7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE (org.). Clinical oncology library. 2nd edition. London: Churchill Livingstone, 2004.

Aigner A. Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. RNA Appl Microbiol Biotechnol, 2007; 76:9–21.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff K, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 5th edition. Garland Science, 2008.

Alla V, Engelmann D, Niemetz A, Pahnke J, Schimidt A, Kunz M, Emmerich S, Steder M, Pützer BM. E2F1 in melanoma progression and metastasis. J Natl Cancer Inst, 2009; 102: 127-133.

Bangari DS, Mittal SK. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. Curr. Gene Ther., v.6, n.2, p.215-26, Apr. 2006.

Barton GM, Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. Proc Natl Acad Sci U S A., 2002; 99(23):14 943-5.

Blain SW, Montalvo E, Massagu´e J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4,1997. J Biol Chem 272: 25863–25872.

Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Pierce ML, Eppig JT, Festing MFW, Fisher EMC. Genealogies od mouse inbred strains. Nature genetics, 2000; vol 24: 23-25.

Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. Mol Ther. 2006 Apr;13(4):644-70.

Brett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994; Vol91,19: 8802-6.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA. 2004 Feb;10(2):185-91.

Brigatte P, Sampaio SC, Pacciari Gutierrez VP,Guerra JL, Sinhorini IL, Curi R, CuryY. Walker 256 Tumor-Bearing Rats as a Model to Study Cancer Pain. The Journal of Pain, 2007; Vol 8, No 5: 412-421.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R.A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science. 2002 ;296(5567):550-3.

Cao L, Peng B, Yao L, Zhang X, Sun K, Yang X, Yu L. The ancient function of RB-E2F pathway: insights from its evolutionary history. Biol. Direct, 2010; 5: 55.

Carlson JA, Slominski A, Linette GP. Malignant melanoma 2003: predisposition, diagnosis, prognosis and staging. American J Clin Pathology, 2003; 120: S101-127.

Chen C, Wells AD. Comparative Analysis of E2F Family Member Oncogenic Activity. PLoS ONE, 2007; 2(9): e912.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature,* 2005; 436: 740-744.

Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ: The p21Cip1 and p27KIP1 CDK inhibitors' are essential activators of cyclin Ddependent kinases in murine fibroblasts. EMBO J, 1999. 18: 1571–1583.

Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. Nature, 2009;457(7228):426-33.

Chong JL, Wenzel PL, Sáenz-Robles MT, Nair V, Ferrey A, Hagan JP, Gomez YM, Sharma N, Chen HZ, Ouseph M, Wang SH, Trikha P, Culp B, Mezache L, Winton DJ, Sansom OJ, Chen D, Bremner R, Cantalupo PG, Robinson ML, Pipas JM, Leone G. E2F1-3 Switch from Activators in Progenitor Cells to Repressors in Differentiating Cells. *Nature*, 2009; 462(7275): 930–934.

Chong JL, Tsai SY, Sharma N, Opavsky R, Price R, Wu L, Fernandez SA, Leone G. *E2f3a* and *E2f3b* Contribute to the Control of Cell Proliferation and Mouse Development. Mol Cell Biol, 2009; Vol 29, 2: 414–424.

Coleman C, Levine D, Kishore R, Qin G, Thorne T, Lambers E, Sasi SP, Yaar M, Gilchrest BA, Goukassian DA. Inhibition of melanoma angiogenesis by telomere homolog oligonucleotides. J Oncology, 2010.

Cottrell TR, Doering TL. Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. Trends Microbiol. 2003 Jan;11(1):37-43.

Crosby ME, Amalsan A. Opposing roles of E2Fs in cell proliferation and death. Cancer Biol. and Therapy, 2004: 3:12, 1208-1211.

Curtin JÁ, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. N Engl J Med., 2005; 353: 2104-2107.

Davies H, *et al*. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

DeGregori J., Kowalik T. and Nevins J.R. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis and G1/S-regulatory genes. Mol Cell Biol, 1995. 8:4215–4224.

DeGregori J. The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. Biochim Biophys Acta 2002; 1602(2):131-50.

DeGregori J, Johnson DG. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. Curr Mol Med 2006; 6(7):739-48.

Dillon CP, Sandy P, Nencioni A, Kissler S, Rubinson DA, Parijs LV. RNAi as an experimental and therapeutic tool to study and regulate physiological and disease processes. Annu Rev. Physiolo., 2005; 67: 147-173.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family protein. Genes Dev 1998; 12(15):2245-62.

Elbashir SM, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001. 411(6836): p. 494-8.

Festing MWF. Inbred Strains of Mice: C57BL**.** *The Jackson Laboratory, 1998.* Disponível em: http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature, 1998. 391(6669): p. 806-11.

Frolov MV, Dyson NJ. Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. J Cell Sci 2004; 117(Pt 11):2173-81.

Fujita M, Andoh Y, Ohashi K, Akira A, Saiki I, Kuraishi Y. Roles of kinin B1 and B2 receptors in skin cancer pain produced by orthotopic melanoma inoculation in mice. European Journal of Pain, 2010; 14: 588–594.

Gao YK, Cheng JK, Zeng Q, Xu ZZ, Decosterd I, Xu X, Ji RR. Selective inhibition of JNK with a peptide inhibitor attenuates pain hypersensitivity and tumor growth in a mouse skin cancer pain model. Experimental Neurology, 2009; 219 : 146–155.

Gaubatz S, Lindeman G, Ishida S, Jakoi L, Nevins J, Livingston D. E2F4 e E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. Mol Cell, 2000; 6: 729-735.

Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. Oncogene, 2006; 25: 5220-5227.

Goto Y, Hayashi R, Kang D, Yoshida K. Acute loss of transcription factor E2F1 induces mitochondrial biogenesis in HeLa cells. J Cell Physiol 2006; 209(3):923-34.

Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J. Gen. Virol., v.36, n.1, p.59-74, Jul. 1977.

Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Heenan PJ, Carson CF, Riley TV, Beilharz MW. Inhibition of established subcutaneous murine tumour growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Cancer Chemother Pharmacol, 2010; 66:1095–1102.

Grimm D, Kay MA. RNAi and gene therapy: a mutual attraction. Hematology, 2007; 473-481.

Guimarães MA, Mázaro R, et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2004.

Halaban R, Cheng E, Zhang Y, Mandigo CE, Miglarese MR. Release of cell cycle constraints in mouse melanocytes by overexpressed mutant E2F1E132, but not by deletion of p16INK4A or p21WAF1/CIP1.Oncogene, 1998. 16: 2489-2501.

Halaban R, Cheng E, Smicun Y, Germino J. Deregulated E2F transcriptional activity in autonomously growing melanoma cells. J Exp Med., 2000. 191(6):1005-16.

Halaban R. Rb/E2F: a two-edged sword in the melanocytic system. Cancer Metastasis Rev., 2005. 24(2):339-56.

Hall J. Unravelling the general properties of siRNAs: strength in numbers and lessons from the past. Nature, 2004; 5: 552-557.

Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science. 1999 Oct 29;286(5441):950-2.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. . An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature. 2000 Mar 16;404(6775):293-6.

Hanahan D. Studies on Transformation of E.coli with plasmids. Journal Molecular Biology, 1983. 156: 557-580.

Hartwell LH. Yeast and cancer. Nobel Lecture. Biosci Rep. 2002 Jun-Aug;22(3-4):373-94.

Hartwell LH. Yeast and cancer. Biosci Rep. 2004 Aug-Oct;24(4-5):523-44.

He Z, Sontheimer EJ. "siRNAs and miRNAs": a meeting report on RNA silencing. RNA. 2004 Aug;10(8):1165-73.

He TC, Zhou S, Costa LT, Yu J, Kinsler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998; 95: 2509-2514.

Helin K, Lees JA, Vidal M, Dyson N, Harlow E, Fattaey A. A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. Cell 1992; 70(2):337-50.

Humbert PO, Verona R, Trimarchi JM, Rogers C, Dandapani S, Lees JA. E2f3 is critical for normal cellular proliferation. Genes Dev 2000; 14(6):690-703.

Hunt T, Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell. 1983 Jun;33(2):389-96.

Hunt T. Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions. Nobel Lecture. Biosci Rep 2002 Oct-Dec;22(5-6):465-86.

Hunt T. The discovery of cyclin (I). Cell. 2004 Jan 23;116(2 Suppl):S63-4, 1 p S65.

Iaquinta PJ, Lees JA. Life and death decisions by the E2F transcription factors. Cell Biology, 2007; 19: 649-657.

Infante A, Laresgoiti U, Fernández-Rueda J, Fullaonda A, Galán J, Diaz-Uriarte R, Malumbres M, Field SF, Zubiaga AM. E2F2 represses cell cycle regulators to maintain quiescence. Cell Cycle, 2008; 7:24, 3915-3927.

Inoshita S, Terada Y, Nakashima O, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Roles of E2F1 in mesangial cell proliferation in vitro. Kidney Inst., 1999; 56: 2085-2095.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativas para 2010 de câncer melanoma no Brasil. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010. Acesso em: outubro de 2010.

Ikezawa K, Ohtsubo M, Norwood TH, Narayanan S. Role of cyclin E and cyclin E-dependent kinase in mitogenic stimulation by cementum-derived growth factor in human fibroblasts. FASEB Journal, 1998; vol.12: 1233-1239.

Jackman M, Kubota Y, Elzen N, Hagting A, Pines J. Cyclin A- and Cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. Mol. Bio. Cell, 2002; vol.13: 1030-1045.

Jeollouli-Elloumi AL, Kochbati S, Dhraief S. Cancers arising from burn scars: 62 cases. Annales de dermatologie et de venereologie, 2003; 130: 413-416.

Joung J, E Ramm, Pabo C. Um sistema de seleção de bactérias de dois híbridos para estudar as interações DNA -proteína e proteína-proteína. *Proc Acad nacional Sci EUA.* PNAS 20 jun 2000 vol97.

Kaelin WG Jr. E2F1 as a target: Promoter-driven suicide and small molecule modulators. Cancer Biology & Therapy, 2003; 2:4: suppl. 1, 34-40.

Kaelin WG Jr, Krek W, Sellers WR, DeCaprio JA, Ajchenbaum F, Fuchs CS, Chittenden T, Li Y, Farnham PJ, Blanar MA, et al. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. Cell 1992; 70(2):351-64.

Kent OA, MacMillan AM. RNAi: running interference for the cell. Org. Biomol. Chem., 2004; 2: 1957-1961.

Khurana VG, Meyer FB. Translational Paradigms in Cerebrovascular Gene Transfer. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2003; v 23, 1251–1262.

Kong LJ, Chang JT, Bild AH, Nevins JR. Compensation and specificity of function within the E2F family. Oncogene 2007;26(3):321-7.

Krackeler Scientific Inc. 2009 Disponível em: http://www.krackeler.com/products/fid/2862. Acesso em: novembro de 2010.

Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin WG, Livingston DM. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 and by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. Cell 1994; 78, 161-172.

Kurreck J. RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications. Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 1378 – 1398.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E: New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors, 1997. Genes Dev 11: 847–862.

Laennec RTH. Sur les melanoses. Bulletin de la Faculte de Medecine de Paris, 1806; 1: 24-26.

Leung RKM, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. J Pharm Thera, 2005; 107: 222-239.

Li FX, Zhu JW, Hogan CJ, DeGregori J. Defective gene expression, S phase progression, and maturation during hematopoiesis in E2F1/E2F2 mutant mice. Mol Cell Biol 2003; 23(10):3607-22.

Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. Delivery of RNA interference. Cell Cycle, 2006; 5:18, 2103-2109.

Lindqvist A, Rodríguez-Bravo V, Medema RH. The decision to enter mitosis: feedback and redudancy in mitotic entry network. J Cell Biol. 2009 Apr 20;185(2):193-202.

Liu H, Dibling B, Spike B, Dirlam A, Macleod K. New roles for the RB tumor supressor protein. Curr Opn Genet Dev, 2004; 14: 55-64.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. Molecular Cell Biology. 4th edition. Editora Revinter Ltda, 2002.

Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of retinoblastoma protein requires sequential modification of the retinoblastoma protein by at least two distinct cyclin-Cdk complexes. Mol. Cell. Biol, 1998; 18: 735-761.

McCaffrey, A.P. et al. RNA interference in adult mice. Nature 2002; 418:38-39.

Medema RH. Optimizing RNA interference for application in mammalian cells. Biochemical Journal, 2004; Vol 380: 593-603.

Melo VAMR. Construção de ferramentas para estudo da possível interação entre interferon-beta e p53. USP, 2008.

Mitchison TJ, Salmon ED. Mitosis: a history of division. Nat Cell Biol. 2001 Jan;3(1):E17-21.

Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. Annu Rev Cell Div Biol 1997, 13:261–291.

Morse HC. Origins of inbred mice. Ed. Elsevier, 1978; 719 pgs.

Mousses S, Caplen NJ, Corneliso R. RNAi microarray analysis in cultured mammalian cells. Genome Res., 2003; 13: 2341-2347.

Müller H, Bracken A, Vernell R, Moroni M, Christians F, Grassilli E. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation and apoptosis. Genes Dev., 2001; 15: 267-285.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell, 1990; 2: 279-289.

Nelson MA, Reynolds SH, Rao UNM, Goulet AC, Feng Y, Beas A, Honchak B, Averill J, Lowry DT, Senft JR, Jefferson AM, Jonhson RC, Sargent LM. Increased gene copy number of the transcription factor E2F1. Cancer Biology & Therapy, 2006; 5:4, 407-412.

Nurse P. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. Nobel lecture. Chembiochem. 2002 Jul 2;3(7):596-603.

Omholt K, Platz A, Kanter L. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. Clin Cancer Research, 2003; 9: 6483-6488.

Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Dec 19;92(26):12146-50.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9):2002-2007.

Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS.Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes Dev. 2002;16(8):948-58.

Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. Nat Biotechnol, 2002. 20(5): p.505-8.

Pierce AM, Schneider-Broussard R, Gimenez-Conti IB, Russell JL, Conti CJ, Johnson DG. E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. Mol Cell Biol., 1999. 19(9):6408-14.

Polyak K., Kato J.Y., Solomon M.J., Sherr C.J., Massaque J., Roberts J.M. and Koff A. p27kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. J Gene Dev 1994, 8: 9–22.

Ponder, KP. An Introduction to molecular medicine and gene therapy. Ed. by Kresina, TF. Wiley-Liss, 2001; ch.4 : 77-112.

Poznic M. Retinoblastoma protein: a central processing unit. J. Biosci, 2009; 34: 305-312.

Pützer, BM. E2F1 death pathways as targets for cancer therapy. J. Cell Mol. Med., 2007; vol 11, n2, 239-251.

Reis CMG, Matias O. Biologia Celular. Porto: Areal Editores, 2007.

Roberts, JD. E2F1 amplification and genetic heterogeneity in melanoma. Cancer Biology & Therapy, 2006; 5:6, 691-692.

Rounbehler RJ, Rogers PM, Conti CJ, Johnson DG. Inactivation od E2f1 enhances tumorigenesis in a Myc transgenic model. Cancer Reas., 2002; 11: 3276-3281.

Roy-Chowdhury J, Horwitz MS. Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. Mol Ther. 2002 Apr;5(4):340-4.

Russell ES. Origins and history of mouse inbred strains: contributions of Clarence Cook Little. Chapter 5 - Origins of inbred mice. Ed. Elsevier, 1978; 6pgs.

Sánchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. Semin Cell Dev Biol. 2005 Jun;16(3):311-21.

Santamaria D, Ortega S. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. Front Biosci. 2006 Jan 1;11:1164-88.

Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Fujii H, Murata J, Saiki I, Nojima H, Kuraishi Y. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. European Journal of Pharmacology, 2002; 441 : 185–191.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science 1996; 274:1672–1677.

Sherr CJ, Roberts JM. . Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. Genes Dev. 2004 Nov 15;18(22):2699-711.

Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, et al. RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumor cell signaling and survival. Cancer Res., 2004; 64: 7962-7970.

Shuey DJ, McCallus DE, Giordano T. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. Drug Discov Today. 2002 Oct 15;7(20):1040-6

Simons RW. Gene. Naturally occurring antisense RNA control - a brief review.1988 Dec 10;72(1-2):35-44.

Stambile LP, Lyker JS, Huang L, Siegfried JM. Inhibition of human non-small cell lung tumors by a c-Met antisense/U6 expression plasmid strategy. Gene Ther., 2004; 11: 325-335.

Stevens C, La Thangue NB.E2F and cell cycle control: a double-edged sword. Arch Biochem Biophys. 2003;412(2):157-69.

Stevens C, La Thangue NB. The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. DNA Repais, 2004;1071-1079.

Takahashi Y, Singer O, Ikawa M, Verma IM. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. Genes Dev., 2000; 14: 804-816.

The Journal of Gene Medicine. Índice de utilização de diferentes veículos para entrega de material genético em ensaios clínicos para Terapia Gênica no ano de 2010. Disponível em: :www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/ clinical/. Acesso em: novembro de 2010.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine. 2001. Disponível em: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/. Acesso em: novembro de 2010.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine. 2006. Disponível em: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/. Acesso em: novembro de 2010.

Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(4):1844-8.

Tong AW, Zhang YA, Nemunaitis J. Small interfering RNA for experimental cancer therapy. Curr Opin Mol Ther. 2005 Apr;7(2):114-24.

Tsantoulis PK, Gorgoulis VG. Involvement of E2F transcription factor family in cancer. Eur J Cancer. 2005. 41(16):2403-14.

Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. Chembiochem. 2001 Apr 2;2(4):239-45.

Urteaga O, Pack G. On the antiquity of melanoma. Cancer, 1966; 5: 607-610.

Van der Krol AR, van Tunen AJ, van Blokland R, de Lange P, Stuitje AR. Regulation of plant gene expression by antisense RNA. FEBS Lett. Mol JN1990 Aug 1;268(2):427-30.

Vasques LR, Pujiz RS, Strauss BE, Krieger JE. Knockdown of E2f1 by RNA interference impairs proliferation of rat in vitro. Genet. Mol. Biol., 2009; 33: 17-22.

Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. J. Gene Med., v.6 Suppl 1, p.S164-71, Feb. 2004.

Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. Nat Biotechnol., 2002; 20: 1006-1010.

Xing EP, Yang GY, Wang LD, Shi TS, Yang CS. Loss of heterozygosity of the Rb gene correlates with pRB protein expression and associates with p53 alteration in human esophageal cancer. Clin. Cancer Res, 1999; 5: 1231-1240.

Xu M, Sheppard KA, Peng CY, Yee AS, Piwnica-Worms H. Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. Mol. Cell. Biol. 1994; 14, 8420-8431.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell, 1995; 81: 323-330.

Weinstock MA. Early detection of melanoma. J Am Med Ass, 2000; 284: 886.

Wells J, Yan PS, Cechvala M, Huang T, Farnham PJ: Identification of novel pRb binding sites using CpG microarrays suggests that E2F recruits pRb to specific genomic sites during S phase, 2003. Oncogene 22: 1445–1460.

Whiteman D, Green A. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. N Engl J Med. 1999 Sep 2;341(10):766-7.

Whiteman DC, Watt P, Purdie DM. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. J Nat Cancer Inst, 2003; 95: 806-812.

Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, Nuckolls F, Giangrande P, Wright FA, Field SJ, Greenberg ME, Orkin S, Nevins JR, Robinson ML, Leone G. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. Nature 2001; 414(6862):457-62.

Young A, Nagarajan R, Longmore G. Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway. Oncogene, 2003; 22: 7209-7217.

Yu Q, Wu J. Involvement of cyclins in mammalian spermatogenesis. Mol Cell Biochem, 2008; 315: 17-24.

Zhang SZ, Pan FY, Xu JF, Yuan J, Guo SY, Dai G, Xue B, Shen WG, Wen CJ, Zhao DH, Li CJ. Knockdown of c-Met by adenovirus-delivered small interfering RNA inhibits hepatocellular carcinoma growth in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther., 2005. 4(10):1577-84.

8. ANEXO – Utilização de modelos *in vivo*

8.1 Aspectos gerais da utilização de modelos *in vivo*

Há séculos o homem vem utilizando diversas espécies de animais para estudos e pesquisas científicas. Ao longo dos anos, a soma de conhecimentos das áreas de Genética e Biologia Molecular propiciaram uma maior interação entre a pesquisa e os modelos *in vivo*. Deste modo, com o uso de animais de experimentação nas pesquisas foi possível gerar um grande acervo de conhecimentos científicos, voltados principalmente para a saúde humana. O conceito de modelo experimental biológico implica, portanto, o uso de um ser vivo que permita sua manipulação para a "*realização de análise para o seu melhor conhecimento, inferindo dados e testando hipóteses*" (Guimarães *et al*, 2004).

No entanto, um modelo biológico depende de diversos fatores para proporcionar bons resultados, tais como conhecimentos prévios adequados sobre cuidados e manutenção dos animais e reprodutibilidade da pesquisa, de forma que haja também uma constante preocupação com a saúde e bem-estar dos animais.

Tendo em vista essa preocupação, diversos cientistas se pronunciaram favoráveis a leis que regulamentassem o uso de animais em pesquisa. A primeira lei contra o mal uso de animais foi estabelecida em 1822 na Inglaterra, sendo esta depois seguida e aprimorada na maioria dos países do mundo. A legislação mais importante foi organizada e publicada em 1963 nos Estados Unidos pelo *National Institute of Heath* (NIH) - "*Guide for Laboratory Animal Facilities and Care*", sendo posteriormente revisada em 1996 (disponível em: http://www.nih.gov e http://oacu.od.nih.gov/regs/guide). No Brasil, a primeira lei que garante a proteção aos animais de pesquisa foi decretada em 1934 (disponível em: http://www.fasprotecaoanimal.org.br/decreto_federal.asp), sendo revisada em 1979, porém ainda não sancionada.

Todas as legislações e guias atuais, como por exemplo o "*Guidelines for Ethical conduct in the Care and use of Animals*", visam o bem-estar e proteção dos animais de laboratório, assim como também visam proteção das pessoas

que os manipulam. Assim, torna-se indispensável que as pesquisas que utilizem modelos biológicos preencham todos os requisitos relacionados à ética animal (disponível em: http://www.apa.org/science/anguide).

Desta forma, o estabelecimento de leis e premissas relacionadas aos modelos biológicos promoveu não apenas uma maior proteção animal, mas também melhorou a qualidade dos resultados experimentais. Nas últimas décadas, novas informações obtidas a respeito dos próprios animais de experimentação, principalmente ratos e camundongos, proporcionaram maior segurança nas análises e reprodutibilidade das pesquisas realizadas. Com isso, os roedores têm sido os modelos biológicos mais utilizados atualmente, pois além das inúmeras informações acerca da biodiversidade de espécies, o baixo custo, fácil acesso e manutenção levaram à sua predominância nos mais variados segmentos da pesquisa científica. O uso de outras espécies para modelo experimental, como gatos, cães e macacos, têm se mostrado cada vez menor, chegando a aproximadamente 1%. Já a utilização de camundongos tem sido estatisticamente superior, atingindo por volta de 65% do total de animais utilizados em experimentação (Guimarães *et al*, 2004).

De acordo com os princípios éticos do uso de animais de experimentação aqui apresentados, é importante ressaltar também que, além de todo o cuidado com a saúde e bem-estar do animal, é necessário assegurar que a eutanásia aconteça de modo que proporcione ao animal uma morte sem sofrimento e sem medo.

8.1.1 Origem e características de camundongos C57BL/6

A primeira utilização de camundongos como modelo experimental é datada de 1664, quando Robert Hooke usou estes animais para seu estudo sobre as propriedades do ar (Morse *et al*, 1978). Desde então, os camundongos têm sido organismos de freqüente escolha para modelo de doenças humanas. Em 1902, William Castle iniciou a genética moderna em camundongos através de estudos hereditários. Um de seus alunos mais brilhantes, Clarence C. Little, foi o responsável pelo início da produção de linhagens *inbred* em camundongos em 1909 (Beck *et al*, 2000).

Por meio dos estudos de Little, foi definido que as linhagens *inbred* são aquelas obtidas através de cruzamentos sempre entre irmãos, por pelo menos 20 gerações sucessivas. Com isto, é possível que uma linhagem homozigota possua uma variação genética mínima, onde "*todos os indivíduos respondam praticamente da mesma maneira a uma situação experimental*". Assim sendo, os resultados obtidos tendem a ter uma variância muito pequena, uma vez que cada linhagem *inbred* é isogênica (Guimarães *et al*, 2004). Existem atualmente mais de 450 dessas linhagens em camundongos, fornecendo então diversos genótipos e fenótipos para os estudos científicos (Beck *et al*, 2000).

Em 1921 Little desenvolveu a linhagem de camundongos *inbred* C57BL, sendo esta descendente de uma linhagem fornecida anteriormente por Abbie Lathrop. Os descendentes da fêmea 57 com o macho 52, obtidos por cruzamentos consangüíneos, foram então denominados C57BL (fig.55). A partir de 1937 foram estabelecidas 10 sub-linhagens distintas de C57BL, e dentre essas as mais importantes e amplamente utilizadas até hoje são as grandes colônias de C57BL/6 e C57BL/10 (Russel,1978).

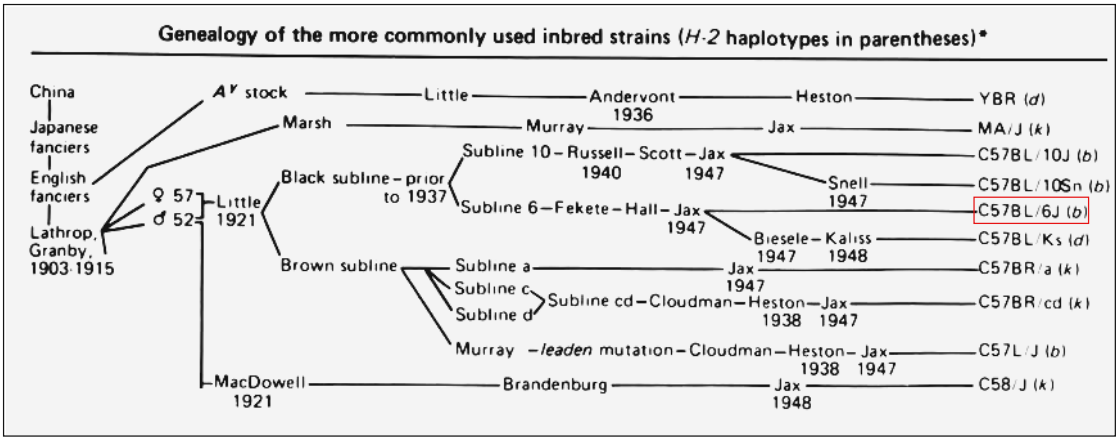

Figura 55. Genealogia dos camundongos *inbred* C57BL. Adaptado do livro "*Origins of Inbred Mice*" (Morse *et al*, 1978).

As linhagens *inbred* desenvolvidas ao longo de várias décadas por Little e seus colaboradores no *The Jackson Laboratory*, foram amplamente estudas e caracterizadas, e posteriormente fornecidas para diversos pesquisadores, com a simples finalidade de beneficiar estudos sobre o câncer em seres humanos (disponível em: http://www.informatics.jax.org). A distribuição das

linhagens para outros laboratórios foi fundamental para um maior avanço nas pesquisas científicas, uma vez que beneficiam os estudos que abarcam modelos *in vivo*, sendo a sub-linhagem *inbred* C57BL/6 uma das mais utilizadas no mundo todo. A denominação C57BL/6J foi então adicionada para representar que esta era proveniente do *Jackson Laboratory.*

Dentre as características predominantes da sub-linhagem C57BL/6, destacam-se: vida média de aproximadamente 750 dias, pelagem preta, alta atividade locomotora espontânea, alta exploração do ambiente, bom desempenho reprodutivo, temperamento facilmente irritável (com tendências a morder), comportamento de "barbeamento" (macho ou fêmea dominante realiza tricotomia dos pelos faciais dos demais indivíduos do grupo); desenvolvem degeneração auditiva espontânea no princípio da fase adulta, possuem fígado e hipocampo pequenos, e tireóide aumentada em relação a outras linhagens. Estudos indicam que esses animais são resistentes à indução de carcinomas, melanomas, leucemias, tumores de mama e de pulmão; e sensíveis a tumores de cólon de útero e ulcerações na pele (Festing, 1998). Outras pesquisas verificaram também que essa sub-linhagem apresenta baixa resposta imune à introdução de dsRNAs sintéticos, e que possui uma preferência por álcool e entorpecentes, sendo esta última característica utilizada em estudos de fundo genético e comportamental (Beck *et al*, 2000).

8.2 Documentação do Comitê de Ética

O presente trabalho foi realizado e aprovado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo.

Tabela 15: Cronograma de avaliação de documentos do Comitê de Ética da UNIFESP

Cronograma de avaliação de documentos	
29/09/2010	aprovação de alteração de metodologia e cronograma
12/07/2010	pedido de alteração de metodologia e cronograma
13/11/2009	aprovação de alteração de pesquisadores e metodologia
30/10/2009	pedido de alteração de pesquisadores, resumo e metodologia
07/12/2007	aprovação e parecer do projeto de pesquisa
29/10/2007	envio do projeto de pesquisa

São Paulo, 29 de setembro de 2010.
CEP 1884/07
CONEP

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) MARIA THERESA DE OLIVEIRA
Disciplina/Departamento: Bioquímica da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Uso de interferência por RNA para a análise da função do gene E2F1 na progressão do ciclo celular em células tumorais".**

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** **Proposta de alteração (versão de 03/Set/2010; alteração de metodologia; co-investigadores; cronograma)** do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 1884/07

OBS: Informamos que, de acordo com a carta Circular nº 003-CONEP/CNS de 14 de fevereiro de 2001 não há necessidade do parecer da CONEP para emendas aos protocolos, salvo quando o CEP solicitar. Nos projetos de Grupo I e II, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las à ANVISA junto com o parecer aprobatório do CEP/UNIFESP.

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."