene repression. *J. Biol. Chem.*, 269: 13289-13295, 1994.
143. Ray, A. and Prefontaine, K.E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 752-756, 1994.
144. Liden, J.; Delaunay, F.; Rafter, I.; Gustafsson, J.-Å. and Okret, S. A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. Repression of RelA transactivation. *J. Biol. Chem.*, 272:21467-72, 1997.
145. Sheppard, K.-A.; Phelps, K.M.; Williams, A.J.; et al. Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J. Biol. Chem.*, 273:29291-29294, 1998.
146. Cerillo, G.; Rees, A.; Manchanda, N.; Reilly, C.; Brogan, I.; White, A. and Needham, M. The estrogen receptor regulates NF- κ B and AP-1 activity in a cell-specific manner. *J. Steroid Biochem Mol Biol.*, 67:79-88, 1998.
147. Angel, P. and Karin, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1072:129-57, 1991.
148. Landschulz, W.H.; Johnson, P.F. and McKnight, S.L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240:1759-64, 1988.
149. Berko-Flint, Y.; Levkowitz, G. and Vardimon, L. Involvement of c-Jun in the control of glucocorticoid receptor transcriptional activity during development of chicken retinal tissue. *EMBO J.*, 13:646-54, 1994.
150. Noda, M. Mechanisms of reversion. *FASEB J.*, 7:834-840, 1993.
151. Benda, P.; Lightbody, J.; Sato, G.; Levine, L. and Sweet, W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science (Washington)*, 161: 370-371, 1968.
152. Beaumont, K. Rat C6 glioma cells contain type I as well type II corticosteroid receptors. *Brain Res.*, 342: 252-258, 1985.
153. Armelin, H.A.; Gambarini, A.G. and Armelin, M.C.S. Pituitary fibroblast growth factors and the growth of C6 glial cell variants. *Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation*, 9: 987-996, 1982.
154. Armelin, M.C.S. and Armelin, H.A. Glucocorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth control of rat glioma cells. *J. Cell. Biol.*, 97: 459-465, 1983.
155. Armelin, M.C.S.; Stocco, R.C. and Armelin, H.A. Control of rat C6 glioma cell proliferation: uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in suspension and monolayer cultures. *J. Cell. Biol.*, 97:455-458, 1983.
156. Mercado, J.M.M. Reversão fenotípica de células ST1 induzida por hormônios glucocorticóides: análise ao nível de ciclo celular e de genes supressores de tumor. São Paulo, 1997. [Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da USP].
157. Vedoy, C.G. and Sogayar, M.C. Isolation and characterization of genes associated with the anti-tumor activity of glucocorticoids. *Molecular Brain Research* (in press), 2002.

158. Valentini, S.R. and Armelin, M.C. Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. *J Endocrinol.*, 148:11-7, 1996.
159. Valentini, S.R.; Oliveira, M.L.; Sasahara, R.M. and Armelin, M.C. Glucocorticoid-regulated gene in transformed to normal phenotypic reversion. *Braz J Med Biol Res.*, 27:541-6, 1994.
160. Karin, M. New twists in gate regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell*, 93:487-490, 1998.
161. Li, J.J.; Westergaard, C.; Ghosh, P. and Colburn, N.H. Inhibitors of both nuclear factor-kappaB and activator protein-1 activation block the neoplastic transformation response. *Cancer Res.*, 57:3569-3576, 1997.
162. Karin, M.; Liu, Z. and Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9:240, 1997.
163. Carvalho, L.H. Papel do fator de transcrição NF- κ B na reversão fenotípica (tumoral→normal) induzida por glicocorticóides em células C6/ST1 de glioma de rato. São Paulo, 1997. [Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da USP].
164. Flatschart, R.B. and Sogayar, M.C. Functional analysis of newly discovered growth control genes: experimental approaches. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 867-875, 1999.
165. Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
166. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-54, 1976.
167. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
168. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. and Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Boston, John Wiley, 1999.
169. Epinat, J-C and Gilmore, T.D. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF- κ B signal transduction pathway. *Oncogene*, 18:6896-6909, 1999.
170. Chuang, S.-E.; Cheng, A.-L.; Lin, J.K. and Kuo, M.-L. Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 38:991-995, 2000.
171. Singh, S. and Aggarwal, B.B. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J. Biol. Chem.*, 270:24995-25000, 1995.
172. Evans-Storm, R.B. and Cidlowski, J.A. Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J. Steroid Biochem. molec. Biol.*, 53:1-8, 1995.
173. Thompson, E.B. Apoptosis and steroid hormones. *Molec. Endocr.*, 8:665-673, 1994.
174. Weller, M.; Schmidt, C.; Roth, W. and Dichgans, J. Chemotherapy of human malignant glioma: prevention of efficacy by dexamethasone. *Neurology*, 48:1704-1709, 1997.
175. Wolff, J.E.A. and Jürgens, H. Dexamethasone induced partial resistance to methotrexate in C6 glioma cells. *Anticancer Res.*, 14:1585-1588, 1994.
176. Wolff, J.E.A.; Denecke, J. and Jürgens, H. Dexamethasone induces partial resistance to cisplatin in C6 glioma cells. *Anticancer Res.*, 16:805-810, 1997.
177. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous nuclease activation. *Nature*, 284:555-556, 1980.
178. Barkett, M. and Gilmore, T.D. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18:6910-6924, 1999.
179. Weller, M.; Malipiero, U.; Aguzzi, A.; Reed, J.C. and Fontana, A. Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J. Clin. Invest.*, 95:2633-2643, 1995.
180. Gorman, A.M.; Hirt, U.A.; Orrenius, S. and Ceccatelli, S. Dexamethasone pre-treatment interferes with apoptotic death in glioma cells. *Neurosci.*, 96:417-425, 2000.

181. Whitesell, L.; Liu, X. and Bagatell, R. Inhibition of oncogene expression using vector-generated RNA antisense. *Methods*, 18:296-303, 1999.
182. Niwa, H.; Yamamura, K. and Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108:193-9, 1991.
183. Behl, C.; Lezoualc'h, F.; Trapp, T.; Widmann, M.; Skutella, T. and Holsboer, F. Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons *in vitro*. *Endocrinology*, 138:101-106, 1997.
184. McIntosh, L.J. and Sapolsky, R.M. . Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity. *NeuroToxicology*, 17:873-882, 1996.
185. Sapolsky, R.M. Glucocorticoids and hippocampal damage. *Trends Neurosci.*, 10:346-349, 1987.
186. Brooke, S.; Chan, R.; Howard, S. and Sapolsky, R. Endocrine modulation of the neurotoxicity of gp120: implications for AIDS-related dementia complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:9457-9462, 1997.
187. van Hogerlinden, M.; Rozell, B.L.; Ahrlund-Richter, L. and Toftgard, R. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res.*, 59:3299-3303, 1999.
188. Kasibhatla, S.; Genestier, L. and Green, D.R. Regulation of Fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.*, 274:987-992, 1999.
189. Kasibhatla, S.; Brunner, T.; Genestier, L.; Echeverri, F.; Mahboubi, A. and Green, D.R. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol. Cell*, 1:543-551, 1998.