

internalização do adenovírus na célula. A partícula viral escapa do endossomo, libera seu genoma no núcleo e inicia sua transcrição e replicação.

De fato, a utilização de adenovírus como método de entrega apresenta diversas características que podem ser vantajosas, como: a eficiência da transdução - transduzindo células em divisão celular ou não; a produção em altos títulos (cerca de 1×10^{12} partículas/ml); a sua forma epissomal, sem integração no genoma da célula hospedeira (Ponder, 2001; Li *et al*, 2006); a facilidade de transdução em diversas células de mamíferos, e com baixa patogenicidade; a tolerância a grandes inserções de DNA (até 8 kb); o tropismo por células tumorais; e a curta duração do tratamento (Roy-Chowdhury *et al*, 2002; Li *et al*, 2006; Bangari *et al*, 2006). No entanto, há algumas desvantagens na sua utilização *in vivo* como, por exemplo, a perda gradativa da expressão gênica em animais normais após quatro semanas (Ponder, 2001) - o que pode ser uma vantagem também, dependendo do tipo e duração do estudo em questão - e a possível indução a uma forte resposta imune (Dillon *et al*, 2005).

1.5.2 Inserção de adenovírus com RNAi

Para que um RNA de interferência induza um silenciamento gênico efetivo, a molécula de RNA dupla fita deve ser entregue da maneira altamente eficaz na célula alvo (fig. 17). Para tanto, vetores virais são promissores sistemas de entrega de RNA interferentes (Li *et al*, 2006). Xia e colaboradores (2002) foram os primeiros a realizar estudos empregando adenovírus como vetor de entrega de shRNAs em modelo *in vivo*. Estes estudo demonstrou a eficiência do método de entrega, pois foi possível silenciar efetivamente o gene *GFP* no cérebro de camundongos transgênicos-GFP, após injeção local. Desde então, cerca de 25% dos ensaios clínicos com shRNA voltados para a terapia gênica têm se conduzido por meio do uso de vetores adenovirais (segundo estatísticas do *The Journal of Gene Medicine*).

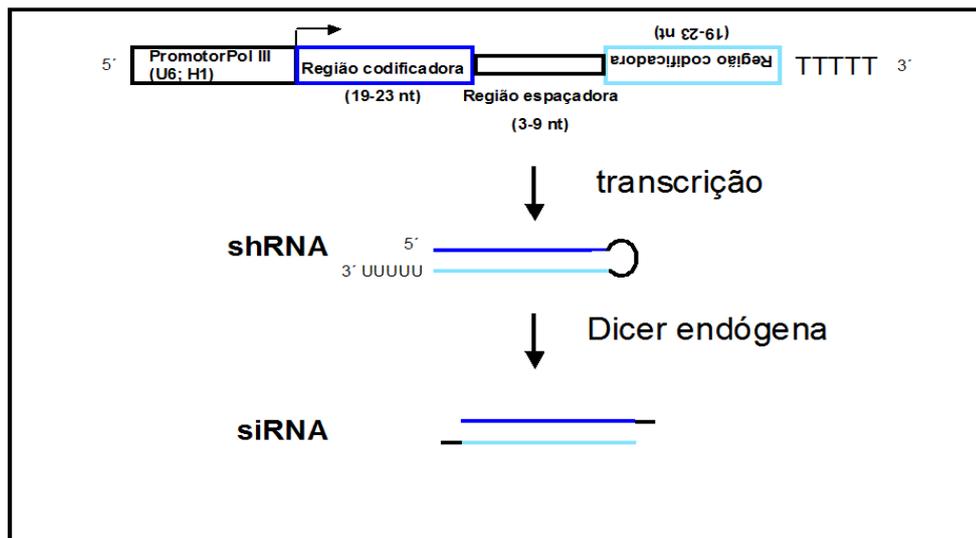


Figura 17. Esquema de vetor adenoviral para a entrega de RNAi (Paddison *et al*, 2002). Após a entrada destes na célula alvo, as moléculas de shRNAs são processadas pela Dicer, produzindo siRNAs.

Diversos estudos já apresentaram bons resultados para terapia, onde a utilização de shRNAs direcionados para inativação da expressão de genes específicos (figs.17 e 18) levou a uma diminuição da expressão de 62% a 100%, sendo estes estudos realizados em diferentes tipos celulares (Shinomiya *et al*, 2004; Stambile *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2005; Dillon *et al*, 2005). Um exemplo é o estudo *in vitro* de Zhang *et al* (2005) que, utilizando o adenovírus recombinante AdH1-siRNA/met, conseguiu diminuir 70% da expressão do gene *c-Met* em células humanas de carcinoma hepatocelular, MHCC97-L. Além disso, neste mesmo estudo, foi possível a redução da tumorigenicidade de MHCC97-L *in vivo*, após tratamento com o adenovírus, e supressão significativa do crescimento de tumores em camundongos após a injeção direta de AdH1-siRNA/met, resultado da redução da expressão de *c-Met* e posterior queda da proliferação das células malignas. Desta forma, esta foi a metodologia empregada (fig.18) no presente trabalho para a inativação do gene *E2f1* por meio de vetores adenovirais com código para shE2F1 (shRNA contra o gene *E2f1*).

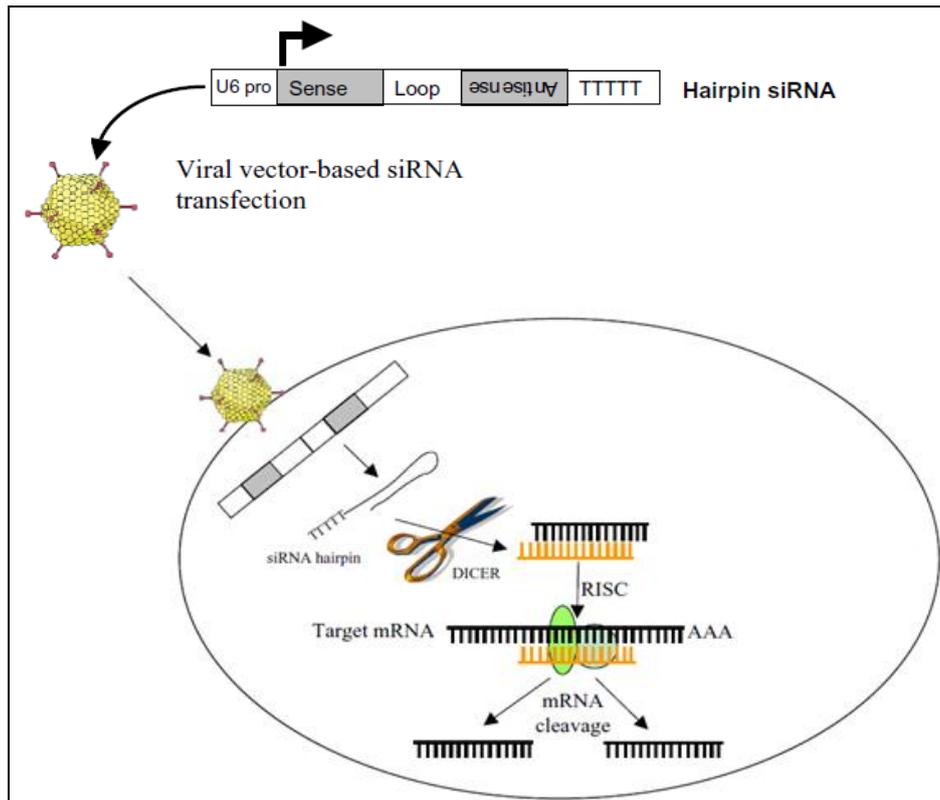


Figura 18. Utilização de shRNAs direcionados para inativação da expressão gênica (modificado de Leung, 2005). Em vetores contendo shRNAs, as fitas senso e antisenso de RNAs são conectadas entre si, formando um *loop*. O vetor adenoviral contendo o shRNA é introduzido na célula; no núcleo, sofre transcrição e é levado ao citoplasma pela exportina 5, sendo posteriormente clivado pela *Dicer*, formando duplexes de siRNAs. Os siRNAs então se associam ao complexo RISC, que separa as fitas do siRNA, onde a antisenso permanece em RISC e a senso é clivada e degradada. O siRNA encontra o mRNA alvo, ligando-se à ele por complementaridade total. Enzimas do complexo RISC clivam a molécula alvo, promovendo o silenciamento gênico.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Verificar o papel de E2F1 na proliferação celular *in vitro* e *in vivo*.

2.2 – Objetivos específicos

- Validar a construção de adenovírus com código para shE2F1 (AdshE2F1) na inativação de *E2f1* em modelo celular de camundongo;
- Analisar o efeito da inativação de *E2f1* na proliferação de células de melanoma de camundongo (células B16mCAR) *in vitro* e *in vivo*;
- Analisar o efeito da inativação de *E2f1* sobre a expressão de Ciclina E;
- Analisar o efeito de curto e médio prazo da inativação de *E2f1* sobre a expressão de *E2f2* e *E2f3*.

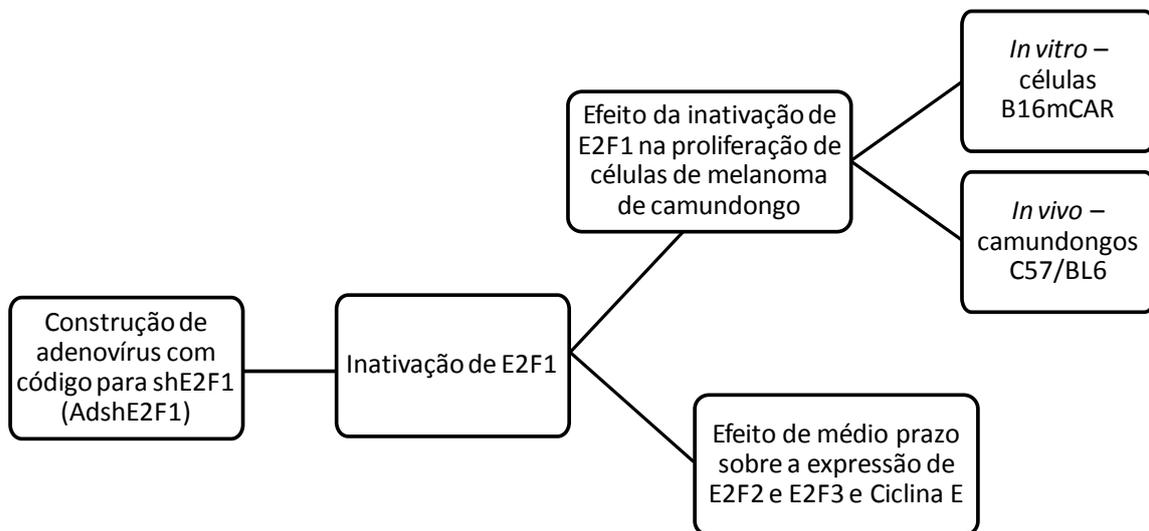


Figura 19. Esquematização dos objetivos do presente trabalho.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo Celular

3.1.1 Células de melanoma de camundongo

Com a finalidade de compreender com maior profundidade a função do gene *E2f1* na proliferação celular em melanomas, um modelo de estudo *in vitro* e *in vivo* foram estabelecidos utilizando-se células B16mCAR (gentilmente cedidas pelo Dr. Bryan E. Strauss).

As células B16mCAR são derivadas de um clone da linhagem murina B16F10, que superexpressam o receptor de membrana mCAR (*mouse coxsackie-adenovirus receptor*). Esse receptor é um facilitador da internalização de adenovírus. Isso se dá quando proteínas virais do capsídeo (*knobs*) ligam-se aos receptores CAR presentes na membrana da célula ativando outras proteínas de membrana, possibilitando assim a entrada do vírus (Melo, 2008). Com isso, uma quantidade maior de vírus poderá se internalizar nas células, gerando um aumento da produção viral.

3.1.2 Manuseio de Células B16mCAR e HEK 293

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho, B16mCAR e HEK 293 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e DMEM (Gibco), respectivamente, de acordo com o protocolo do fabricante, acrescidos de 10% de soro fetal bovino (Vitrocell) e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (Invitrogen).

Para a transfecção das células HEK 293, estas foram mantidas em meio MEM (Gibco), acrescido de 5% de soro fetal bovino (Vitrocell).

As duas linhagens celulares foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO₂. O processo de tripsinização deu-se da seguinte forma: as células foram previamente lavadas duas vezes com PBSA, e em seguida foram acrescentados 300 a 500µl de Tripsina EDTA (Vitrocell) para garrafas de 25cm² e 75cm², respectivamente. Após tripsinização, as células foram suspensas em meio de cultura e homogeneizadas.

Para congelamento, alíquotas de células em meio de cultura foram acrescidas de 10% de DMSO (Merck) e congeladas em freezer -70°C em tubos criogênicos. As células também foram regularmente submetidas a testes para a detecção de micoplasmas, e mantidas em meio de cultura acrescido de solução de ciprofloxacina (Sigma) 0,5%.

3.2 Obtenção dos vetores de Adenovírus

3.2.1 Produção de AdshE2F1-B, AdshGFP e AdRSVLacZ

A identificação das melhores regiões-alvo do gene *E2f1*, bem como a validação da molécula de shE2f1 foram realizadas em trabalho anterior (Vasques *et al*, 2010). O shRNA mais efetivo na diminuição da expressão de *E2f1* em células de rato obtido neste estudo, shE2f1-B (veja sequência-alvo, fig.), foi utilizado para a construção de vetor adenoviral AdshE2f1-B (fig.20). Como controle da interferência por RNA, o adenovírus com código para shRNA direcionado para o alvejamento do gene GFP, AdshGFP, foi construído a partir de sequência previamente descrita por Tisconia *et al*. (2003) e Mousses *et al*. (2003) (fig.21). Como controle da transdução viral, o adenovírus AdRSVLacZ foi utilizado (o plasmídeo pAdRSVLacZ foi gentilmente cedido pelo Prof. Eduardo Krieger (InCor – FMUSP).

```

auggccguag cccccgcggg cggccagcac ggcgcggcgc uggaggcccu gcucggggcg 61
ggcgcgcgugc ggcugcucga cuccucgcag aucgucauca ucuccaccgc gcccgauugc 121
ggcgccccgc aggugaaacg gaggcuggau cuggaaacug accaucagua ccuugcuggu 181
agcagcggggc cauuccgggg cagaggccgc caccagggga aaggugugaa aucuccaggg 241
gagaagucac gcuaugagac cucacuaaa cugaccacca aacgcuucuu ggagcugcug 301
agccacucag cugauggugu uguugaucug aacugggcag ccgaggugcu gaaggucag 361
aaacgacgca ucuaugacau caccaauguc cuggagggca uccaacucau ugccaagaag 421
uccaagauc auauccagug gcuaggcagc cgcaccaugg uggggaucgg ucagcggcu 481
gaaggccuga ccaggaaccu gcaacaacug caggagagug agcagcagcu ggauccug 541
augcacaucu guaccacuca gcugcaacug cuuucugagg acucagacau ccagcgccug 601
gccuauguga ccugccaaga ucuccgcagc auugcagacc cugcagaaca aauggucaua 661...

```

Figura 20. Sequência parcial do mRNA do gene de rato similar ao *E2f1* de camundongo, utilizada para a identificação de trechos potenciais para alvo para a atuação do siRNA. Região

aug: códon de início da tradução; região em vermelho: seqüência-alvo B utilizada como base para a construção do shRNA (shE2f1-B).

```

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 61
cgttacataa cttacggtaa ATGgcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 121
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 181
atgggtggag tatttacggg aaactgocca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 241
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 301
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 361
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 421
atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagttg ttttggcacc aaaatcaacg 481
ggactttcca aatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt 541
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagcgcta 601
ccggactcag atctcgagct caagcttoga attctgcagt cgacggtacc gcgggcccgg 661
gatccatcgc caccatggtg agcaagggcg aggagctggt caccggggtg gtgcccattcc 721
tggctcgagct ggacggcgac gtaaaccggc acaagttcag cgtgtccggc gaggggcgagg 781
gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg caccaccggc aagctgcccg 841
tgccctggcc caccctcgtg accaccctga cctacggcgt gcagtgttcc agccgctacc 901
ccgaccacat gaagcagcac gactttctca agtccgcat gcccggaaggc tacgtccagg 961
agcgcacat cttcttcaag gacgacggca actacaagac ccgcgccgag gtgaagtctg 1021
agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca 1081
acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca caacgtctat atcatggccg ...

```

Figura 21. Seqüência parcial do eGFP e identificação do alvo para a atuação de siRNAs. Região ATG: códon de início da tradução; região em rosa: seqüência alvo utilizada por Tisconia *et al* (2003) na construção de lentivírus e Mousses *et al*, (2003) na construção de siRNA sintéticos. Esta seqüência foi utilizada para a construção do plasmídeo de expressão de siGFP, pBSsiGFP, utilizado como controle no presente trabalho.

Com base nas seqüências acima, foram deduzidos e sintetizados os oligonucleotídeos da tabela abaixo, para a confecção do cassete de expressão da figura 22 e, posteriormente dos adenovírus, como o descrito a seguir.

Tabela 1: Sequência das construções de siE2f1-B e siGFP.

siE2F1 – B	
senso	5' ACCgAATCATATCCAgTggCTATTCAAgAgATAgCCACTggATATgATTCTTTTC 3'
antisense	5' TCgAgAAAAgAATCATATCCAgTggCTATCTCTTgAATAgCCACTggATATgATT 3'
siGFP	
senso	5' ACCgCAAgCTgACCCTgAAgTTCTTCAAgAgAgAACTTCAgggTCAgCTTgCTTTTTTC 3'
antisense	5' TCgAgAAAAgCAAgCTgACCCTgAAgTTCTCTCTTgAAgAACTTCAgggTCAgCTTg 3'

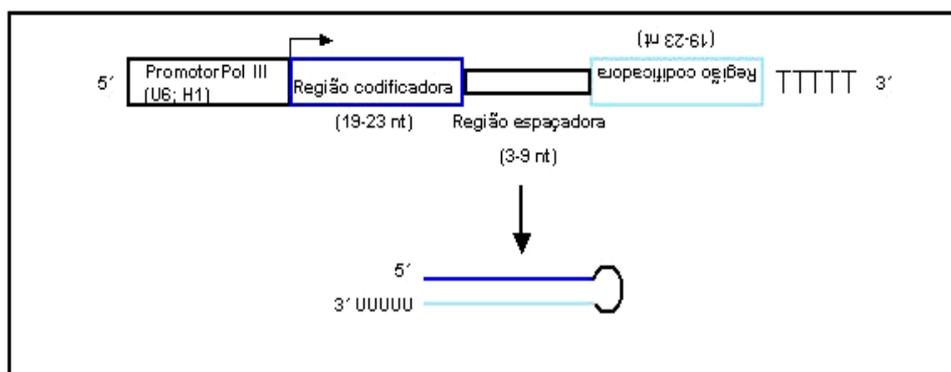


Figura 22. Esquema da região codificadora de shRNAs. São constituídos de duas pequenas seqüências complementares invertidas, apresentando RNA em forma de grampo (*short hairpin* RNA). Com base no esquema da região codificadora, uma seqüência específica para o gene *E2f1* foi clonada dentro do vetor adenoviral (Vasques *et al*, 2009).

Para a obtenção das diferentes partículas virais AdshE2F1-B e AdshGFP foram inicialmente construídos os plasmídeos de transferência, pPLshGFP e pPL-shE2F1-B, onde os cassetes de expressão de U6-shRNAs, onde U6 é a região promotora do gene humano *U6*, um snRNA, que é reconhecida pela RNA Pol III, tornando-se ideal para o controle transcricional de siRNAs. A RNA Pol III inicia a transcrição a partir de um nucleotídeo específico, termina a transcrição quando encontra um grupo de 4 ou 5 timidinas (cauda TTTT indica terminação da transcrição) e é capaz de produzir uma quantidade razoável de RNAs, sendo constitutivamente ativa em células de mamíferos. Desta forma, a utilização do promotor U6 é bastante adequada para a produção de shRNAs.

Após a clonagem, os plasmídeos gerados foram linearizados com a enzima *Pme* I e posteriormente recombinados, através de co-transfecção, com o plasmídeo pAd Δ E1/E3 em bactérias BJ5183 (AdenoVator - Q.BIOgene), produzindo os plasmídeos pAdshGFP, pAdshE2F1 (fig.23).

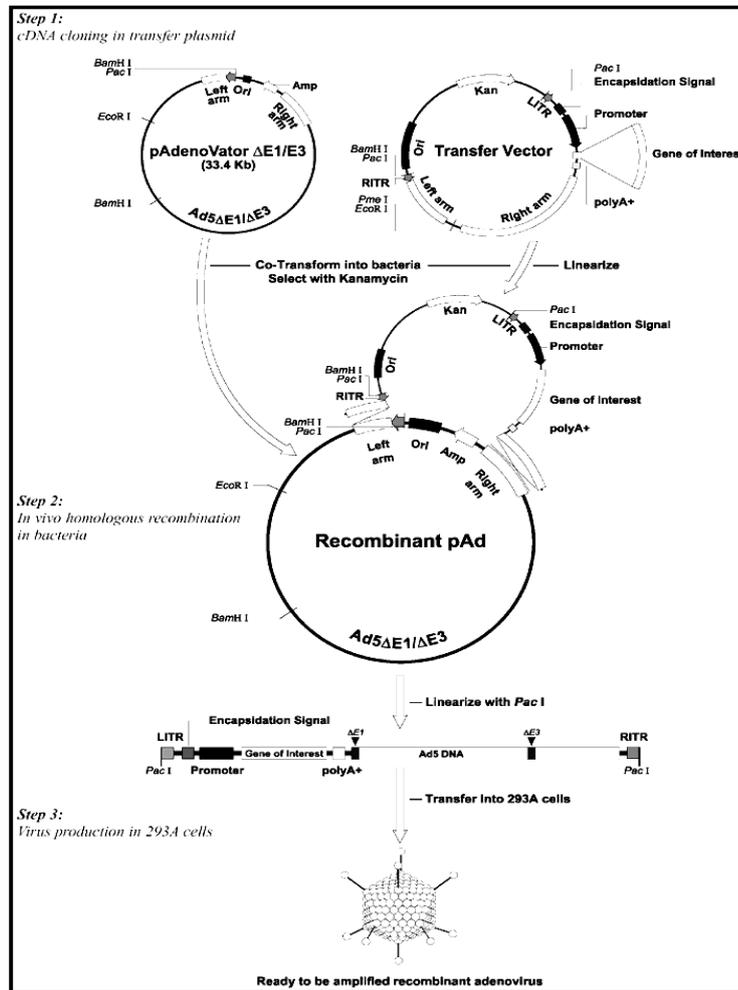


Figura 23. Esquema do processo de construção da partícula viral, onde um plasmídeo é gerado a partir da recombinação do plasmídeo de transferência (no caso, o pPromoterless contendo o cassete de expressão) com o plasmídeo pAd Δ E1/E3. O plasmídeo recombinante é clivado com *Pac* I e transfectado em células HEK293. Estas possuem o complemento dos genes virais, permitindo a replicação e empacotamento do DNA construído no capsídeo viral.

O adenovírus AdRSV/LacZ contém, na região E1 de seu genoma, o cDNA do gene da enzima de expressão nuclear β -galactosidase da *Escherichia coli*, precedido pelo normopromotor RSV (*Rous sarcoma virus*), sendo então utilizado como controle em células B16mCAR.

3.2.1.1 Produção de bactérias competentes

Bactérias DH5 α foram estriadas em placas com meio LB ágar (2,5g de extrato de levedura, 2,5g de NaCl, 5g de triptona e 10g de ágar) e crescidas durante a noite a 37°C. Uma única colônia foi transferida em 10 ml de meio LB (2,5g de extrato de levedura, 2,5g de NaCl e 5g de triptona) e incubada a 37°C por 16 a 18h sob agitação. Após incubação, 1ml da cultura foi inoculado em 100 ml de meio LB, sendo então novamente incubado sob agitação a 37°C por 2h.

A cultura foi monitorada, determinando-se sua DO₆₀₀ (Densidade Óptica - $\lambda=600$ nm) a cada 30 minutos e, após ser atingida a DO₆₀₀= 0,2~0,5, as bactérias foram colocadas em tubos estéreis de 50 ml, mantidas no gelo por 10 minutos e centrifugadas (4000 rpm por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e cada pellet foi ressuspenso em 10 ml de 100 mM CaCl₂ a 4°C. Após 20 minutos, as células foram resgatadas por nova centrifugação (4000 rpm por 10 minutos a 4°C), e ressuspenso em 2 ml de 100 mM CaCl₂. As bactérias foram mantidas a 4°C por 14 a 16h e, após este período, foi adicionado glicerol (concentração final = 15%). Alíquotas de 100 μ l foram congeladas a -70°C.

3.2.1.2 Transformação bacteriana e preparação de plasmídeos em média escala

Alíquotas de 100 μ l de bactérias DH5 α (competentes) e foram inoculadas com 1 μ l dos plasmídeos pAdshGFP (1,85 μ g/ μ l), pAdshE2F1-B (1,425 μ g/ μ l) e pAdRSVLacZ (2,925 μ g/ μ l), e mantidas em gelo por 30 minutos. As células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 1 minuto e 30 segundos. Foi adicionado 1 ml de LB por amostra, sendo mantidas em estufa a 37°C por 45 a 50 minutos. Por fim, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar sólido contendo Kanamicina (50 μ g/ml) e deixadas durante a noite em estufa a 37°C. Após crescimento das colônias, uma foi selecionada para amplificação e as demais foram mantidas em geladeira a 4°C.

Para a amplificação e extração do DNA plasmideal de pAdshGFP, pAdshE2F1-B e pAdRSVLacZ foi utilizado o kit NucleoBond Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel). Inicialmente foi inoculada uma colônia de bactérias em meio

LB contendo kanamicina (100mg/ml), e mantida em agitador por 8 horas a 37°C, 300rpm. A colônia inicial foi então diluída (diluição 1:1000) e adicionada em 100 ml de LB contendo antibiótico, sendo novamente mantida em agitador, por 12 a 16 horas a 37°C, 300rpm. Após este período a solução contendo bactérias foi então diluída (diluição 1:1000) em 100 ml de LB contendo antibiótico, sendo novamente mantida em agitador, por 12 a 16 horas a 37°C, 300rpm. A coleta das células bacterianas foi obtida por meio de centrifugação (6000rpm por 10 minutos a 4°C). O *pellet* obtido foi ressuspensão, lisado, neutralizado e lavado segundo informações do fabricante (Macherey-Nagel). O DNA plasmideal foi então eluído e coletado.

Após obtenção do DNA plasmideal, foram adicionados 3,5 ml de isopropanol para precipitação, seguido de centrifugação (13000 rpm por 30 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado em 2 ml de etanol 70%, sendo novamente centrifugado. O etanol foi removido cuidadosamente e o *pellet* foi deixado por 10 minutos em temperatura ambiente para secagem. O DNA plasmideal foi então dissolvido em 200µl de água mili-Q estéril e coletado. A fim de se determinar a integridade do DNA plasmideal, um gel de agarose 0,8% corado com GelRed (Biotium) foi realizado, onde adicionou-se 1µl de cada amostra.

3.2.1.3 Seqüenciamento

Alíquotas de 1,8 µg dos plasmídeos obtidos no tópico anterior tiveram suas seqüências determinadas utilizando-se 3,2 pmoles do *primer* U6, 3ul de tampão *Save Money* (200ul de tris-HCl 1M pH 9,0; 5ul de MgCl₂ 1M; 795 ul de água mili-Q), 1 µl de solução Big dye (*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* - Perkin-Elmer). A reação foi amplificada em termociclador (96°C por 10 segundos, 52°C por 20 segundos, 60°C por 4 minutos), sendo este ciclo repetido 40 vezes.

Em seguida foi realizada a precipitação do produto de reação de seqüenciamento. Em cada amostra adicionou-se 100µl de isopropanol 75% e as mesmas foram deixadas em repouso por 10 minutos. As amostras foram

então centrifugadas (4000 rpm, 50 minutos, 20°C). O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 150 µl de etanol 70%, sendo então novamente submetidas à centrifugação (4000 rpm, 10 minutos, 20°C) com descarte do sobrenadante. A placa de seqüenciamento foi então selada e mantida em estufa a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados 20 µl de solução formamida Hi Di por amostra, vortexando-as. As amostras foram então desnaturadas (4 minutos a 96°C) e depois rapidamente mantidas em gelo.

Por fim a reação foi seqüenciada no *ABI 3700 DNA Analyser* (Applied Biosystems) e posteriormente analisadas pelo *Sequence Scanner Software v1.0* (Applied Biosystems). O seqüenciamento dos plasmídeos foi realizado em colaboração com o laboratório da Dr^a Lygia V. Pereira Carramaschi (IB – USP).

3.2.1.4 Transfecção por cálcio-fosfato e amplificação dos adenovírus

Após amplificação dos plasmídeos, estes foram linearizados com *Pac I* (enzima de restrição específica para ligação de fragmentos de DNA com o vetor). Para tanto, para 10µg de cada plasmídeo foram adicionados 3µl de *Pac I* 10,000U/ml (BioLabs), 4µl de NE buffer 1 10x (BioLabs) e 0,4µl de Purified BSA 100x (BioLabs), sendo estes então mantidos por 2 horas a 37°C. Para verificação da digestão foi feito um gel de agarose 1% corado 2µl com GelRed (Biotium), contendo 1µl do plasmídeo digerido e 1µl de plasmídeo sem digestão como controle.

Os plasmídeos digeridos foram então precipitados com 4µl de acetato de sódio 3M (20,412 g de acetato de sódio em 50ml de água estéril) diluído em 100µl de etanol 2,5X, e então refrigerados a -20°C durante a noite. Os plasmídeos foram centrifugados (1200rpm por 10 minutos a 4°C), e o *pellet* foi ressuspenso em 10µl de água mili-Q estéril após secagem a temperatura ambiente por 1 hora.

Para a transfecção por método cálcio-fosfato, foram adicionados a cada amostra de plasmídeo 240µl de TE 8 (40ul de Tris-HCl 1mM pH 8,0), 284ul de

2x HBS (280mM NaCl, 10mM KCl, 1,5mM Na₂HPO₄, 12mM Dextrose, 50mM HEPES, e pH 7,05) e 35,2µl de CaCl₂ (5,88g CaCl₂ x 2 H₂O diluídos em água destilada); sendo então incubados por 30 minutos a temperatura ambiente.

Após a transfecção por cálcio-fosfato, as amostras foram adicionadas às células HEK 293 previamente cultivadas em garrafa com 25 cm² de área e acrescidas de 3,6ml de meio MEM 10% soro. As células foram então incubadas durante a noite em estufa a 37°C e posteriormente expandidas em garrafas com 75 cm² contendo 5,5ml de meio MEM 5% soro. Cerca de 10 a 15 dias após a transfecção, quase todas as células haviam sofrido efeito citopático (fig.), foram coletadas com o meio e denominadas de P1 nascente (primeira passagem de amplificação dos adenovírus). A P1 foi então submetida a três sucessivos choques térmicos para lise celular efetiva, onde primeiramente foi congelada através de imersão parcial em nitrogênio líquido, seguido de descongelamento a 37°C. Após os choques térmicos, a solução foi centrifugada (1200 rpm por 5 minutos a 4°C) e coletado o sobrenadante em novos tubos.

Para a amplificação dos adenovírus pAdRSVLacZ, pAdshE2F1-B e pAdGFP, células HEK 293 com cerca de 80% de confluência foram previamente plaqueadas em placas de 10 cm de diâmetro com 8 ml de meio MEM 10% soro e no dia seguinte transduzidas com 1 a 1,5 ml de adenovírus P2 com 6 a 7 ml de meio MEM 5% soro.

Após surgimento de efeito citopático (fig.24), as células foram coletadas e submetidas a choque térmico, como descrito anteriormente. O mesmo procedimento foi realizado até a obtenção da P4 de cada adenovírus (passagem 4 de amplificação), gerando aumento na concentração de partículas adenovirais. Células não transfectadas foram utilizadas como controle.

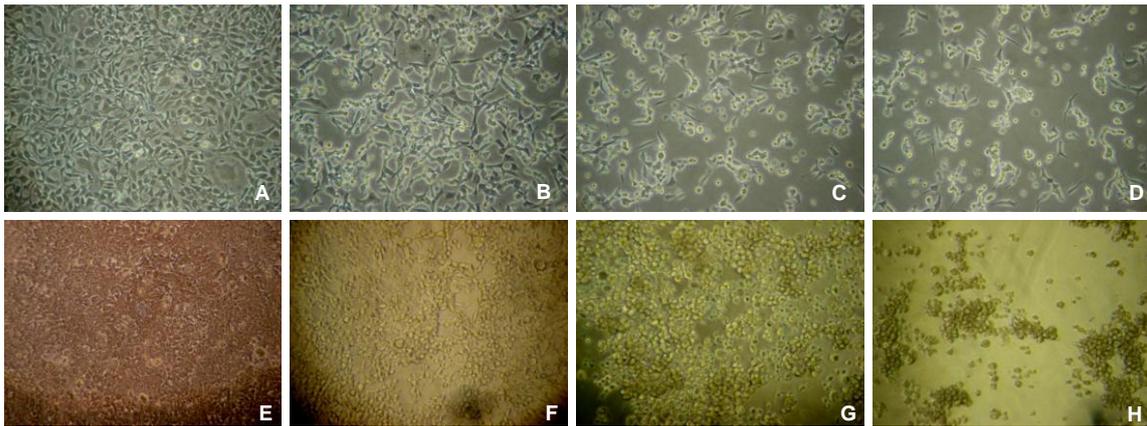


Figura 24. Representação de efeito citopático obtidos pela transdução com adenovírus. A a D e E a H - progressão de efeito citopático em células HEK 293 contendo duas expansões distintas de AdshGFP P4, obtidas ao longo de 3 dias.

3.2.1.5 Quantificação das partículas adenovirais e cálculo da titulação

Para a quantificação e posterior cálculo da titulação das partículas adenovirais foram plaqueadas 10^4 células HEK 293 por poço em placa de 96 poços contendo 100 μ l de meio DMEM 2% soro. Os experimentos de titulação foram realizados em duplicada, onde cada coluna representava uma diluição diferente das partículas adenovirais (fig.25).

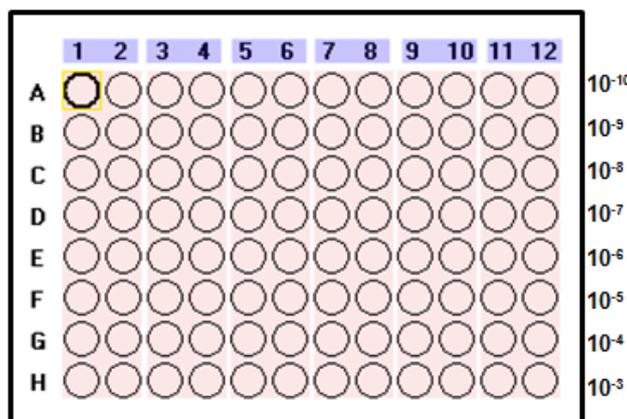


Figura 25. Diagrama de placa de 96 poços contendo diluições seriadas (coluna da direita) de partículas adenovirais para titulação pelo método TCID50.

Diluições seriadas foram realizadas, em meio DMEM com 2% de soro fetal bovino, e adicionadas à placas previamente lavadas com PBS 1X. Os poços 11 e 12 não receberam partículas virais, sendo utilizados como controle da viabilidade celular ao longo do experimento. As placas foram, então, incubadas por 1 hora em estufa a 37°C e depois acrescentou-se 75µl de DMEM com 2% de soro fetal bovino por poço. Observou-se a progressão de efeito citopático de cada diluição por 15 dias e, após verificação de abstenção de efeito citopático (ao menos duas das colunas com diluições seriadas sem efeito citopático) fez-se o cálculo da titulação de cada adenovírus segundo a seguinte fórmula (TCID50):

$$\text{Titulação: } T = 10^{1 + d(S-0,5)}$$

Onde d= log.10 da diluição e S= soma das razões (de cada concentração, representado pelas colunas A a H).

3.3 Transdução *in vitro*

Em um primeiro momento foi averiguada a eficiência da transdução dos adenovírus produzidos através de transduções *in vitro* das células B16mCAR com o vetor AdRSVLacZ. Para tanto, foram utilizadas placas de 12 poços, contendo $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 , 10^5 ou 5×10^5 de células B16mCAR (dependendo do tipo experimental – vide próximos tópicos) em meio RPMI com 2% de soro fetal bovino. No dia seguinte após o plaqueamento, o meio foi substituído por RPMI com 10% de soro fetal bovino.

Para a adição das soluções virais nos experimentos (vide demais itens), foi utilizada a titulação do AdshGFP em passagem P4 como base para concentração da quantidade de partículas virais por ml. Assim sendo, as demais soluções virais AdshE2F1B (i) e AdshE2F1B (ii) foram diluídas para que suas concentrações finais fossem $7,94 \times 10^9$ partículas por ml, como o AdshGFP sem diluição. No entanto, a titulação do AdRSVLacZ era menor do

que a dos demais adenovírus ($7,94 \times 10^8$ partículas/ml), e portanto este foi utilizado sem diluição para o controle da transdução.

3.3.1 Utilização de AdRSVLacZ como controle da transdução

Duas diferentes quantidades iniciais de células B16mCAR (5×10^4 ou 10^5 células por poço, em placas de 12 poços) foram utilizadas para a otimização da transdução com o adenovírus AdRSVLacZ. Após 24h do plaqueamento, as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida adicionou-se 400µl de solução contendo partículas virais, esta sem sofrer qualquer diluição, a partir do adenovírus AdRSVLacZ P4 ($7,94 \times 10^8$ partículas/ml). Após 1h foram adicionados 500µl de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino por poço. Após 48 horas da transdução, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com 3,7% de formaldeído por 5 minutos a 5°C, lavadas novamente com PBS 1X e coradas com a Solução X-Gal (100 mM NaHPO₄, pH 7,3; 1,2 mM MgCl₂; 3,0 mM K₃Fe(CN)⁶; 3,0 mM K₄Fe(CN)⁶; 1,0 mg/ml X-Gal). Cada tratamento foi realizado em duplicata e células não-transduzidas foram utilizadas como controle. As análises de eficiência de transdução foram realizadas em microscópio invertido 24 a 48 horas após a coloração com a solução X-Gal.

Tabela 2: Reagentes para confecção da Solução X-Gal

Solução X-Gal			
	[inicial]	VF= 2ml	VF= 10ml
100mM fosfato de Na	1M	200ul	1ml
1,2mM MgCl ₂	1,5M	1,6ul	8ul
3mM K ₃ Fe(CN) ⁶	50mM	120ul	600ul
3mM K ₄ Fe(CN) ⁶	50mM	120ul	600ul
1mg/ml X-Gal	50mg/ml	8ul	40ul
H ₂ O miliq		1,550ml	7,752ml

Na simples transdução, após 48h do tratamento, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com 3,7% de formaldeído por 5 minutos a 5°C, lavadas novamente com PBS 1x e coradas com a Solução X-Gal. Na dupla transdução, 48h após a primeira transdução, novo tratamento com solução viral

foi realizado como o descrito acima, e 96 horas após a primeira transdução as células foram fixadas e coradas.

3.3.2 Validação do AdshE2F1

Para verificar a eficiência da construção AdshE2F1-B em células de camundongo, duas quantidades diferentes de células B16mCAR (5×10^4 ou 10^5 células por poço, em placas de 12 poços) foram utilizadas na transdução com o adenovírus AdshE2F1-B (fig.26). Após 24h do plaqueamento, as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida foram adicionados em cada poço 400 μ l de solução contendo $7,94 \times 10^9$ partículas virais por ml, a partir de solução de duas diferentes partidas de vírus AdshE2F1-B P4 (AdshE2F1(i) e AdshE2F1(ii)). Como controle da transdução foram utilizados os vírus AdRSVLacZ P4 e AdshGFP P4. Após 1h foram adicionados 500ul de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino por poço.

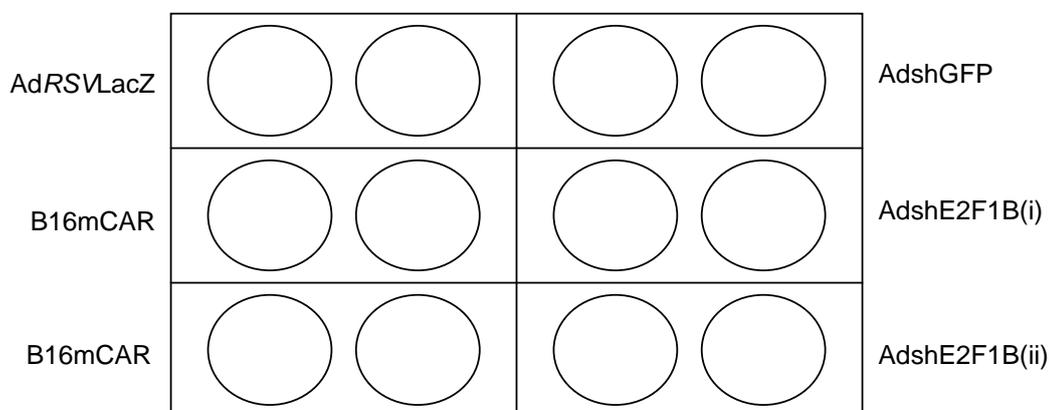


Figura 26. Modelo de transdução *in vitro* em placa de 12 poços contendo diferentes adenovírus na mesma concentração (partículas/ml). Os poços de AdRSVLacZ e os dois subseqüentes de células B16mCAR foram utilizados como controle da transdução com coloração X-Gal. Os demais poços foram coletados para extração de RNA ou proteínas, sendo cada amostra realizada em duplicata.

3.3.3 Transdução de partículas virais em células B16mCAR (simples e dupla transdução)

Foram plaqueadas 5×10^4 ou 10^5 de células B16mCAR por poço, em placas de 12 poços. Após 24h do plaqueamento, as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida foram adicionados em cada poço 400 μ l de solução contendo $7,94 \times 10^9$ partículas virais por ml, a partir de solução de 3 diferentes vírus AdshE2F1 P4, AdRSVLacZ P4 e AdshGFP P4, os dois últimos foram utilizados como controle.

Para simples transdução, após 48 horas as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida foram coletadas duplicatas de cada amostra em TRIzol (para posterior extração de RNA) e em solução RIPA (para extração de proteínas). As amostras coletadas em TRIzol foram utilizadas para análise da expressão de *E2f1*, *E2f2*, *E2f3* e *Ciclina E* por PCR em tempo real. As amostras coletadas em RIPA foram utilizadas para análise da expressão de *E2f1* por Western Blot.

Para dupla transdução, após 48 horas as células lavadas com PBS 1x e em seguida foram adicionados novamente em cada poço 400 μ l de solução contendo $7,94 \times 10^9$ partículas de cada construção viral por ml. Após 1h da transdução foram adicionados 500 μ l de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino por poço. Após 96 horas do início do experimento as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida foram coletadas duplicatas de cada amostra, como o descrito acima.

3.3.3.1 Curva de expressão dos genes *E2f1*, *E2f2*, *E2f3* e *Ciclina E*

Para a curva de proliferação celular e ensaio fenotípico, $2,5 \times 10^4$ de células B16mCAR foram plaqueadas em placas de 12 poços com meio RPMI contendo 2% soro fetal bovino (para sincronização das células). Após 24h do plaqueamento, as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida foram adicionados em cada poço 400 μ l de solução contendo $7,94 \times 10^9$ partículas virais por ml, a partir de solução de dois diferentes vírus AdshE2F1 P4 -

AdshE2F1B (i) e (ii). Como controle da transdução foi utilizado o adenovírus AdRSVLacZ P4, e para controle do RNAi foi utilizado o AdshGFP P4. Após 1h foram adicionados 500µl de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino por poço. A simples e a dupla transdução foram realizadas de acordo com o tópico anterior.

A coleta das células foi realizada de 48 em 48 horas (dia 2 a 8 de coleta, após simples ou dupla transdução), onde as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida foram coletadas duplicatas de cada amostra em TRIzol e em solução RIPA. As amostras coletadas em TRIzol foram utilizadas para análise da expressão de *E2f1*, *E2f2*, *E2f3* e *Ciclina E* por PCR em tempo real. As amostras coletadas em RIPA foram utilizadas para análise da expressão de *E2f1* por Western Blot.

3.3.3.2 Ensaio de proliferação *in vitro*

Para o ensaio da proliferação celular, uma curva foi traçada a partir da contagem das células em câmara de Neubauer ao longo dos dias da coleta (dias 2 a 8). Para a contagem, cada poço contendo células B16mCAR transduzidas foi lavada com PBS 1X, adicionou-se 100µl de tripsina e, após desprendimento das células, as mesmas foram ressuspensas em 1ml de meio RPMI. 10µl desta solução foi utilizada para contagem das células. Os dados da contagem foram então plotados em gráficos contendo a progressão da curva de proliferação ao longo dos oito dias de coleta.

3.3.3.2 Citometria de fluxo

Para o ensaio do ciclo celular, uma curva de proliferação foi traçada e coleta de 2 em 2 dias até completar-se um período de 8 dias após a dupla transdução com AdshE2F1-B. Para a coleta, cada poço contendo células B16mCAR transduzidas foi lavada com PBS 1X, adicionou-se 100µl de tripsina e, após desprendimento das células, as mesmas foram ressuspensas no próprio meio de cultura, coletado anteriormente. As amostras foram centrifugadas (2000 rpm, 25°C, por 10'), lavadas novamente com PBS 1X e

centrifugadas novamente. O *pellet* obtido em cada amostra foi então diluído em álcool 70% e conservado a -4°C.

No dia anterior à corrida, as amostras foram centrifugadas (1300rpm, 4°C, 10'), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500µl PBSA 0,5%. Nova centrifugação foi realizada, seguida de descarte do sobrenadante, adicionando-se por fim 200µl de solução de PI por amostra (solução de PI para Vf=10ml: 20µg/ml de iodeto de propídeo; 0,1% de Triton X-100; 200µg/ml de RNase; 0,5% de PBSA). As amostras contendo solução de PI ficaram no escuro sob o gelo por 30 minutos, e, após este período, foram centrifugadas (1300rpm, 4°C, 10') e lavadas com 500µl de PBS filtrado. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram diluídas em 200µl de PBS filtrado.

Por fim, as amostras foram transferidas para placa de 96 poços analisadas em citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Plus System* (Guava Technologies, Inc), segundo instruções do fabricante. Para posterior análise do ciclo celular utilizou-se o software *ModFit LT for Win 32*.

3.3 Extração de RNA

3.4.1 Extração por TRIzol

Para a extração de RNA, cada amostra foi previamente lavada com PBS 1X, e em seguida foram acrescentados 300µl de TRIzol (Invitrogen) por poço. O conteúdo foi coletado e congelado a -70°C.

Após a extração por TRIzol, à cada amostra foi acrescentado 60µl de clorofórmio, sendo então vortexadas e centrifugadas (13000 rpm por 5 minutos a 4°C). Após centrifugação, a primeira fase de cada tubo foi transferida para novo tubo contendo 300µl de isopropanol, sendo mixadas e centrifugadas novamente. O isopropanol foi então desprezado por inversão e acrescentou-se 300µl de etanol 75% para lavagem do *pellet*, sendo submetido à nova centrifugação (13000 rpm por 10 minutos a 4°C). O etanol foi desprezado por

inversão e o RNA foi deixado em gelo por 5 a 10 minutos para secagem do *pellet*. Após secagem, o *pellet* foi ressuspensado em água DEPC (8 a 20 μ l, dependendo do tamanho do *pellet*).

O RNA obtido foi então mensurado por espectrofotometria (NanoDrop – programa ND-1000V3). Os valores foram utilizados para calcular a quantidade ideal de RNA para a síntese da fita do DNA complementar (cDNA), sendo este valor o de 2 μ g por amostra. Para verificação da integridade do RNA extraído, 1 μ g de cada amostra com 1 μ l de tampão de amostra foram adicionados e corridos em gel de agarose 1% corado com 2 μ l de GelRed (Biotium). O GelRed é um substituto do brometo de etídio, sendo seu manuseio mais seguro para coloração de ácidos nucleicos em géis de agarose e poliacrilamida; no caso da coloração utilizando-se amostras de RNA, o corante se adere ao mesmo por meio de interações eletrostáticas, garantindo sua eficiência.

3.4.6 Tratamento com DNase I

Para o tratamento com DNase I foi utilizado um kit contendo RQ1 DNase 10x Reaction Buffer e RQ1 RNase-Free DNase (Promega). A cada amostra de 2 μ g de RNA, foi adicionado um mix contendo 2,5 μ l de Tampão e 2,5 μ l de DNase, sendo então mantido em banho seco a 37°C por 30 minutos. Ao final, foram acrescentados 50 μ l de água DEPC.

Após tratamento com DNase I, cada amostra foi submetida à purificação. Foram adicionados 75 μ l de fenolclorofórmio (Invitrogen) por amostra, seguido de centrifugação (13000 rpm por 10 minutos a 4°C). A primeira fase do tubo foi retirada e adicionada em novo tubo contendo 75 μ l de clorofórmio, sendo submetidos à nova centrifugação. Novamente a primeira fase do tubo foi retirada e adicionada em novo tubo contendo 187,5 μ l de isopropanol, sendo então centrifugada. O isopropanol foi então retirado por inversão e os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 8 μ l de água DEPC.

3.4.7 Síntese da fita do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese dos cDNAs, foram utilizados os 8µl de RNA purificado obtidos a partir de 2µg de RNA total de cada amostra. A síntese foi realizada através do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Para tanto, 4µl de RNA foram utilizados para mix contendo a enzima transcriptase reversa, e 4µl de RNA para mix sem a enzima (controle do tratamento com DNase I), conforme tabela abaixo:

Tabela 3: Quantidade de reagentes do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, água DEPC e RNA para síntese de cDNA

	RT+	RT-
buffer	1ul	1ul
dNTPs	0,4ul	0,4ul
random primer	1ul	1ul
RT (enzima)	0,5ul	0
H ₂ O DEPC	3,1ul	3,6ul
RNA	4ul	4ul
	Vf=10ul	Vf=10ul

Os mixes com RNAs de cada amostra foram colocados em termociclador (25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 segundos). Os cDNAs obtidos foram utilizados para posterior detecção da expressão dos genes *E2f1*, *E2f2*, *E2f3*, *Ciclina E* e *βactina* (controle interno – gene normalizador) por PCR em tempo real.

3.4.5 RT-PCR

Para a PCR dos cDNAs sintetizados, foram utilizados os 1µl de cDNA de cada amostra. A PCR foi realizada utilizando-se Thermo Pol Buffer 10x (Biolabs), enzima Taq DNA polymerase 5,000 U/ml (Biolabs), dNTPs 10mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), e par de primers de *βactina* (12,5 picomoles/µl), conforme tabela 4:

Tabela 4: Quantidade de reagentes para preparação da PCR

	p/1reação
Thermo buffer	2,5ul
dNTPs	0,5ul
P1+P2 (Bact)	1+1ul
Taq polimerase	0,2ul
H ₂ O miliq	18,8ul
cDNA (RT+/ RT -)	1ul
	Vf=25ul

Os mixes com os cDNAs de cada amostra foram colocados em termociclador por 35 ciclos (cada ciclo: 94°C por 5 minutos; 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos). Após amplificação, 10µl das amostras contendo 2µl de tampão de amostra, foram submetidos à corrida em gel de agarose 2% corado com 2µl de GelRed (Biotium), para verificação do produto da PCR.

3.4.6 PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Para as reações de qRT-PCR foi utilizado o equipamento *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* e seu respectivo *SDS software* (Applied Biosystems). Para cada amostra da reação de qRT-PCR utilizou-se um volume final 15µl, sendo este constituído por 1µl de cDNA diluído e 14µl de *mix*. A concentração dos cDNAs foi previamente obtida através de curvas de diluição, sendo estas estabelecidas a partir da concentração inicial (100ng/µl); e o conteúdo do *mix* por reação baseou-se em: 7,5µl de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,5µl de cada um dos pares de primers de interesse e 6µl de água MiliQ. A concentração final dos pares de cada *primer* foi estabelecida em 12,5 picomoles por µl.

Tabela 5: Quantidade de reagentes e cDNA para preparação da qRT-PCR

PCR em Tempo Real	
	para 1 reação
2x SYBR Green	7,5µl
primerF + primerR	0,25+0,25µl
H ₂ O MiliQ	6µl
cDNA diluído	1µl
	Vf=15µl

Para diluição de cDNA	
Par de primers	Concentração final
E2f1, E2f2 e E2f3	25ng/µl
Ciclina E	25ng/µl
βactina	12,5ng/µl

O *Power SYBR Green PCR Master Mix* é constituído por *AmpliTaq DNA Polymerase*, *SYBR Green Buffer*, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), o corante fluorescente ROX e *SYBR Green I* (sendo esta uma molécula intercalante que possui afinidade por duplas fitas de DNA). A referência passiva (corante fluorescente ROX) possui uma importante função, pois responsável pela correção de possíveis erros durante a coleta de fluorescência das amostras.

A adição dos cDNAs diluídos e *mixes* foi feita sobre o gelo em placa de 96 *poços* específica para qRT-PCR (Applied Biosystems), sendo então submetida a leve centrifugação (800 rpm por 1 minuto a 4°C). As reações da placa foram colocadas no ABI Prism 7500 *Sequence Detection System*, iniciando assim a reação em cadeia da polimerase em tempo real, onde as amostras foram submetidas à temperatura 95°C por 10 minutos (para a ativação da DNA polimerase), seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (para desnaturação) e 1 minuto a 58°C (para anelamento dos *primers* e extensão). Deste modo, ao final de cada ciclo foi coletado o sinal de fluorescência das amostras.

Para cada gene de interesse e para o normalizador foram adicionados um controle negativo da reação, para se identificar e descartar possíveis contaminações das amostras, sendo que o mesmo era constituído em amostra sem o respectivo cDNA (denominada NTC – *No Template Control*). Todas as reações de amplificação das amostras foram processadas na mesma placa, em

duplicata ou triplicata para cada gene, incluindo para o controle negativo(fig.27).

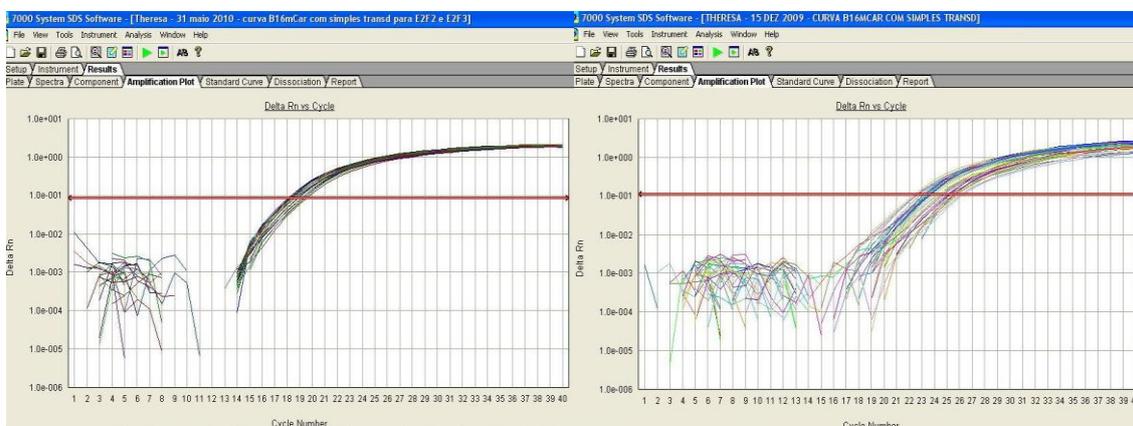


Figura 27. Representação de curvas de amplificação obtidas em SDS software – *Amplification plot*. A curva esquerda corresponde à amplificação do gene normalizador β actina, e a curva à direita corresponde à amplificação do gene *E2f1*. As amostras não amplificadas correspondem ao controle negativo de cada gene. O gráfico de amplificação mostra a relação entre o sinal de fluorescência (eixo y) e o número de ciclos (eixo x). Cada C_t (*threshold cycle*) é definido a partir do valor do número de ciclos necessários para que a fluorescência ultrapasse o *Threshold* (linha traçada em verde, que detecta a amplificação dos produtos gerados pela qRT-PCR).

Ao término de cada reação de *qRT-PCR* foi avaliado o perfil da curva de dissociação das amostras, com o intuito de se determinar a especificidade dos produtos de PCR formados (sendo esta determinada pela especificidade dos *primers*). O ciclo de dissociação consistiu em aquecimento a 95°C por 15 segundos (desnaturação), decréscimo progressivo da temperatura de 95°C para 60°C e manutenção dessa temperatura por 20 segundos (anelamento dos *primers*), reaquecimento progressivo de 60°C para 95°C por 20 minutos (dissociação) e manutenção da temperatura de 95°C por 15 segundos.

As temperaturas de dissociação (T_m - Temperatura de *melting*) de cada amostra da curva de dissociação foram então analisadas, verificando-se o pico de desnaturação da dupla fita de DNA (fig.28). Com isso foi possível verificar se haviam reações que apresentam picos de produtos específicos dos produtos inespecíficos, sendo estes últimos compostos por picos menores ao esperado (em geral resultante da formação de dímeros de *primers*) ou por mais de um pico por amostra (produtos propriamente ditos como inespecíficos). Em

nossas amostras não foram observado picos de inespecificidade (fig. 28), uma vez que os *primers* utilizados eram bem específicos e não resultaram em formação de dímeros.

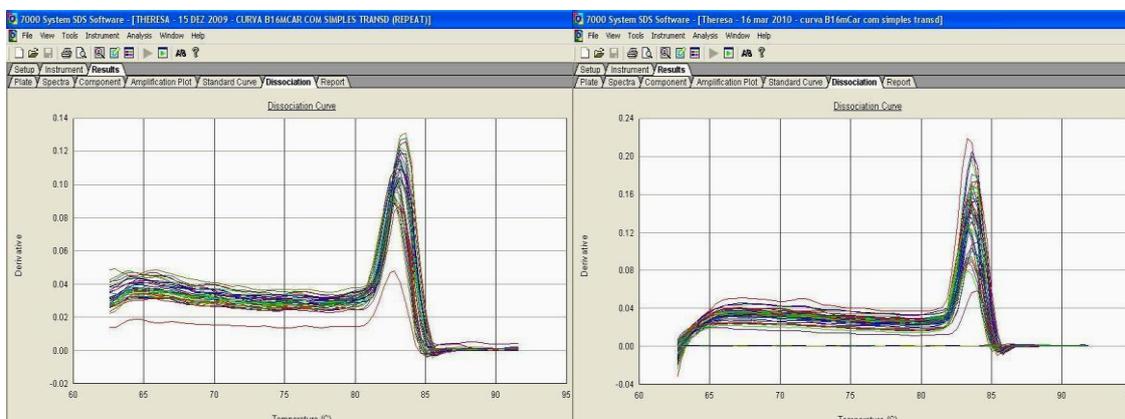


Figura 28. Representação de curvas de dissociação obtidas após qRT-PCR em SDS software – *Dissociation curve*. A curva esquerda corresponde à dissociação do gene normalizador *βactina*, e a curva à direita corresponde à dissociação do gene *E2f1*. Com base na curva de dissociação é possível então verificar se há ou não presença de produtos inespecíficos.

As amostras obtidas por qRT-PCR foram então analisadas em SDS software, e os gráficos resultantes foram plotados de acordo com análise das médias, cálculo de delta Cts (médias comparadas aos controles, previamente determinados em 100%), correlação com a eficiência dos *primers* e posterior cálculo do exponencial relativo com suas respectivas porcentagens e desvios padrões. As análises de todos os qRT-PCR foram realizadas de acordo com a análise matemática descrita por Pfaffl (2001) : Variação: $2^{-\Delta\Delta Ct}$; onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct$ normalizador, e $\Delta Ct =$ média do Ct do gene específico (*E2f1*, *E2f2*, *E2f3* ou *Ciclina E*) – média Ct do controle interno (*βactina*).

3.4.6.2 Construção e validação de oligonucleotídeos

A partir da seqüência cDNA dos genes *E2f1*, *E2f2*, *E2f3*, *Ciclina E* e *βactina* disponíveis no site *GeneBank* (Genetic Sequence Database), foram desenhados dois pares de *primers* utilizando-se o programa Primer 3. Os parâmetros utilizados foram: temperatura de hibridação ao redor de 58° a 60°C;

tamanho do produto entre 10 a 200 pb; porcentagem de GC de 20 a 50%; tamanho do *primer* de 18 a 20 nucleotídeos.

Após a identificação dos *primers*, estes foram avaliados quanto à especificidade utilizando-se a *BLAST-like Alignment Tool* (BLAT), a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e o GeneRunner (onde foi verificado a possibilidade de existência de *hairpins* dentro da seqüência escolhida pelo BLAST). Ao final das verificações, realizou-se a escolha dos melhores pares de *primers* identificados por meio das ferramentas de Bioinformática aqui descritas, sendo estes então sintetizados pela Invitrogen ou IDT (tabela 6).

Tabela 6: Lista de oligonucleotídeos utilizados e suas respectivas seqüências

<i>Primer</i>	Seqüência	Fornecedor
mE2f1 F	5' TGA CCA CCA AAC GCT TCT T 3'	IDT
mE2f1 R	5' TCT TGG CAA TGA GCT GGA T 3'	IDT
mE2f2 F	5' AGT TCC TGT CCC CAA TCC T 3'	Invitrogen
mE2f2 R	5' GAG CCT GTC AAT CTG TCT G 3'	Invitrogen
mE2f3 F	5' GCC CAT TGA GGT TTA CTT GTG 3'	Invitrogen
mE2f3 R	5' CCA GAG GAG AGA GGT TTG CT 3'	Invitrogen
Ciclina E F	5' CTC GCT GCT TCT GCT TTG T 3'	Invitrogen
Ciclina E R	5' TGT GGG TCT GGA TGT TGT G 3'	Invitrogen
m Bact F	5' TGG CAC CAC ACC TTC TAC AA 3'	IDT
m Bact R	5' GGT CAT CTT TTC ACG GTT GG 3'	IDT

Para a análise da eficiência dos *primers*, foram realizadas curvas de amplificação, onde um cDNA obtido previamente foi diluído em série (5 diluições de 100ng/μl a 0,001ng/μl) e em seguida adicionado à mix de qRT-PCR (conforme já descrito). Após a reação em cadeia de polimerase em tempo real, os resultados obtidos por meio da análise do SDS software foram plotados em uma tabela, onde foram calculadas em um primeiro momento as médias e desvios padrões de acordo com os Cts de cada diluição. Em um segundo momento foi realizado o cálculo da eficiência. Para tanto, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência: } E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Após o cálculo, foi analisado o valor de R^2 (que é a correlação entre os pontos de diluição e a média dos Cts) e o slope (inclinação da reta que mostra a eficiência). Quanto mais próximo de 1 for o R^2 , melhor será a inclinação da reta (slope), e portanto, melhor será a eficiência do *primer* (fig.29).

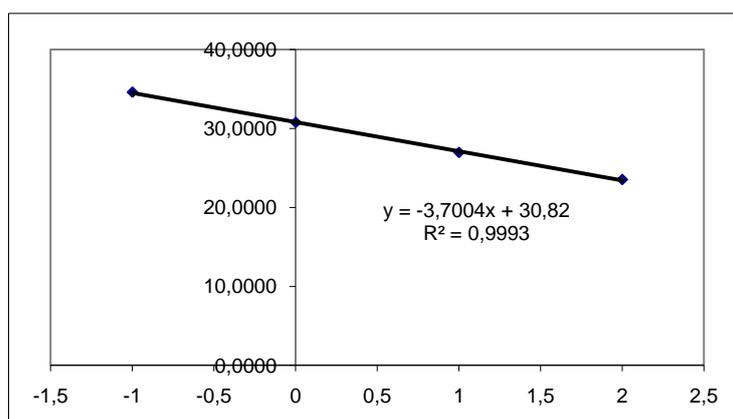


Figura 29. Exemplo de gráfico para cálculo da eficiência do par de *primers* para o gene *E2f1*. O slope é a inclinação da reta (valor dado em y), o valor ao lado de y representa o ponto onde o eixo encontra a reta, e o valor de R^2 representa a correlação entre os pontos de diluição e a média dos Cts. Neste exemplo, a eficiência encontrada foi de 1,86.

3.5 Extração de Proteínas

Para extração de proteínas, todas as amostras foram previamente lavadas com PBS 1X e submetidas à raspagem com *scraper*. Foi adicionado por fim o tampão de lise e proteases.

3.5.1 Extração de proteínas citoplasmáticas

Os extratos protéicos foram obtidos através de lise com tampão NP-40 (20 mM Tris-base, pH 8,0; 137 mM NaCl; 1 % NP-40; 10% Glicerol) e adição de inibidores de proteases (1mM PMSF; 10 μ /mL Leupeptina; 10 μ /mL Aprotinina; 200 μ M VO_4^{3+}), ficando sob o gelo por 30 minutos. Após a lise cada amostra foi submetida à centrifugação (12000 rpm por 15 minutos a 4°C) e posterior recuperação do sobrenadante.

3.5.2 Dosagem de proteínas

Para a dosagem dos extratos protéicos uma curva de diluição (0.0000, 0.0050, 0.0100, 0.0150 e 0.0200 mg por ml) foi inicialmente traçada. Para a preparação das diluições foram utilizados cubetas contendo 1mg/ml de BSA, Reagente de Bradford (BioRad) e 150mM NaCl (tabela 7) e, após preparo, as amostras da curva foram deixadas em ambiente escuro por 5 minutos. As amostras da curva foram realocadas em cubetas e quantificadas em espectrofotômetro.

Tabela 7: Reagentes e quantidades para preparo da curva de diluição

BSA (1mg/mL)	Bradford	NaCl 150mM
0 μ L	200 μ L	800 μ L
5 μ L	200 μ L	795 μ L
10 μ L	200 μ L	790 μ L
15 μ L	200 μ L	785 μ L
20 μ L	200 μ L	780 μ L

Após obtenção da curva, 2 μ l dos extratos protéicos foram adicionados em tubos contendo 200 μ L de Reagente de Bradford e 798 μ L de NaCl 150mM. Como controle, foi preparada uma amostra com 2 μ l de RIPA ao invés do extrato protéico. As amostras foram deixadas no escuro por 5 minutos, realocadas em cubetas e quantificadas em espectrofotômetro.

3.5.3 Western Blot

Alíquotas de 30 μ g de proteína de cada amostra foram fervidas em Tampão de Amostra (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% beta-mercaptoetanol; 0,05% Azul de Bromofenol) por 5 minutos, aplicadas em um gel SDS-Page 8% (375 mM Tris pH 8,8; 8% acrilamida; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,2% TEMED) e Stacking Gel 5% (125 mM Tris pH 6.8; 5% acrilamida; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,2% TEMED).

O gel correu a 30mA por aproximadamente 2 horas em Tampão de Corrida (249,5 mM Tris-base; 2,5 M glicina; 1% SDS) e transferidas para uma

membrana de PVDF através de eletrotransferência semi-seca com tampão de transferência pH8,3 (48 mM Tris-base; 39 mM Glicina; 0,037 % SDS; 20% Methanol) por 1 hora e 30 minutos e com valor de amperagem uma vez e meia o valor da área da membrana. A membrana foi então lavada com solução de TBS-T (10mM Tris-base; 150mM NaCl; 0,1% Tween 20) e bloqueada com solução 5% de leite desnatado em TBS-T por 2 horas a temperatura ambiente.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TBS-T, e incubada durante a noite à 4°C com anticorpo primário monoclonal IgG_{2a} anti-E2F1 ou anticorpo primário monoclonal IgG₁ anti-beta actina (Santa Cruz Biotechnology) na concentração de 1:800 e 1:5000, respectivamente, em TBS-T com 5% de leite desnatado. As membranas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com TBS-T e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-mouse IgG *horseradish peroxidase conjugate* (SantaCruz Biotechnology) na concentração de 1:3000 em TBS-T com 5% de leite desnatado. Após incubação com anticorpo secundário, a membrana foi lavada mais 5 vezes por 5 minutos com TBS-T.

3.5.3.1 Anticorpos utilizados

Os anticorpos utilizados para Western Blot, suas respectivas diluições e especificações encontram-se listados na tabela 8.

Tabela 8: Lista de anticorpos e diluições utilizadas para Western Blot

Anticorpo primário	Diluição	Fornecedor	Especificação
Anti-E1f1	1:800	Santa Cruz	mouse monoclonal IgG
Anti-E2f2	1:400	Santa Cruz	rabbit polyclonal IgG
Anti-E2f3	1:400	Santa Cruz	rabbit polyclonal IgG
Anti-Cyclin E	1:100	Santa Cruz	mouse monoclonal IgG
Anti-Bact	1:5000	Santa Cruz	mouse monoclonal IgG
Anticorpo secundário	Diluição	Fornecedor	
Anti-mouse	1:3000	Invitrogen	
Anti-rabbit	1:2000	Invitrogen	