

3.5.3.2 Revelação por quimiluminescência

Para revelação da membrana, a mesma foi primeiramente incubada por 1 minuto com 1,5ml de cada reagente da *Immunodetection SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific). A membrana foi então revelada por quimiluminescência no sistema de captura de imagem LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan). O software do LAS-4000 foi utilizado para quantificação das bandas e obtenção dos dados para plotagem dos gráficos.

3.6 Transdução *in vivo*

Para os experimentos *in vivo* foram selecionados camundongos *inbred* C57BL/6 de uma mesma colônia (veja anexo 8 para maiores informações), e de aproximadamente 12 semanas de idade. Os camundongos foram colocados em gaiolas de polycarbonato com filtro e mantidos em estante ventilada (Alesco) com controle de ar, pressão, luz (ciclo de claro e escuro de 12 em 12 horas), temperatura controlada (20 a 22°C) e com livre acesso a água e ração apropriada (fig.30). A cada experimento 8 a 12 animais foram selecionados, compondo duplicata ou triplicata experimental, respectivamente.



Figura 30. Biotério do INFAR (Instituto Nacional de Farmacologia – UNIFESP). A) Estante ventilada (Alesco). B) e C) Camundongo macho C57BL/6 em gaiola com filtro. O uso dessas gaiolas (microisoladores) é muito eficaz, pois auxilia na prevenção de contaminação e ainda facilita a visualização dos animais.

3.6.1 Padronização do crescimento tumoral *in vivo*

Camundongos C57BL/6 foram inoculados com diferentes quantidades de células B16mCAR: 5×10^4 ; 10^5 ; 5×10^5 ; e 10^6 . Para tanto, os animais foram anestesiados (solução contendo 200 μ l de ketamina e 100 μ l de xilasina para 100mg/kg) e as células foram injetadas subcutaneamente na pata posterior direita de cada animal, sendo as patas contralaterais utilizadas como controle.

Os animais foram acompanhados semanalmente e tiveram a espessura de suas patas medidas com paquímetro. Os animais inoculados com as quantidades 5×10^5 e 10^6 células foram eutanasiados duas semanas após a injeção, já os inoculados com as quantidades 5×10^4 e 10^5 foram acompanhados até a terceira semana após a injeção e eutanasiados. As patas posteriores foram coletadas e pesadas.

3.6.2 Injeção das células transduzidas

Tendo-se obtido a padronização da quantidade de células a serem inoculadas por animal para acompanhamento do crescimento tumoral, iniciou-se nova dupla transdução *in vitro* das células B16mCAR (vide tópico 3.3) com os adenovírus AdshGFP (controle), AdshE2F1B (i) e (ii) e células B16mCAR não transduzidas.

Após a transdução, as células foram lavadas com PBS 1X, tripsinizadas com 100 μ l e ressuspensas em meio RPMI. Foram utilizados 10 μ l para contagem das células em câmara de Neubauer. Cada amostra contendo 5×10^5 células foi centrifugada (1000 rpm a 20°C por 5 minutos), o meio foi retirado e o *pellet* foi ressuspenso em 50 μ l de PBS 1X.

Os animais selecionados foram previamente anestesiados. Cada amostra contendo as células em PBS 1X foi transferida para seringa de 1 ml e

as células foram injetadas subcutaneamente na pata posterior direita de cada animal.

3.6.3 Ensaio de proliferação *in vivo*

Para início do ensaio de proliferação *in vivo*, os animais foram primeiramente separados em gaiolas, nomeados, pesados e tiveram suas patas e/ou pernas posteriores mensuradas por paquímetro.

3.6.3.1 Obtenção de medidas e peso dos camundongos

Após injeção com células B16mCAR transduzidas ou não, os camundongos foram acompanhados semanalmente e tiveram a espessura de suas patas e/ou pernas medidas com paquímetro. Os animais foram eutanasiados 2 ou 3 semanas após a injeção, dependendo do experimento. Os animais foram novamente pesados, as patas posteriores foram retiradas e também pesadas em balança analítica. Os dados obtidos foram colocados em tabelas, sendo calculadas as médias e desvios das duplicatas ou triplicatas de cada experimento para posterior plotagem dos gráficos.

Nos procedimentos *in vivo* do presente trabalho foram seguidas as normas do NIH (*National Institute of Health*) para cuidado, manuseio e contenção dos animais de laboratório, com prévia aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP.

3.7 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados foi adotado o teste T, que baseia-se na distribuição de probabilidade estatística (distribuição de *t* de *Student*). O software GraphPad Prism 5 foi utilizado como suporte para a determinação do teste T e confecção de gráficos de experimentos. A significância estatística, quando comprovada ($p < 0,05$), foi demarcada com asterisco (*). Deste modo, quanto maior o número de asteriscos, maior a significância.

4. RESULTADOS

3.8 Preparação dos plasmídeos e adenovírus

Os plasmídeos adenovirais com código para shRNAs utilizados neste trabalho, pAdshE2F1-B e pAdshGFP, foram amplificados em média escala e, após este procedimento, e com a finalidade de se determinar a integridade do DNA plasmideal, um gel de agarose 0,8% corado com GelRed (Biotium) foi realizado, onde adicionou-se 1 μ l de cada amostra (fig.31).

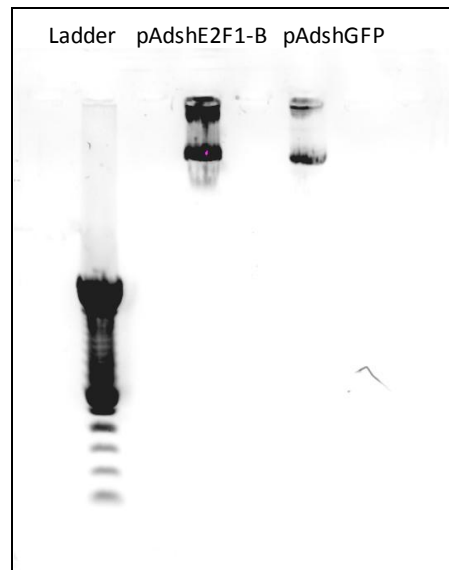


Figura 31. Gel 0,8% de agarose para verificação da integridade de DNA plasmideal de pAdshE2F1-B e pAdshGFP.

Os plasmídeos obtidos foram quantificados e submetidos ao seqüenciamento automático por meio do *ABI 3700 DNA Analyser* (Applied Biosystems). A análise foi realizada pelo Programa *Chromas V 2.33* (Technelysium Pty Ltd) (fig.32).

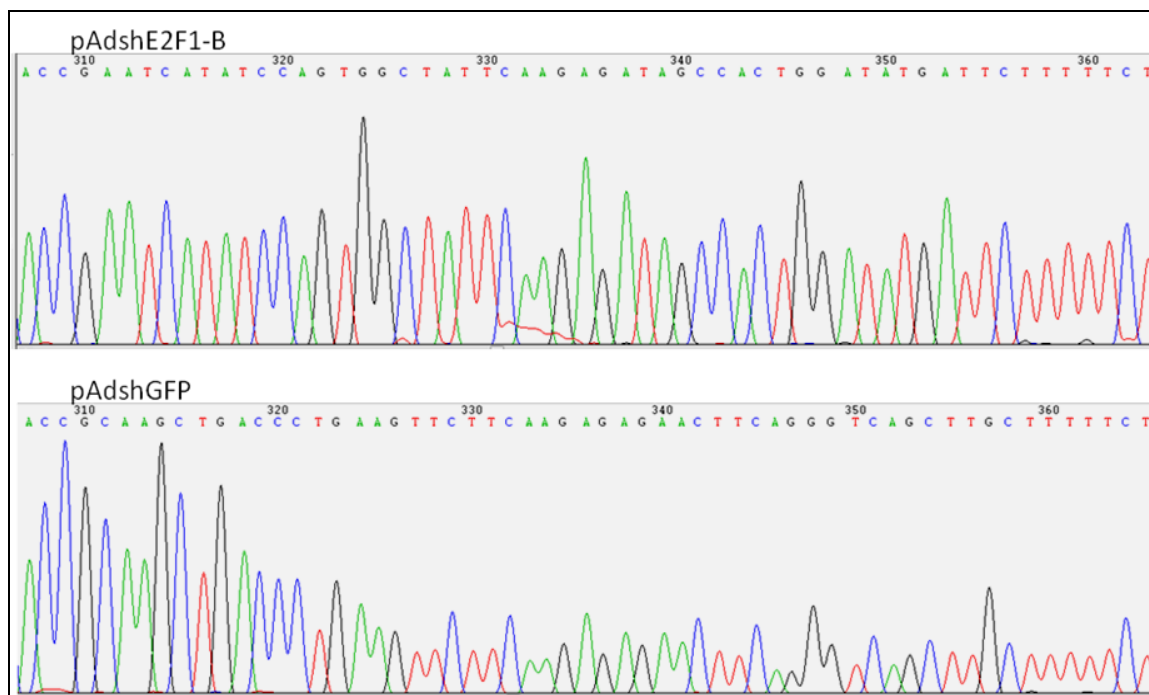


Figura 32. Sequenciamento da fita senso dos plasmídeos pAdshE2F1-B e pAdshGFP, analisados pelo Programa *Chromas* V 2.33 (Technelysium Pty Ltd).

Após amplificação dos plasmídeos, estes foram linearizados com *Pac* I (fig.33). Para verificação da clivagem um novo gel de agarose 1%, contendo 1µl de cada amostra. Como controle foi utilizado 1µl do respectivo plasmídeo sem clivagem enzimática.

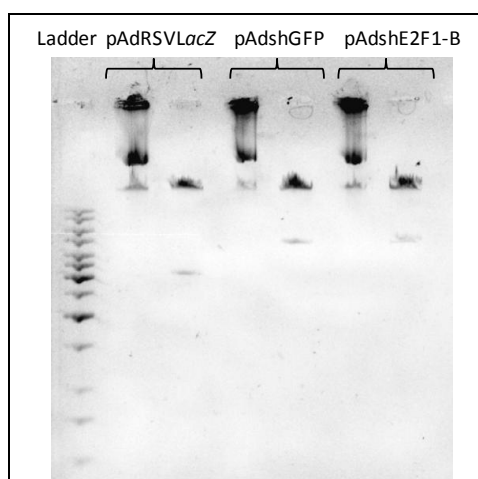


Figura 33. Gel 1% de agarose para verificação da digestão de DNA plasmideal com a enzima de restrição *Pac* I. O primeiro poço de cada amostra corresponde ao plasmídeo sem digestão

(controle da digestão), onde se observa dois fragmentos distintos, e o segundo poço corresponde ao plasmídeo digerido com *Pac I*.

4.2 Titulação dos vetores adenovirais

Os títulos das diferentes construções adenovirais foram determinados na passagem 4 (P4), e estão apresentados na tabela abaixo:

Tabela 9: Títulos dos diferentes adenovírus em passagem P4, em partículas por ml

Adenovírus (P4)	Titulação (TCID 50) (partículas/ml)
AdshGFP	$7,94.10^9$
AdRSVLacZ	$7,94.10^8$
AdshE2F1-B (i)	$3,16.10^{10}$
AdshE2F1-B (ii)	$1,25.10^{13}$

4.3 Otimização da transdução com AdRSVLacZ em células B16mCAR

Após sucessivas tentativas de se determinar o melhor fixador, foi possível identificar aquele que mais aumentou a eficiência de detecção da transdução de partículas AdRSVLacZ em células B16mCAR, o formaldeído 3,7%. Além disso, muitos testes foram realizados para se determinar a quantidade de células ideal para a transdução, bem como, quantidade de partículas virais e número de transduções, aumentando a eficiência da transdução para quase 100%.

4.3.1 Eficiência por simples transdução

Após produção e titulação viral, seguiu-se para a otimização do número de partículas necessárias para a transdução das células B16mCAR, bem como sua receptividade às partículas adenovirais. Para tanto, as células foram tratadas com AdRSVLacZ, que expressa o gene repórter *LacZ*, podendo-se então identificar facilmente a eficiência de transdução destas células através da coloração por X-Gal.

Inicialmente, a eficiência foi testada através de simples transdução, onde observou-se que cerca de 60% das células foram transduzidas (fig.34).

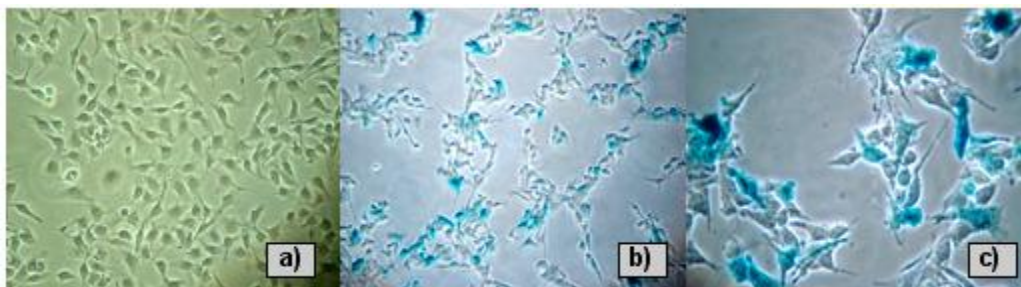


Figura 34. Eficiência da simples transdução em células B16mCAR (5×10^4 células por poço) com AdRSVLacZ. a) células controle (não transduzidas). b) e c) Coloração X-Gal mostrando a eficiência da transdução em aproximadamente 60%, com A=40X e A=100X, respectivamente.

4.3.2 Eficiência por dupla transdução

Com a finalidade de aumentar a eficiência de transdução, as células B16mCAR foram submetidas à dupla transdução. Este método mostrou-se mais adequado, já que aproximadamente 100% das células foram transduzidas (fig.35).

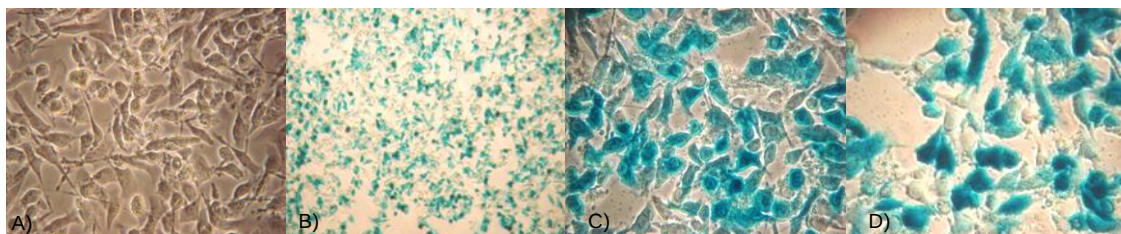


Figura 35. Eficiência da dupla transdução em células B16mCAR (5×10^4 células por poço) com AdRSVLacZ. A) células controle (não transduzidas). B), C) e D) Coloração X-Gal mostrando a eficiência da transdução em aproximadamente 100%, com A=40X, A=100X e A=400X, respectivamente.

4.4 Validação da construção de cassete de expressão de shE2f1 em vetor adenoviral em células B16mCAR

Anteriormente à validação da construção do cassete de expressão de shE2f1 em vetor adenoviral e para que a quantificação da expressão dos diversos genes analisados neste trabalho fosse fidedigna, todas as amostras

de RNA foram submetidas ao tratamento com DNase I, com o intuito de eliminar qualquer contaminação de DNA. Isto porque muitos genes possuem pseudogenes, como no caso da β -actina, podendo superestimar a expressão dos mesmos. Assim sendo, todas as amostras de cDNAs foram amplificadas por PCR convencional (RT-PCR) e os produtos foram verificado através de gel de agarose 2%, demonstrando não haver qualquer contaminação (fig.36).

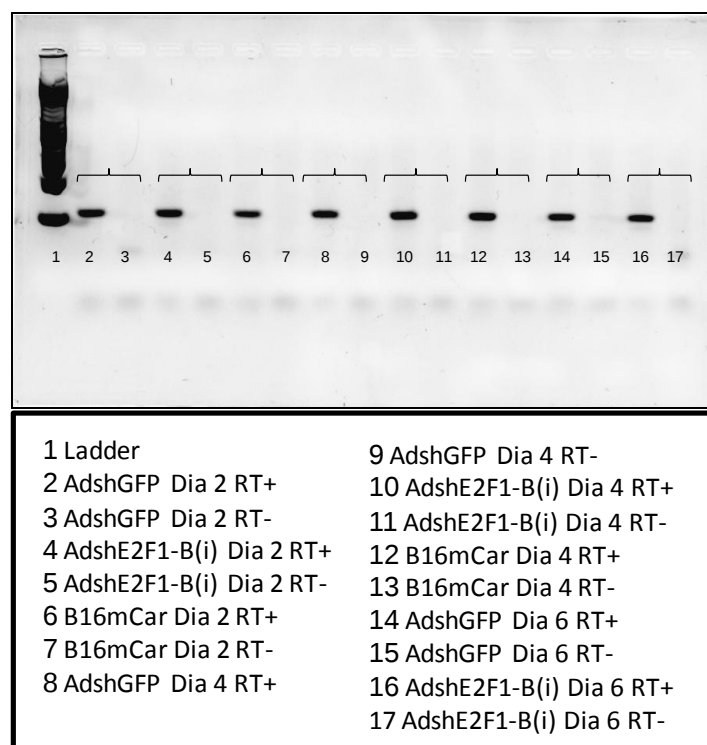


Figura 36. Representação de gel de agarose 2% com amostras do produto da RT-PCR. As bandas indicam as amostras onde foram adicionadas a enzima transcriptase reversa (RT+), e a ausência das bandas indicam as amostras onde não foram adicionadas a enzima (RT-), demonstrando que todas as amostras não possuíam contaminações com DNA. As amostras aqui apresentadas são exemplos de cDNAs cujos RNAs foram previamente tratados, onde AdshGFP e B16mCAR são controles daquelas transduzidas com o AdshE2F1-B.

Uma vez padronizado o protocolo de transdução adenoviral nas células da linhagem B16mCAR, foi iniciada a verificação da eficiência da inativação gênica através da interferência por RNA com o vetor adenoviral AdshE2F1-B.

Assim, a análise da expressão de *E2f1* foi então averiguada nas células B16mCAR transduzidas (dupla transdução) com dois lotes distintos de

AdshE2F1-B (i e ii), através de PCR em tempo real (qRT-PCR) e Western Blot, com a utilização de duas partidas virais diferentes. Foi verificada uma diminuição da expressão gênica em cerca de 50% no nível do RNA, e de aproximadamente 60% no nível protéico (fig.37), quando comparada ao controle (células transduzidas com AdshGFP). Como controle endógeno a expressão de β -actina foi utilizada, para a normalização da expressão de *E2f1*.

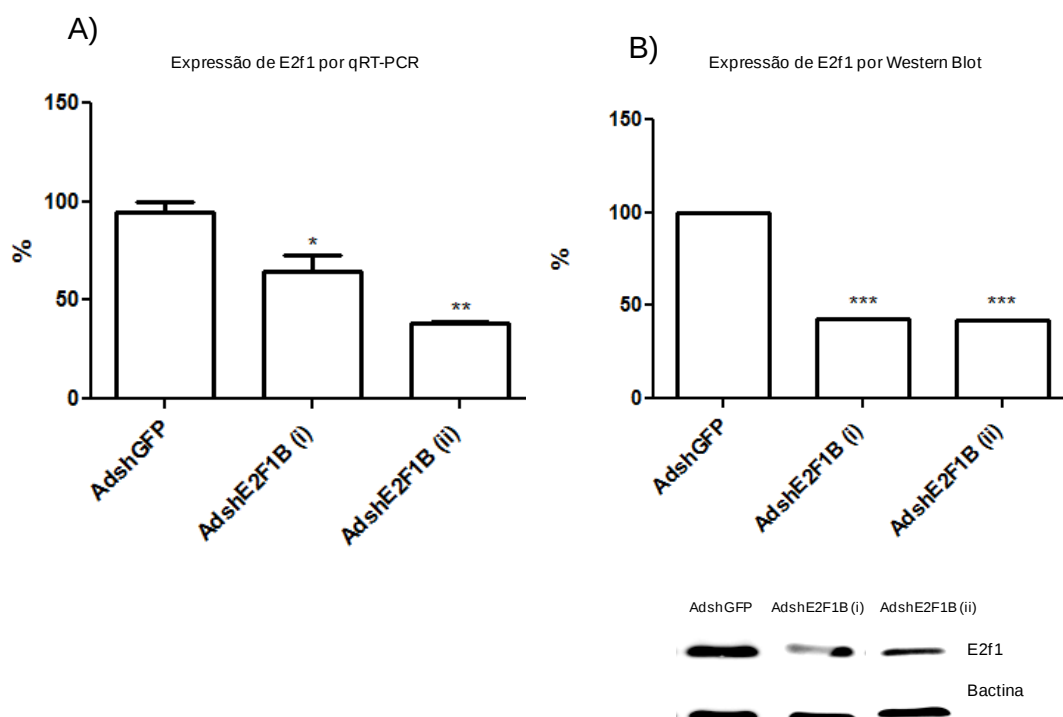


Figura 37. A) Análise da expressão de *E2f1* por PCR em Tempo Real. O gráfico representa a média de dois experimentos distintos, realizados em triplicata experimental. B) Análise da expressão de *E2f1* por Western Blot. O gráfico representa um experimento, realizado em duplicata experimental, com extração protéica citoplasmática. A quantificação das bandas protéicas foi analisada através do Analizer LAS-4000. Células B16mCAR foram transduzidas (dupla transdução) com a mesma quantidade de partículas adenovirais para AdshGFP e para AdshE2F1-B, sendo que para estas dois lotes distintos foram utilizados, AdshE2F1-B (i) e AdshE2F1-B (ii). O AdshGFP foi definido como controle 100%. Para a normalização dos experimentos a expressão da β -actina foi utilizada. * $P < 0,02$, quando comparado ao controle.

4.5 Perfil de expressão em células transduzidas com AdshE2F1-B

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos de validação da construção adenoviral, novos experimentos foram realizados para verificar o perfil de expressão dos genes *E2f1*, *E2f2*, *E2f3* e *Ciclina E*, a curto e médio prazo, por meio de dupla transdução em células B16mCAR. Foram utilizadas, na maioria dos experimentos, duas partidas virais diferentes, AdshE2F1B (i) e AdshE2F1B (ii), sendo os resultados apresentados referentes à média dessas duas partidas em dois experimentos distintos. Para a normalização de todos os experimentos a expressão da *βactina* foi utilizada.

4.5.1 Análise da expressão de *E2f1*

Após a dupla transdução do AdshE2F1-B em células B16mCAR, foram obtidos resultados semelhantes aos anteriores referentes à validação do vetor adenoviral. Uma diminuição significativa foi observada tanto por PCR em tempo real como por Western Blot, onde o silenciamento obtido foi de aproximadamente 55% e 70%, respectivamente (fig.38).

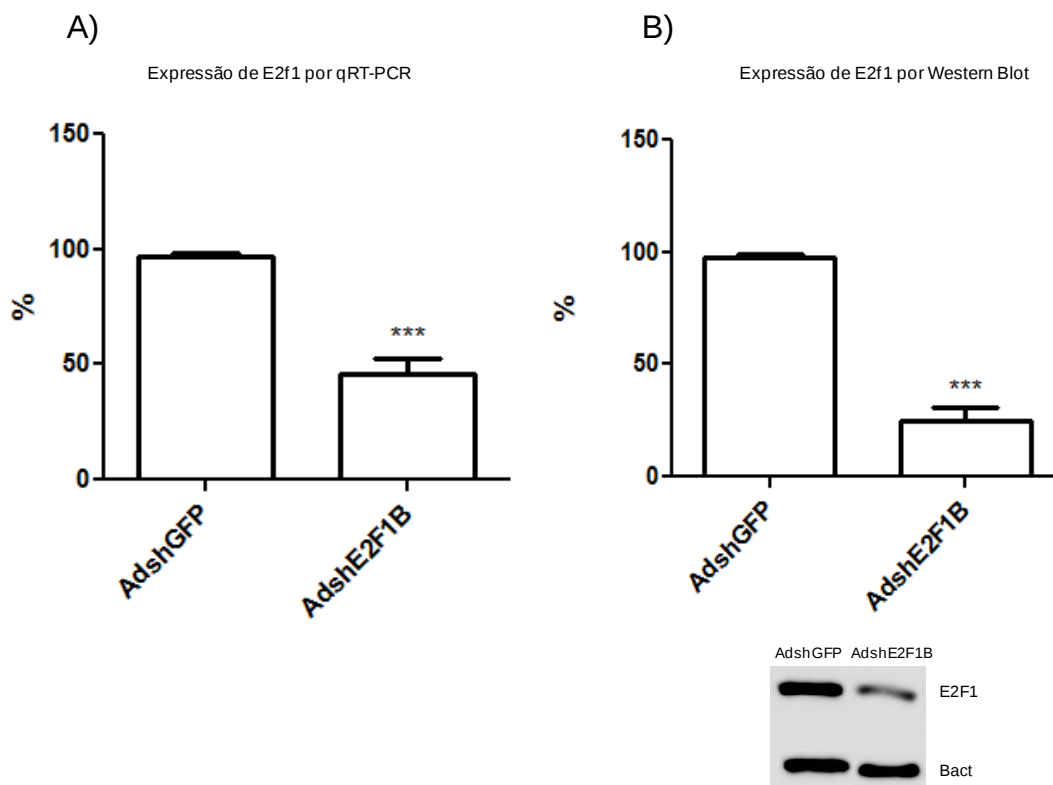


Figura 38. A) Expressão de RNAm de *E2f1* por PCR em tempo real (qRT-PCR). B) Análise da expressão da proteína de *E2f1* por Western Blot, com extração protéica citoplasmática. O gráfico representa a média de duas partidas adenovirais distintas, AdshE2F1-B (i) e AdshE2F1-B (ii). Todos os gráficos representam a média de dois experimentos distintos, ambos realizados em triplicata experimental para validação estatística (teste T). O AdshGFP foi definido como controle 100%. Para a normalização dos experimentos a expressão da β actina foi utilizada. * $P < 0,02$, quando comparado ao controle.

4.5.2 Análise da expressão de *E2f2* e *E2f3*

Uma vez determinada a diminuição da expressão de *E2f1* nas células B16mCAR, deu-se início ao estudo da expressão de outros genes da família E2F: *E2f2* e *E2f3*, já que estes também são ativadores da proliferação celular e poderiam compensar a ausência de *E2f1* nestas células.

Os resultados obtidos por PCR em tempo real demonstraram que não há alterações significativas na expressão destes genes após a diminuição da expressão *E2f1* (fig.39).

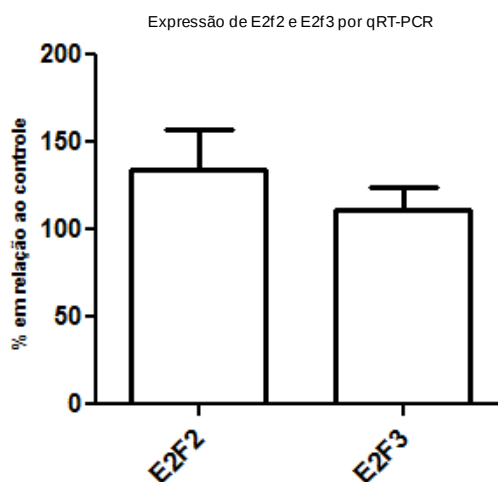


Figura 39. Expressão de RNAm de *E2f2* e *E2f3* por PCR em tempo real (qRT-PCR). Todos os gráficos representam a média de dois experimentos distintos, ambos realizados em triplicata experimental para verificação de significância estatística (por teste T). A expressão de células contendo AdshGFP foi definida como controle 100%. Para a normalização dos experimentos a expressão da β actina foi utilizada. * $P < 0,02$, quando comparado ao controle.

4.5.3 Análise da expressão de *Ciclina E*

A análise da expressão da *Ciclina E* também foi realizada, já que é controverso o papel de *E2f1* no seu controle transcricional. Os resultados obtidos por PCR em tempo real demonstraram uma diminuição significativa de *Ciclina E* (fig.40), onde a mesma encontrou-se reduzida em cerca de 40%. Deste modo, os resultados aqui descritos sugerem que *E2f1* pode controlar a expressão de *Ciclina E* nas células B16mCAR.

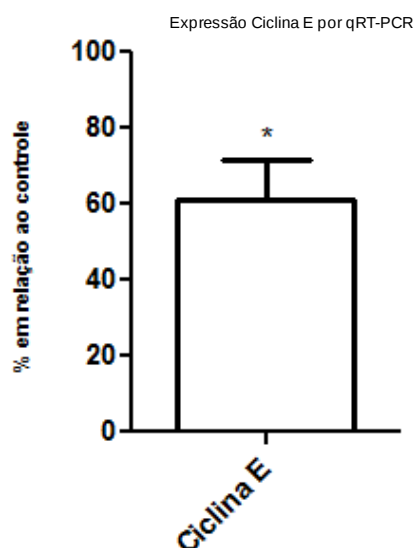


Figura 40. Expressão de RNAm de Ciclina E por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os gráficos representam a média de dois experimentos distintos, ambos realizados em triplicata experimental para validação estatística (teste T). A expressão de células contendo AdshGFP foi definida como controle 100%. Para a normalização dos experimentos a expressão da β actina foi utilizada. * $P < 0,02$, quando comparado ao controle.

4.5.4 Curva de expressão de *E2f1* em células B16mCAR

A fim de se verificar a expressão de *E2f1*, *E2f2* e *E2f3* a médio prazo, uma curva de proliferação *in vitro* com simples transdução foi traçada. Após a simples transdução, as células transduzidas ou não com AdshE2F1-B(i) foram coletadas de 2 em 2 dias até se completar um período de 8 dias. As amostras foram analisadas por PCR em tempo real (fig.41).

Por qRT-PCR verificou-se que a expressão de *E2f1* sofreu maior diminuição no quarto e sexto dias e, apesar de ter sofrido um leve aumento no

oitavo dia, este ainda manteve-se bem menor o controle (células B16mCAR transduzidas com AdshGFP). Portanto, os resultados obtidos indicam uma ação duradoura da inativação a médio prazo.

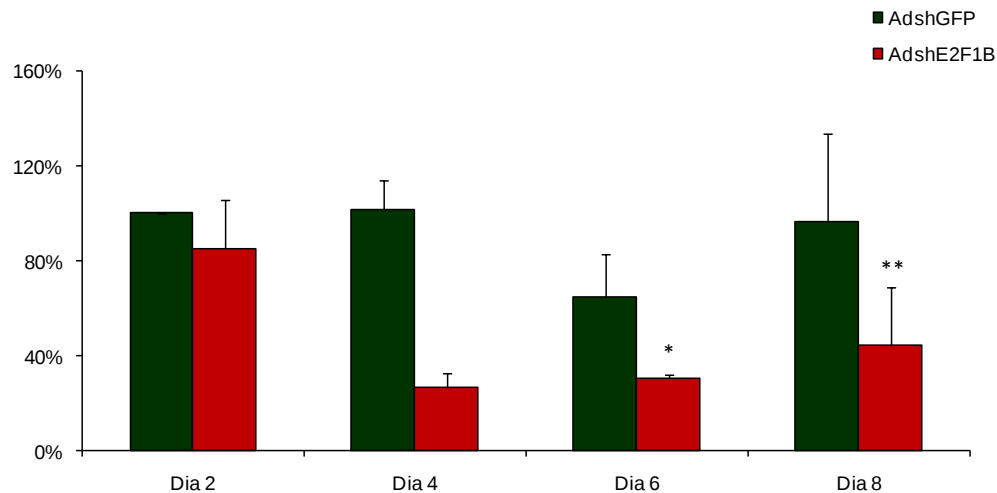


Figura 41. Curva de expressão de E2f1 por PCR em Tempo Real em células B16mCAR com simples transdução de AdshGFP e AdshE2F1-B (i). Os RNAs extraídos foram coletado de 2 em 2 dias, e a expressão de AdshGFP em células B16mCAR do dia 2 foi considerada como 100%. O gráfico representa um único experimento, realizado em triplicata experimental. * $P < 0,02$, quando comparado ao seu respectivo controle.

A expressão de *E2f2* (fig. 42) também mostrou-se reduzida, tendo diminuição semelhante à de *E2f1*. Isso sugere um possível controle de E2f1 na expressão de *E2f2* a médio prazo.

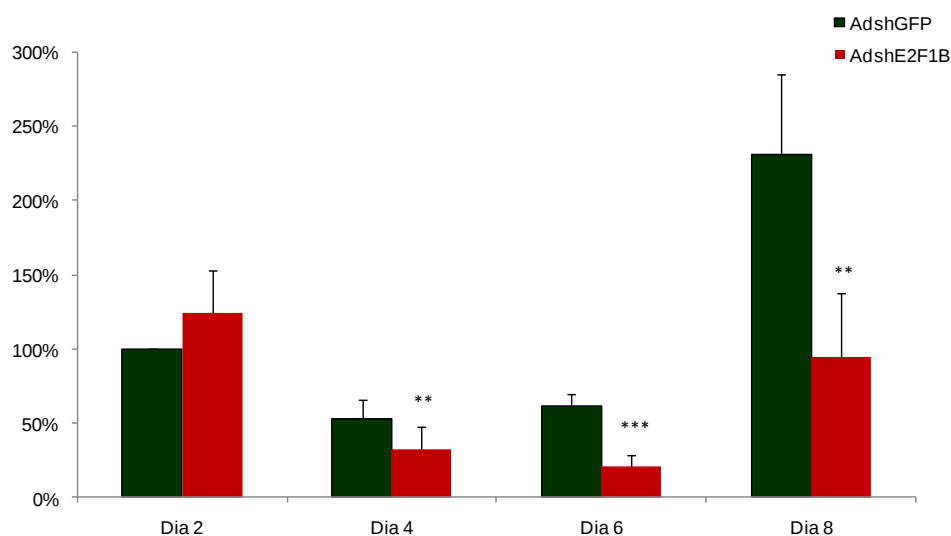


Figura 42. Curva de expressão de E2f2 por PCR em Tempo Real em células B16mCAR com simples transdução de AdshGFP e AdshE2F1-B (i). Os RNAs extraídos foram coletado de 2 em 2 dias, e a expressão de AdshGFP em células B16mCAR do dia 2 foi considerada como 100%. O gráfico representa um único experimento, realizado em duplicata experimental. * $P < 0,003$, comparado ao seu repectivo ao controle.

Já a expressão de *E2f3* (fig.43) não mostrou alterações significativas, tendo inclusive aumento semelhante ao controle no dia 8 (células B16mCAR transduzidas com AdshGFP).

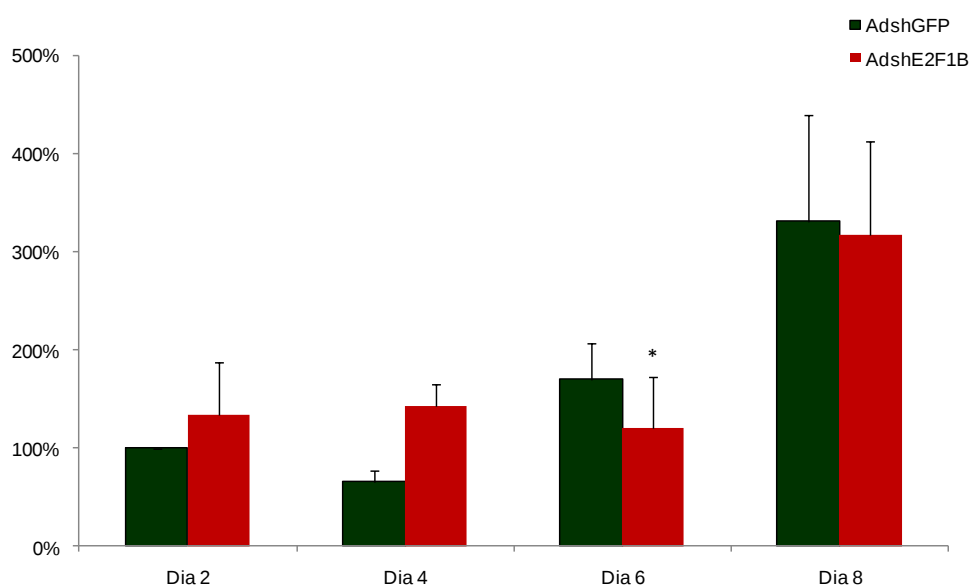


Figura 43. Curva de expressão de E2f3 por PCR em Tempo Real em células B16mCAR com simples transdução de AdshGFP e AdshE2F1-B (i). Os RNAs extraídos foram coletado de 2 em 2 dias, e a expressão de AdshGFP em células B16mCAR do dia 2 foi considerada como 100%. O gráfico representa um único experimento, realizado em duplicata experimental. * $P < 0,03$, quando comparado ao seu repectivo ao controle.

4.5.5 Análise fenotípica da proliferação em células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B

Com o intuito de se averiguar o potencial da construção AdshE2F1-B na alteração da proliferação celular, foi traçada uma curva de proliferação *in vitro*. Nesta, células B16mCAR foram transduzidas uma vez com AdshE2F1-B (i), e células sem transdução foram utilizadas como controle. Após a simples

transdução, as células foram coletadas e contadas de 2 em 2 dias até se completar um período de 8 dias (tabela 10; fig.44).

Tabela 10: Ensaio fenotípico de proliferação celular *in vitro* em células B16mCAR com AdshE2F1-B (simples transdução) ou não transduzidas (controle) ao longo de 8 dias.

	AdshE2F1B	B16mCAR
Dia 0	$2,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
Dia 2	$2,12 \times 10^5$	$3,06 \times 10^5$
Dia 4	$7,94 \times 10^5$	$9,86 \times 10^5$
Dia 6	$10,38 \times 10^5$	$11,54 \times 10^5$
Dia 8	$5,48 \times 10^5$	$5,14 \times 10^5$

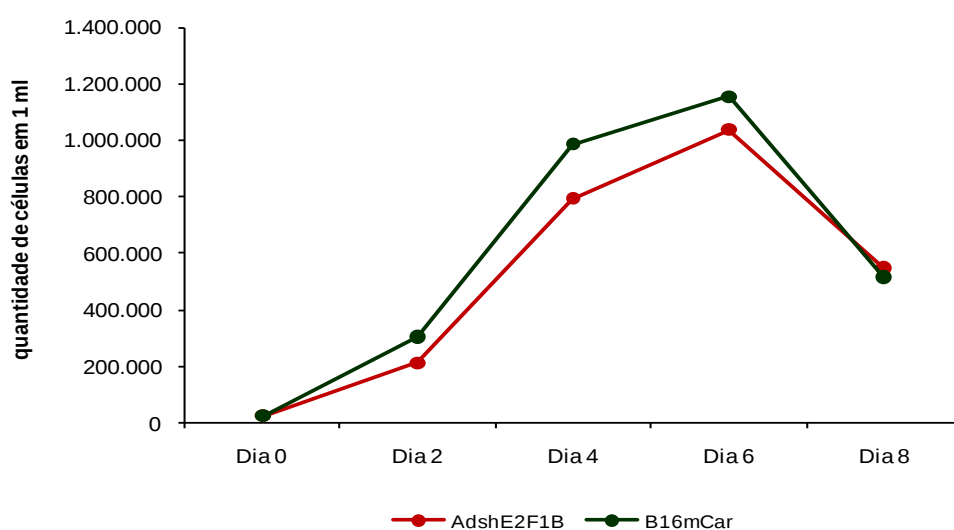


Figura 44. Ensaio fenotípico de proliferação celular *in vitro* em células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B ou não transduzidas (controle). O gráfico representa um único experimento, com simples transdução.

Não houve diminuição significativa da proliferação das células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B, quando comparada às controle (células B16mCAR sem transdução). O declínio de ambas no último dia de coleta reflete possivelmente morte celular, uma vez que estas se encontravam em máxima confluência.

Com a finalidade de verificar mais a fundo se a construção AdshE2F1-B poderia vir a alterar a proliferação celular, foi realizada uma nova curva de proliferação *in vitro*, agora com dupla transdução, onde foram utilizados dois lotes diferentes de AdshE2F1-B (i e ii). Células transduzidas com AdshGFP

foram utilizadas como controle. Após a dupla transdução, as células foram coletadas e contadas de 2 em 2 dias até se completar um período de 8 dias (tabela 11; fig.45).

Tabela 11: Ensaio fenotípico de proliferação celular *in vitro* em células B16mCAR ao longo de 8 dias (dupla transdução).

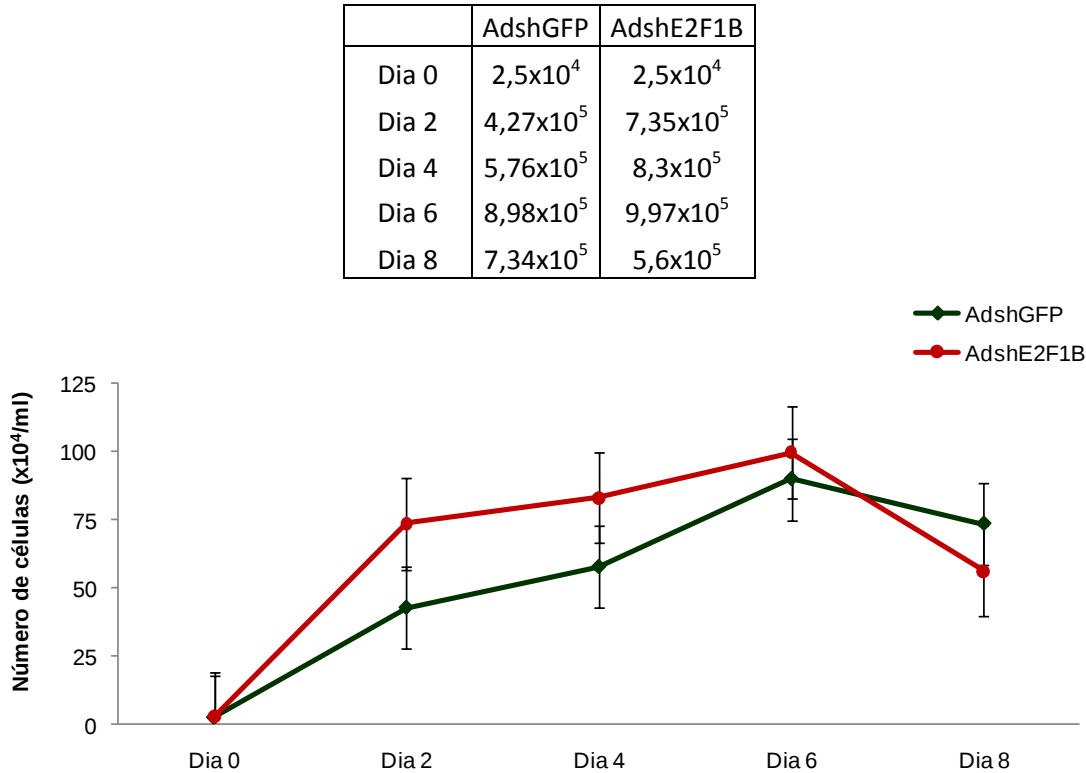


Figura 45. Ensaio fenotípico de proliferação celular *in vitro* em células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B ou não transduzidas (controle). O gráfico representa a média de dois experimentos distintos com dupla transdução, em duplicata experimental, com subsequente confirmação por citometria de fluxo.

Nos resultados obtidos não foi verificada nenhuma redução da proliferação (fig.45). No entanto, as quantidades entre as células transduzidas com AdshE2F1-B e as transduzidas com o controle AdshGFP mostram-se muito similares, sem significância estatística. O declínio de ambas no último dia de coleta reflete possivelmente morte celular, uma vez que estas se encontravam confluentes.

4.5.6 Análise do Ciclo Celular

Com a finalidade de se verificar a influência da redução de *E2f1* ao longo do ciclo celular, uma nova curva de proliferação celular foi traçada e analisada por citometria de fluxo. As porcentagens de cada fase do ciclo foram adquiridas através da análise pelo software *ModFit LT Win 32* (tabela 12; fig.46).

Tabela 12: Análise das fases do ciclo por citometria de fluxo

		% G1	% S	% G2
Dia 2	AdshGFP	86,825	4,9175	8,255
	AdshE2F1B	73,78333	9,905	16,315
Dia 4	AdshGFP	88,09	5,655	6,255
	AdshE2F1B	84,36	6,908571	8,734286
Dia 6	AdshGFP	73,81	17,6575	8,535
	AdshE2F1B	80,31	11,955	7,735
Dia 8	AdshGFP	80,2725	12,5975	7,13
	AdshE2F1B	84,1225	11,72	4,15625

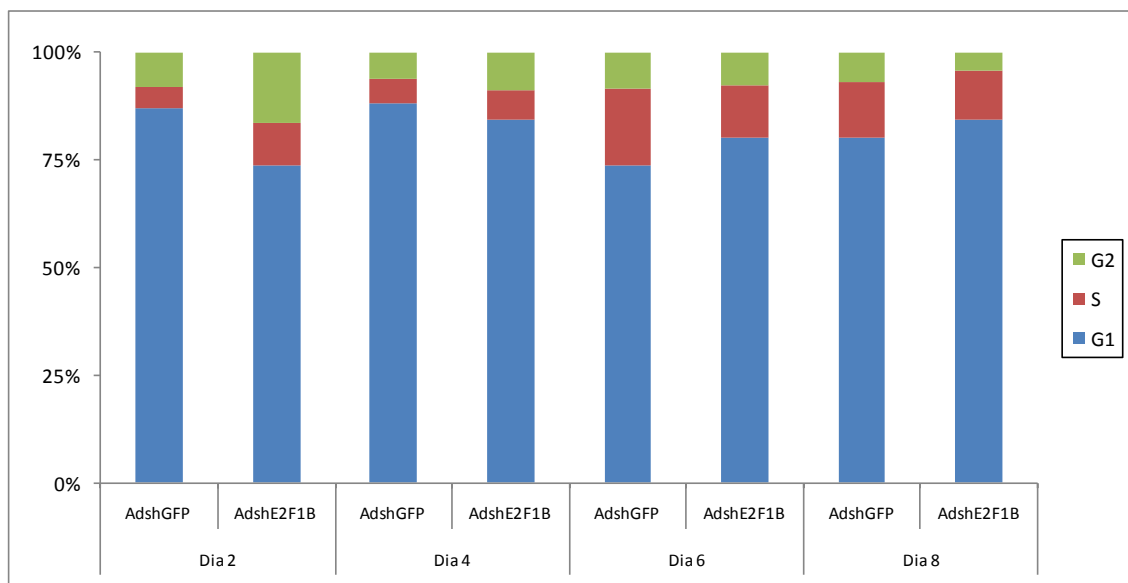


Figura 46. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Foi realizado um ensaio de proliferação *in vitro* em células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B ou não transduzidas (controle) ao longo de 8 dias. O gráfico representa a média de um experimento com dupla transdução, em quadruplicata experimental. Uma redução significativa pode ser observada em G₂ nas amostras transduzidas com AdshE2F1-B ao longo de 8 dias (análise estatística demonstrou $P < 0,0001$ no dia 8 de AdshE2F1-B, quando comparado ao dia 2 de AdshE2F1-B).

Não foram observadas grandes alterações ao longo do ciclo celular nas células transduzidas com AdshE2F1-B, quando comparadas ao controle AdshGFP. No entanto, pode-se verificar uma importante redução de G₂ nas células transduzidas com AdshE2F1-B no decorrer dos oito dias de coleta, sugerindo uma possível parada em G₀.

4.6 Papel de E2F1 na proliferação celular *in vivo*

4.6.1 Padronização do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 com células B16mCAR

Para padronização do crescimento tumoral, diferentes concentrações de células B16mCAR foram injetadas na pata posterior, sendo a contralateral utilizada como controle do crescimento. Os animais tiveram suas patas posteriores mensuradas uma vez por semana, até o período final de três semanas (fig.47).

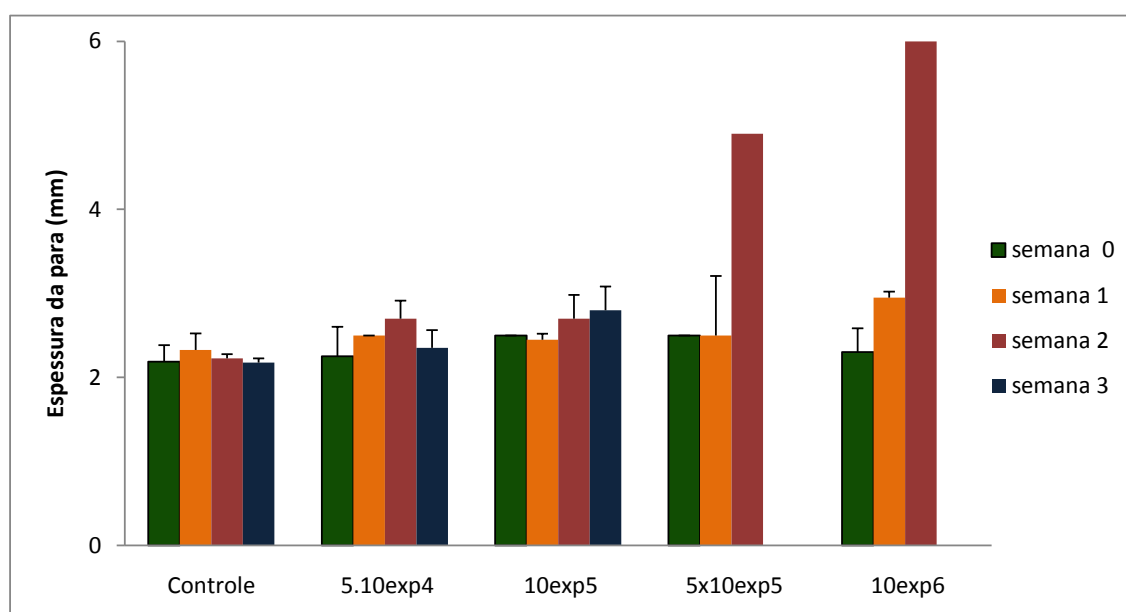


Figura 47. Medida da espessura das patas de camundongos C57BL/6 ao longo de três semanas. O controle é dado pela média das patas contralaterais de todos os animais. Os animais inoculados com as concentrações de 5×10^5 e 10×10^6 foram eutanasiados na segunda semana. Os valores de cada concentração foram obtidos pela média da duplicata. Neste experimento foram utilizados oito animais.

Os resultados mostraram-se coerentes com as quantidades inoculadas (figs.48 e 49), e pode-se definir em 5×10^5 a concentração ideal para acompanhamento do tumor.

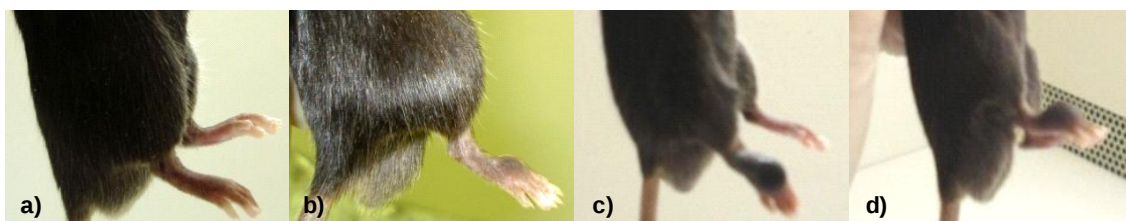


Figura 48. Curva de crescimento de células B16mCAR *in vivo*. Camundongos C57BL/6 foram injetados com diferentes quantidades de células B16mCAR: a) 5×10^4 ; b) 10^5 ; c) 5×10^5 ; d) 10^6 . As fotos a) e b) foram capturadas na terceira semana após a injeção, e as fotos c) e d) na segunda semana.

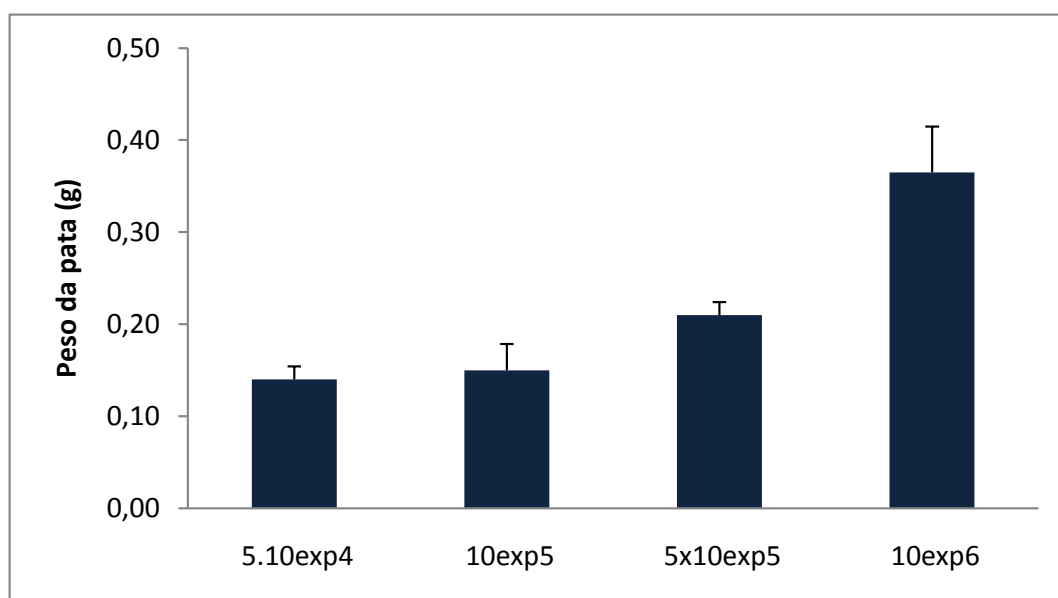


Figura 49. Peso das patas posteriores de camundongos C57BL/6 após duas (para animais inoculados com 5×10^5 e 10^6 células B16mCAR) ou três semanas (para animais inoculados com 5×10^4 e 10^5 células B16mCAR). O controle é dado pela média das patas contralaterais de todos os animais juntos.

4.6.2 Análise da proliferação celular em camundongos C57BL/6 com células B16mCAR e células B16mCAR transduzidas com AdshGFP e AdshE2F1-B

Com a padronização do crescimento tumoral estabelecida, 5×10^5 células B16mCAR foram transduzidas duas vezes com AdshE2F1-B (i) e AdshE2F1-B (ii), e células transduzidas com AdshGFP ou não transduzidas foram utilizadas como controle para se averiguar a proliferação celular *in vivo* (tabela 13; figs.50 e 51). O mesmo procedimento foi utilizado para inoculação e obtenção dos pesos e medidas dos camundongos.

Tabela 13: Curva de proliferação celular *in vivo* em células B16mCAR com AdshE2F1-B, AdshGFP (dupla transdução) ou não transduzidas (controle) ao longo de três semanas.

	Espessura da pata (mm)			
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Controle	2,0194	2,0417	2,0833	2,0
B16mCAR	2,0	2,2222	2,4444	3,6667
AdshGFP	2,0	2,1667	2,3889	2,5000
AdshE2F1B (i)	2,0	2,9167	2,0278	3,0
AdshE2F1B (ii)	2,0	2,6056	1,9667	3,1667

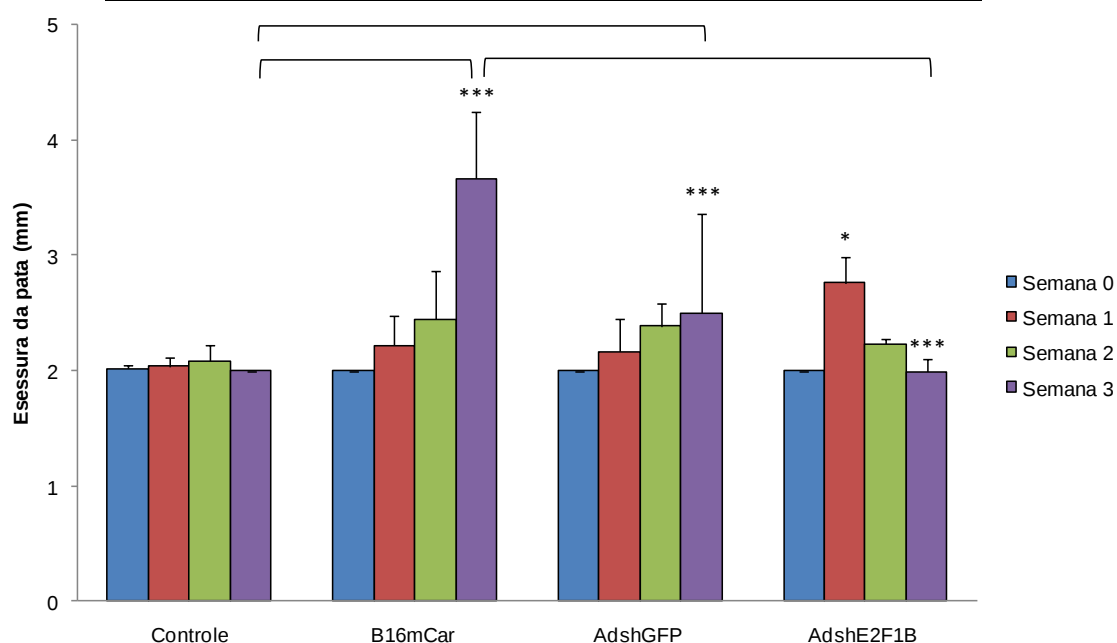


Figura 50. Medida da espessura das patas de camundongos C57BL/6 ao longo de três semanas. O controle é dado pela média das patas contralaterais de todos os animais. Os valores de cada concentração foram obtidos pela média da duplicata ou triplicata. Neste

experimento foram utilizados seis animais para o controle B16mCAR sem transdução, seis animais para o controle transduzido com AdshGFP e 13 animais para células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B. $*P < 0,02$ quando comparado ao respectivo controle de cada amostra.

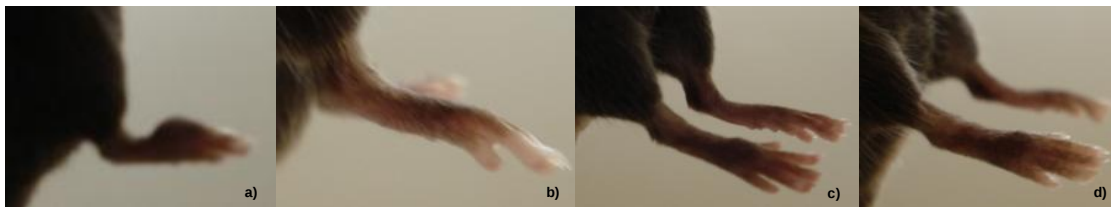


Figura 51. Representação da medida da espessura das patas de camundongos C57BL/6 ao longo de três semanas: a) B16mCAR; b) AdshGFP; c) AdshE2F1-B (i); d) AdshE2F1-B (ii).

Pode-se observar um aumento do crescimento tumoral nas células transduzidas com AdshE2F1-B na primeira semana, seguida de gradual redução, demonstrando a eficiência da inativação de *E2f1* em relação aos controles.

Todos os animais tiveram suas patas posteriores retiradas, mensuradas e pesadas. No entanto, o peso não demonstrou ser significativo, quando comparado ao controle.

Em um dos experimentos realizados, os animais foram mantidos até a terceira semana, onde observou-se que ocorreu migração das células tumorais para a perna. O crescimento tumoral estabeleceu-se então parte nas patas, parte nas pernas inoculadas (tabela 14; figs.52 e 53).

Tabela 14: Espessura das pernas (mm) de camundongos C57BL/6 ao longo de 3 semanas após a inoculação de células transduzidas ou não com AdshE2F1-B.

	Espessura da perna (mm)
Controle	4,08
B16mCAR	16,83
AdshGFP	4,00
AdshE2F1B (i)	9,33
AdshE2F1B (ii)	8,83

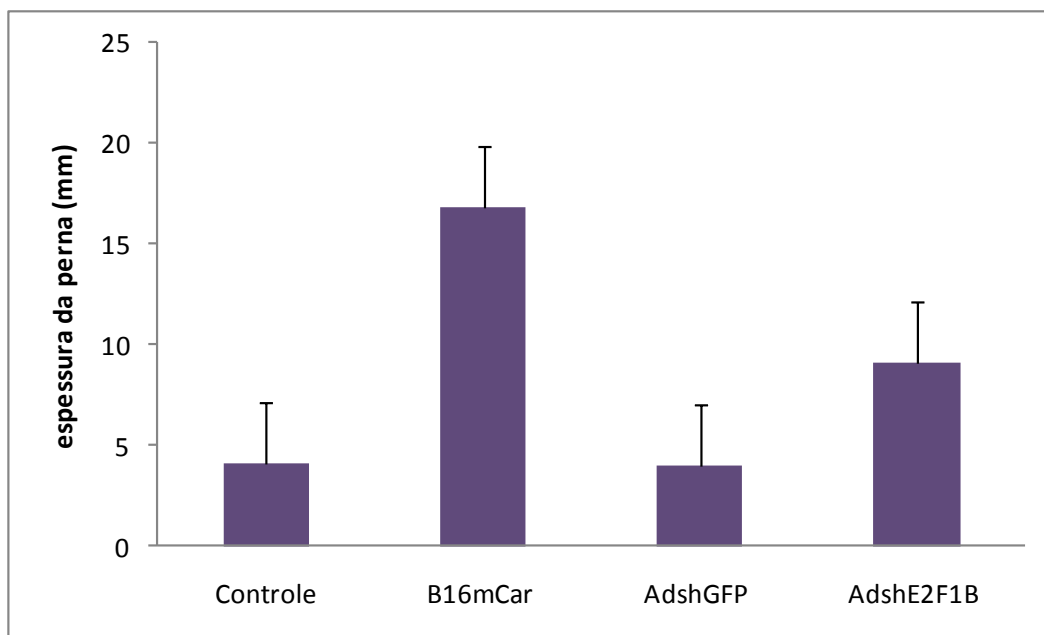


Figura 52. Espessura das pernas posteriores de camundongos C57BL/6 após três semanas. O controle é dado pela média das patas contralaterais de todos os animais juntos. Neste experimento foram utilizados doze animais, sendo cada tratamento representado pela média de triplicatas.

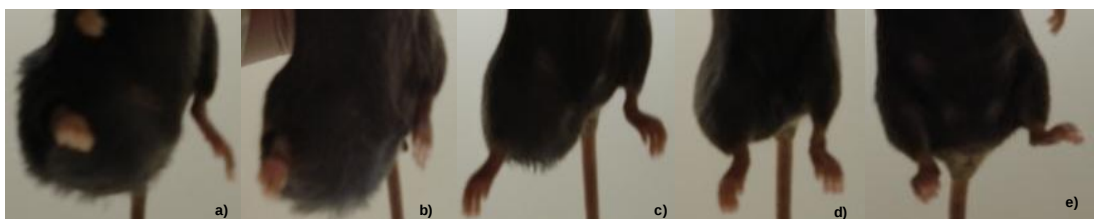


Figura 53. Representação da espessura das pernas posteriores de camundongos C57BL/6 após três semanas: a) e b) B16mCAR; c) AdshE2F1-B (i); d) AdshE2F1-B (ii); e) AdshGFP.

5. DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi verificar o papel de E2f1 na proliferação celular em modelo experimental de melanoma murino, *in vitro* e *in vivo*. Assim, em um primeiro momento, os esforços foram voltados para a preparação dos plasmídeos (pAdshE2F1-B, pAdshGFP e pAdRSVLacZ) e para produção das partículas adenovirais (AdshE2F1-B (i); AdshE2F1-B (ii); AdshGFP e AdRSVLacZ).

Deste modo, e com o intuito de se melhorar a qualidade e a quantidade do produto final da preparação plasmideal, uma preparação em média escala dos plasmídeos com código para shRNAs foi obtida (fig.31). As amostras tiveram suas seqüências analisadas em seqüenciador automático e demonstraram estar íntegras (fig.32).

Em seguida, os plasmídeos foram submetidos à linearização com a enzima *Pac I* (fig. 33) para poderem então ser transfectados em células HEK 293 e originar a primeira passagem de amplificação dos adenovírus. Após superação de diversos problemas técnicos, foram obtidas as produções adenovirais na passagem P4, sendo esta a selecionada para validação e utilização da construção do shE2f1, justamente por conter maior aumento na concentração de partículas adenovirais (tabela 9).

Segundo Ponder *et al* (2001) e Roy-Chowdhury *et al* (2002), uma titulação adenoviral apropriada é obtida a partir de 10^{10} partículas por ml, e é considerada estável para congelamento a partir de 10^{12} partículas por ml, ambos após purificação da solução viral. Tendo isto em vista, é importante ressaltar que as produções adenovirais aqui apresentadas não foram submetidas à purificação, o que pode levar a uma produção com títulos inferiores, como observado em AdshGFP e AdRSVLacZ. Entretanto, isto não interferiu na obtenção nos experimentos subseqüentes. Porém, para AdshE2F1-B (i) e (ii) o método utilizado mostrou-se mais eficiente, uma vez que produziu títulos tão altos como os obtidos em soluções purificadas.

Em um segundo momento, a otimização da transdução com AdRSVLacZ foi iniciada. Para tanto, primeiramente foram testados quatro diferentes tipos de

fixadores - paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% com glutaraldeído 0,2%, e formaldeído 3,7% - sendo este último o responsável pelo maior aumento da eficiência de detecção na transdução de partículas de AdRSVLacZ nas células B16mCAR, sendo, portanto, o fixador selecionado para os estudos subseqüentes. A coloração por solução X-Gal mostrou ser um método apropriado e prático para verificação da expressão da β -galactosidase, enzima codificada pelo gene repórter *lacZ*, onde a presença desta enzima é indicada pela produção de pigmentação azul nas células transduzidas (revisto em Joung *et al*, 2000).

A partir disto, novos testes foram realizados visando a adequação da quantidade de células B16mCAR a serem transduzidas, verificação da receptividade às partículas adenovirais e otimização do número de partículas necessárias para a transdução. Para a transdução com AdRSVLacZ, a quantidade de células foi estabelecida em 5×10^4 células por poço, e a quantidade de partículas adenovirais em aproximadamente $7,9 \times 10^8$ partículas por ml. Primeiramente, foi testada a eficiência por simples transdução, onde se observou que cerca de 60% das células foram transduzidas (fig.34). Com o intuito de se aumentar a eficiência, novos experimentos foram realizados com dupla transdução, o que resultou em praticamente 100% de eficiência de entrega do transgene (fig.35). Deste modo, a eficiência por dupla transdução provou ser muito mais efetiva, sendo então empregada na maioria dos estudos subseqüentes.

Após a otimização, a construção do cassete de expressão de shE2f1 foi validada em vetor adenoviral nas células B16mCAR, onde foi verificada uma redução da expressão gênica em até 50% no nível do RNA, e de aproximadamente 60% no nível protéico (fig.37). A metodologia de utilização do shE2f1 mostrou-se adequada para a inativação do gene *E2f1*, uma vez que conseguiu reduzir sua expressão em células de camundongo. Em trabalho anterior em nosso grupo, o mesmo cassete de expressão foi utilizado para inativação de *E2f1* em células de glioma de rato (Vasques *et al*, 2009), o que comprova sua eficiência e interespecificidade. Porém, a eficiência obtida no presente trabalho foi um pouco inferior à do trabalho anterior. Tal fato pode

estar intimamente relacionado ao tipo de metodologia empregada, uma vez que neste estudo foram utilizados *pools* celulares, enquanto que no anterior a inativação foi obtida por clones celulares. De qualquer forma, metodologia de shRNA mostrou-se adequada e eficiente para a inativação de *E2f1* em ambos os estudos.

A partir de então, novos experimentos foram realizados, com o intuito de se averiguar o perfil de expressão dos genes *E2f1*, *E2f2*, *E2f3* e *Ciclina E* em células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B. A análise da expressão de *E2f1* realizada por qRT-PCR revelou um silenciamento de aproximadamente 55% a nível do RNA (fig.38 A), quando comparado às células controle (AdshGFP). Estes dados são semelhantes aos obtidos anteriormente. Entretanto, no nível protéico, a expressão foi ainda menor, onde a redução foi de 70% (fig.38 B). Isto indica que, apesar do nível de RNA estar reduzido pouco mais que a metade, reflete numa diminuição mais significativa no nível protéico. Provavelmente este fenômeno deve estar relacionado a um maior *turnover* do RNA de *E2f1*, do que de sua proteína.

Uma vez que o papel de *E2f1* na proliferação celular e sua sobreposição com outros genes da família ainda são controversos, onde estudos apontam para o efeito compensatório de outros genes E2f na ausência de *E2f1* (DeGregori *et al*, 1995; Takahashi *et al*, 2000; Kong *et al*, 2007), a análise da expressão de *E2f2* e *E2f3* também foi realizada. A expressão destes genes foi observada porque *E2f2* e *E2f3* também são ativadores da proliferação celular (revisto em Kurreck, 2009), e poderiam compensar a ausência de *E2f1* em células transduzidas com AdshE2F1-B, por meio do aumento de seus níveis de expressão. No entanto, os resultados obtidos por qRT-PCR em experimento de curto prazo, não revelaram alteração significativa da expressão de *E2f2* e *E2f3*, na ausência de *E2f1*, quando comparada aos controles (fig.39). Estes resultados estão de acordo com dados obtidos em outros estudos, como os de Li *et al* (2003), Goto *et al* (2006) e Vasques *et al* (2009), que demonstraram não haver alteração significativa da expressão destes genes em células murinas duplo-*knockout* para *E2f1/E2f2*, células HeLa com *knockdown* para *E2f1* e células de glioma de rato com *knockdown* para *E2f1*, respectivamente. Deste

modo, pode-se concluir que não há efeito compensatório na ausência de *E2f1* em células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B e que o shE2F1-B é específico para a inativação de *E2f1*, não havendo inativação cruzada de *E2f2* e *E2f3*, apesar de possuírem domínios semelhantes à *E2f1*, comprovando assim a alta especificidade desta ferramenta.

A análise da expressão da *Ciclina E* também foi averiguada nas células B16mCAR transduzidas com AdshE2f1-B, uma vez que é controverso o papel de *E2f1* como seu ativador transcricional (DeGregori *et al*, 1995; Takahashi *et al*, 2000; Stevens & Thangue, 2003; Kong *et al*, 2007). Os poucos trabalhos que avaliaram esta regulação foram realizados em sistemas de super-expressão de *E2F1*, onde a *Ciclina E* também encontrava-se super-expressa (Ohtani *et al*, 1995; Inoshita *et al*, 1999, Takahashi *et al*, 2000). Entretanto, em estudos onde houve o silenciamento de *E2f1*, como os modelos: duplo-nocaute *E2F1/E2F2* (Li *et al*, 2003), células HeLa (Goto *et al*, 2006) ou células de glioma de rato (Vasques *et al*, 2009) *knockdown* para *E2F1/E2f1*, sua expressão não mostrou-se alterada. Os resultados obtidos (fig.40) mostraram que, neste sistema estudado, houve uma diminuição da expressão da *Ciclina E* em cerca de 40%, quando comparada ao controle, acompanhando a diminuição da expressão de *E2f1*. Estes resultados são contrários aos obtidos nos modelos de inativação de *E2f1* supracitados, e corroboram com os achados de super-expressão de *E2f1*, sugerindo que *E2f1* controla a expressão da *Ciclina E* nas células de melanoma, B16mCAR. Esta diminuição pode, eventualmente, contribuir para uma efetiva diminuição da proliferação celular. No entanto, é possível que a divergência dos resultados apresentados nos diversos estudos citados esteja relacionada ao tipo celular, tempo de experimento e método de inativação gene-específica.

Com a finalidade de se verificar a manutenção da inativação, foi averiguada a expressão de *E2f1*, *E2f2* e *E2f3* a médio prazo, uma curva de expressão *in vitro* com simples transdução foi traçada, onde as amostras transduzidas foram coletadas de 2 em 2 dias por um período de 8 dias. A expressão de *E2f1* ao longo da curva sofreu maior diminuição no quarto e sexto dias, com leve aumento no oitavo dia (fig.41). Assim, os resultados

obtidos indicam uma ação duradoura da inativação de *E2f1* a médio prazo, com grande redução a partir do 4º dia da transdução, demonstrando que esta é uma potente ferramenta que pode ser utilizada para estudos de médio prazo. É importante ressaltar que todas as curvas de expressão foram realizadas apenas por simples transdução, pois a otimização das mesmas com dupla transdução não foram bem sucedidas, uma vez que as células entravam em confluência no 4º ou 5º dia após as transduções, dificultando as análises posteriores. Foram também realizadas tentativas de curvas com uma menor quantidade de células iniciais. Todavia, as soluções virais mostraram-se tóxicas na baixa confluência celular, impedindo assim uma correta análise do experimento em questão.

A expressão de *E2f2* ao longo da curva também mostrou-se reduzida (fig.42), com diminuição similar à de *E2f1*. O fenômeno aqui observado poderia ser recorrência de dois fatores distintos: a) o shE2f1 interfere na expressão de outros genes da família E2F, sendo portanto uma ferramenta inespecífica; ou b) *E2f1* estaria controlando a expressão de *E2f2* a médio prazo, uma vez que a diminuição de ambas são similares ao longo dos dias de coleta da curva de proliferação. Como visto anteriormente, em experimento de curto prazo com dupla transdução, não há inativação cruzada, tanto de *E2f2*, como de *E2f3*. Estes dados corroboram com os testes executados *in silico* no processo de escolha da região a ser alvejada por shE2F1. Uma análise comparativa foi realizada através do programa *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) entre a sequência do siRNAE2F1-B utilizado no presente trabalho, e a sequência do cDNA de *E2f2* de *Mus musculus* (fig.54), onde pôde-se constatar que não há complementaridade entre os nucleotídeos 2 a 8 (região semente do siRNA – vide fig.12), e que, portanto, o siRNA desenhado não deve alvejar *E2f2*. Com isso, o resultado obtido foi surpreendente, pois sugere que *E2f1* controla a expressão de *E2f2*, fenômeno que só foi possível se observar a médio prazo. Porém, na literatura não foram encontrados dados que indiquem que *E2f2* esteja sob o controle de *E2f1*, o que torna os resultados obtidos ainda mais interessantes, e que, portanto, necessitam ser melhor explorados. Além disso, em estudo realizado por Infante *et al* (2008) foi demonstrado que o

knockdown de E2F1 a curto prazo eleva o efeito da perda de E2F2 em linfócitos T deficientes em *E2f2*. Segundo os autores, a diminuição concomitante de E2f1 e E2f2 resulta em um aumento da desregulação de um conjunto de genes, sobretudo associados à proliferação, o que sugere que a expressão de muitos destes genes esteja sob o controle transcricional de E2f1/E2f2.

```

Score = 17.5 bits (18), Expect = 0.23
Identities = 11/12 (92%), Gaps = 0/12 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 961 ATCCAGTGGGTA 972
      |||||
Sbjct 8 ATCCAGTGGGTA 19

Score = 15.7 bits (16), Expect = 0.79
Identities = 8/8 (100%), Gaps = 0/8 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 2229 TATCCAGT 2236
      |||||
Sbjct 7 TATCCAGT 14

Score = 15.7 bits (16), Expect = 0.79
Identities = 8/8 (100%), Gaps = 0/8 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 2717 CCACTGGA 2724
      |||||
Sbjct 16 CCACTGGA 9

Score = 15.7 bits (16), Expect = 0.79
Identities = 8/8 (100%), Gaps = 0/8 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1512 AGCCACTG 1519
      |||||
Sbjct 18 AGCCACTG 11

Score = 13.9 bits (14), Expect = 2.8
Identities = 7/7 (100%), Gaps = 0/7 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 927 TATCCAG 933
      |||||
Sbjct 7 TATCCAG 13

Score = 13.9 bits (14), Expect = 2.8
Identities = 7/7 (100%), Gaps = 0/7 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 4518 GTGGCTA 4524
      |||||
Sbjct 13 GTGGCTA 19

```

Figura 54. Verificação da especificidade do AdshE2F1-B. Estudo de complementaridade entre as seqüências do RNAm do fator de transcrição E2F2 de *Mus musculus* e do siRNA de E2F1, através da ferramenta *Blast* do NCBI (número da busca: LOCUS NM_177733).

Já a expressão de *E2f3* (fig.43) não mostrou alterações significativas no decorrer da curva de expressão, e, portanto, parece não ter sua expressão regulada por E2f1, e tampouco atua como efeito compensatório na ausência de *E2f1*.

Em paralelo às curvas de expressão, curvas de proliferação *in vitro* foram realizadas, tendo por objetivo averiguar o potencial da construção AdshE2F1-B na alteração da proliferação celular. Para tanto, inicialmente foi

traçada um curva com simples transdução, onde as células foram coletadas e contadas de 2 em 2 dias por um período de 8 dias. Neste experimento não se observou diminuição significativa da proliferação das células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B, quando comparada às controle (fig.44). Uma vez que a simples transdução não indicou alteração na proliferação celular, uma nova curva foi traçada com dupla transdução (fig.45), onde se observou resultado semelhante ao da simples transdução, sem diminuições significativas. Assim como nas curvas de expressão, foi encontrada certa dificuldade metodológica para adequação à dupla transdução, uma vez que a confluência das células ocorre antes do término do experimento, o que leva ao declínio da curva entre o 6º e 8º dias. Outro provável agravante metodológico baseia-se no fato das soluções adenovirais não terem sido purificadas, e, como o uso do AdshGFP não contém diluições, os *debris* parecem ser tóxicos para as células tratadas com esta solução viral, alterando assim os resultados vistos. Contudo, em trabalho recentemente publicado, Alla e seus colaboradores (2009) realizaram o *knockdown* de *E2f1* por shRNA em modelo de melanoma metastático, com o uso de células SK-Mel. Verificou-se que a presença do shE2f1 foi capaz de reduzir a capacidade de invasão de células metastáticas *in vitro*, mas não pôde alterar sua atividade de proliferação, uma vez que os dados obtidos na análise fenotípica dessas células se mantiveram similares (E2F1 shRNA *versus* shRNA controle). Estudos realizados por Humbert *et al* (2000) e Wu *et al* (2001), também verificaram que o *knockdown* de E2f1 não afeta a proliferação, uma vez que a divisão celular em células murinas prosseguiu normalmente. Assim, os resultados aqui apresentados (figs. 44 e 45) encontram-se de acordo com o observado por nos estudos acima citados. No entanto, outros resultados obtidos anteriormente em nosso grupo divergem dos descritos até o momento (Vasques *et al*, 2009), uma vez que o *knockdown* de E2f1 demonstrou alterar significativamente a progressão da proliferação celular, remanescendo apenas cerca de 30% da capacidade proliferativa em células de glioma de rato contendo o shE2f1.

Uma nova curva de proliferação de 8 dias com dupla transdução foi realizada e coletada de 2 em 2 dias, para análise do ciclo celular por citometria

de fluxo. Nesta mesma curva, nova contagem celular foi realizada por citometria, revelando uma curva fenotípica semelhante às obtidas anteriormente (figs. 44 e 45), demonstrando que a construção do shE2f1 não altera a proliferação. Como discutido anteriormente, os *debris* contidos na solução do AdshGFP parecem ser tóxicos para as células, o que provavelmente alterou os resultados obtidos; e a realização de nova curva de proliferação, com solução purificada, pode levar a outros resultados. Uma pequena modificação metodológica, onde se incluíam mais dias ao longo da curva de proliferação, também poderia ser utilizada para averiguar o real efeito de shE2f1 na proliferação celular.

A análise do ciclo celular também não apresentou modificações significativas em médio prazo (tabela 12; fig.46). Através desta, notou-se que G₁ corresponde a aproximadamente 80% do ciclo em todas as amostras, ao longo de 8 dias após a dupla transdução; a fase S apresentou aumento no dia 6, com leve redução no dia 8; e G₂ manteve-se com uma média de aproximadamente 8% do total do ciclo celular. Um dado interessante nesta análise foi a diminuição de G₂ nas amostras contendo AdshE2F1-B, onde verificou-se uma redução de $\frac{3}{4}$ desta fase do ciclo em um período de 8 dias, diminuindo assim a condição das células para entrarem em mitose, sendo este um importante fator a ser analisado para compreensão da parada do ciclo celular, antes da fase mitótica.

No decorrer das diversas análises *in vitro* deste trabalho, a otimização da detecção da expressão gênica também foi feita por Western Blot. Contudo, esta detecção só foi possível nos experimentos iniciais, com a utilização do anticorpo anti-E2f1 na análise da expressão de E2f1. Apesar da otimização desta metodologia, não foi possível realizar a análise com os anticorpos anti-E2f2 e anti-E2f3, uma vez que estes apresentaram marcação inespecífica, onde todas as proteínas presentes ficaram marcadas nas membranas das amostras. A detecção com o anticorpo anti-Ciclina E também não foi possível, onde nenhuma banda foi obtida. Assim, para futuras análises por Western Blot, novos anticorpos devem ser adquiridos e testados.

Em um terceiro momento deste trabalho, buscou-se avaliar o papel de E2F1 na proliferação celular *in vivo*, com a utilização de camundongos C57BL/6 como modelo experimental de melanoma. Para tanto, uma padronização do crescimento tumoral foi previamente realizado, com a injeção subcutânea de diferentes concentrações de células B16mCAR em uma das patas posteriores de cada animal. Após três semanas de acompanhamento e mensuração das patas, os animais foram eutanasiados e o peso e espessura final das patas foram obtidos, tendo a contralateral como controle. Como resultado, pôde-se definir a quantidade ideal a ser inoculada em estudos subseqüentes em 5×10^5 (figs. 47, 48 e 49). A metodologia empregada mostrou-se adequada para experimentos a longo prazo, uma vez que as células injetadas permaneceram no local da inoculação, resultando não só em um modo mais apropriado para a retirada de medidas ao longo das semanas, como também proporcionou uma melhor qualidade de vida aos animais, quando comparados à metodologias de inoculação subcutânea dorsal ou caudal-sistêmica.

Após padronização, deu-se início aos experimentos contendo células duplamente transduzidas com dois lotes distintos de AdshE2F1-B (i ou ii) ou AdshGFP (controle). Células B16mCAR sem transdução também foram utilizadas como controle. Observou-se um aumento do crescimento tumoral nas células transduzidas com AdshE2F1-B logo na primeira semana, seguida de progressiva redução até a terceira semana de experimentação, quando comparadas aos controles, demonstrando assim a eficiência da inativação de *E2f1* em relação aos controles (tabela 13; figs. 50 e 51). Foi possível verificar também que o crescimento dos animais inoculados com B16mCAR sem transdução foi maior do que o crescimento dos inoculados com AdshGFP. Como dito anteriormente, a solução viral de AdshGFP não foi purificada e não sofreu diluição alguma nos experimentos, o que pode ter contribuído para um acúmulo de *debris*, que parecem ter sido tóxicos para as células, alterando assim seu crescimento.

Dentre os vários experimentos *in vivo* realizados, um apresentou migração das células inoculadas para a perna dos animais. Estes foram

mantidos até a terceira semana, onde observou-se crescimento tumoral nas patas e/ou pernas (tabela 14; figs.52 e 53). A medida da espessura das pernas demonstrou novamente um tratamento eficiente através do AdshE2F1-B, onde os animais inoculados apresentaram cerca de 50% de redução no crescimento tumoral, quando comparados com os controles inoculados com células B16mCAR não transduzidas. No entanto, não foi observada nenhuma alteração significativa nos animais que continham AdshGFP; onde esta inalteração pode ser explicada por duas razões: a) o acúmulo de debris não só alterou o padrão de proliferação celular, como também acarretou em morte das células transduzidas; b) a migração das células transduzidas atingiu o coração e pulmões dos camundongos. Apesar da migração dessas células não ter sido confirmada, pois não foi realizada a dissecação de nenhum dos animais em questão, a razão mais coerente e compatível com os dados aqui apresentados apontam para uma grande perda de células, ocasionado pelo excesso de *debris* em AdshGFP, fato observado em experimentos de médio prazo *in vitro*. Outro empecilho verificado foi a densidade do tumor que, por ser um melanoma, é formado por uma cápsula que contém o tumor em estado semi-líquido, o que o impossibilita para uma dissecação tumoral ou extração para ensaios de imunohistoquímica.

Com a finalidade de melhorar resultados futuros, inclusive para a produção do artigo científico deste trabalho, algumas possíveis soluções para a instabilidade do controle AdshGFP podem ser enumeradas: 1) purificação das soluções adenovirais por centrifugação em gradiente de concentração de cloreto de cério (segundo He *et al*, 1998) ou por kits de purificação previamente estabelecidos; 2) dissecação dos animais inoculados para averiguar se há migração para órgãos internos; 3) mudança metodológica na inoculação das células transduzidas *in vivo*, injetando as células subcutaneamente na superfície plantar das patas (segundo protocolos validados por Sasamura *et al*, 2002; Brigatte *et al*, 2007; Fujita *et al*, 2009; Gao *et al*, 2009; Greay *et al*, 2010).

Tendo em vista os resultados aqui descritos, é interessante notar que, apesar da ampla literatura acerca da família E2F, a contribuição e função

específica de cada membro dentro do ciclo celular ainda permanecem pouco definidas. Análises por microarrays demonstraram que a expressão ectópica de E2f1, E2f2 e E2f3 não apenas induzem a ativação transcricional, mas também poderiam reprimir a transcrição de diversos genes de forma indireta (Müller *et al*, 2001; Young *et al*, 2003). Em outro estudo, Chen *et al* (2007) analisaram e compararam a capacidade oncogênica dos membros de E2F em fibroblastos modificados, onde foi verificado que: a) E2F2 e E2F3a possuem uma grande capacidade oncogênica (pró-oncogênicos); b) E2F1 e E2F6 apresentaram-se neutros; e c) E2F4 e E2F5 provaram ter uma alta capacidade de inibir a transformação celular (anti-oncogênicos). Os resultados apresentados por Chen *et al* são contrastantes com a maioria dos dados da literatura, uma vez que E2F1 é descrito classicamente como um fator bastante comum entre diferentes tipos de tumores, e que atua em duas vias antagônicas – na proliferação celular e na apoptose (Pierce *et al*, 1999; Stevens & Thangue, 2003; De Gregori & Johnson, 2006). No entanto, foi proposto por alguns autores algumas funções diferentes para E2F1 a E2F3: a principal função de E2F1 seria como indutor da apoptose e supressor tumoral, enquanto que E2F3 seria o fator primariamente requerido para a promoção da progressão do ciclo em células normais (incluindo o desenvolvimento embrionário em murinos), e que E2F2 seria o responsável pela repressão de genes do ciclo celular, mantendo a células em quiescência (Gaubatz *et al*, 2000; Infante *et al*, 2008; Chong *et al*, 2009). Como visto acima, a família E2F é de extrema importância para a regulação da progressão do ciclo celular, porém, muitas incongruências são encontradas, e mais estudos acerca de suas funções e correlações com as cascatas de sinalização devem ser averiguados. Assim, a maior compreensão destes fatores de transcrição e sua relação com a proliferação celular e apoptose são altamente promissores, tanto para estudos de função gênica, quanto para terapias envolvendo o aumento exacerbado no número de células, como é o caso dos diversos tipos de câncer.

Levando-se em consideração a importância do estudo desses genes, a metodologia de siRNAs torna-se cada vez mais apropriada para o estudo de suas funções, uma vez que age de modo específico. Segundo Kurreck (2009),

no uso de RNAs interferentes são necessárias diversas investigações preliminares antes do seu uso em si, tais como a validação de múltiplos siRNAs contra a mesma sequência alvo; verificação de efeitos inespecíficos durante a aplicação do RNAi, que incluem os efeitos off-target, a resposta interferon e as reações cruzadas com a via dos microRNAs; além de controles adequados para as análises nos níveis de RNAm e proteína. Para tratamentos de infecções virais ou de câncer, o uso de siRNAs imuno-moduladores pode ser muito eficaz, pois têm função de *knockdown* do gene alvo sem ativar a resposta interferon.

Como visto anteriormente no item 1.4, a ferramenta RNAi possui grande especificidade, sendo portanto uma metodologia apropriada para estudos tanto em células em cultura como em modelos experimentais *in vivo* (fig.13). Deste modo, o crescente aumento do uso desta tecnologia vem propiciando inúmeros conhecimentos, tanto em relação às investigações de função gênica e geração de bibliotecas genômicas, como em aplicações terapêuticas, incluindo estudos em doenças como a degeneração macular, infecções associadas ao HIV-1, diversos tipos de câncer e aplicação de siRNAs em ensaios clínicos. Portanto, a interferência por RNA tem se mostrado uma potente e promissora ferramenta, como demonstrado neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e apresentados no presente trabalho, pode-se concluir que:

- 1) O vetor adenoviral com código para shRNA contra o gene *E2f1*, demonstrou ser uma metodologia adequada para o *knockdown* do mesmo, já que diminuiu sua expressão em até 70%; assim sendo, a mesma construção foi validada para duas espécies distintas: *Rattus norvegicus* (Vasques *et al*, 2009) e *Mus musculus*;
- 2) A diminuição da expressão de *E2f1* em células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B foi sustentada, *in vitro*, por pelo menos 8 dias;
- 3) O AdshE2F1-B não promoveu a inativação cruzada dos genes *E2f2* e *E2f3*, confirmando sua especificidade;
- 4) Não foram demonstrados efeitos compensatórios ou alterações significativas na expressão de *E2f2* e *E2f3* na ausência de *E2f1*, a curto prazo. No entanto, pôde-se observar uma redução na expressão de *E2f2* a médio prazo, o que sugere um possível controle de *E2f1* em sua expressão nestes termos;
- 5) A expressão de *Ciclina E* apresentou diminuição de até 40% na ausência de *E2f1*, demonstrando estar sob seu controle transcricional;
- 6) A proliferação celular *in vitro* de células B16mCAR tratadas com AdshE2F1-B não foi alterada durante um período de oito dias, quando comparada aos controles, estando de acordo com os dados obtidos *in vivo*, onde verificou-se crescimento tumoral apenas ao longo da primeira semana.

Em resumo, a inativação por RNA de interferência mostrou ser uma potente ferramenta para o estudo da função gênica de *E2f1*, onde pode-se obter dados importantes tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*, e ao longo de diferentes períodos de tempo.