

MARIA THERESA DE OLIVEIRA

**O USO DE INTERFERÊNCIA POR RNA PARA A ANÁLISE DA FUNÇÃO DO
GENE E2F1 NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS
TUMORAIS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

São Paulo

2010

MARIA THERESA DE OLIVEIRA

**O USO DE INTERFERÊNCIA POR RNA PARA A ANÁLISE DA FUNÇÃO DO
GENE E2F1 NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS
TUMORAIS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências
pelo programa de Clínica Médica

Orientador: Dr. Hugo Pequeno Monteiro

Co-orientadora: Dr^a Luciana dos Reis Vasques

São Paulo

2010

OLIVEIRA, MARIA THERESA

O USO DE INTERFERÊNCIA POR RNA PARA A ANÁLISE DA FUNÇÃO DO GENE E2F1 NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS TUMORAIS. Maria Theresa de Oliveira – São Paulo, 2010. 137 págs.

Tese de Mestrado – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Clínica Médica.

Título em Inglês: Use of RNA interference for the analysis of E2F1 gene function in cell cycle progression in tumor cells.

1. E2F1.
2. RNA de interferência.
3. Melanoma.
4. Adenovírus.
5. Proliferação celular.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Clínica Médica:

Dr^a Leny Toma

São Paulo

2010

MARIA THERESA DE OLIVEIRA

**O USO DE INTERFERÊNCIA POR RNA PARA A ANÁLISE DA FUNÇÃO DO
GENE E2F1 NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS
TUMORAIS**

Presidente da Banca Examinadora: Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro

Banca Examinadora

Profª Drª Leny Toma

Prof Dr Bryan Eric Strauss

Prof. Dr. Fábio Duprat Nascimento

Profª Drª Maria Aparecida S. Pinhal

“A mente do homem é o instrumento básico da sua sobrevivência. A vida lhe é concedida, mas a sobrevivência, não. Seu corpo lhe é concedido, mas não o seu sustento. Sua mente lhe é concedida, mas o seu conteúdo, não. Para manter-se vivo, o homem precisa agir e, para que possa agir é necessário conhecer a natureza e o propósito da ação escolhida. O que o distingue dos outros seres é a necessidade de agir, diante de alternativas, por meio de uma escolha baseada na vontade; o homem tem de valorizar a sua vida por escolha, de aprender a preservá-la por escolha, de descobrir quais os seus valores legítimos e praticar suas virtudes por escolha. Pensar é a única virtude básica do homem, da qual todas as demais decorrem. Quem não utiliza seu discernimento nega a si próprio. O homem que proclama: “quem sou eu para saber?” está afirmando: “quem sou eu para viver?”... A felicidade só pode ser alcançada por um homem racional, o homem que tenha objetivos racionais, que só encontra prazer e alegria em atos racionais...”

Ayn Rand

DEDICATÓRIA

Ao meu grande amor,
Victor Domingues de Medeiros Albuquerque.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Hugo Pequeno Monteiro, pela orientação e principalmente por confiar em meu trabalho.

À Dr^a Luciana dos Reis Vasques, pela co-orientação, pelas sugestões ao longo da confecção deste trabalho, pela oportunidade de ingressar no meio científico e por me proporcionar um grande aprendizado. Agradeço também à sua família, Helder e Tito.

À Dr^a Leny Toma, pelo acolhimento dentro do Departamento da Clínica Médica.

Aos professores da Banca Examinadora e demais docentes da Pós Graduação da UNIFESP, pelo aprendizado nas diversas áreas da Ciência.

Ao Dr. Carlos Frederico Martins Menck e Dr. Bryan Eric Strauss, pela colaboração e auxílio ao longo do meu mestrado e demais projetos.

À Dr^a Valderez Bastos Valero Lapchik e toda equipe de técnicos do Biotério do INFAR, por toda dedicação e ajuda.

Aos meus pais, Sonia e Valter, por todo o apoio, amor e compreensão. Sem vocês não teria chegado até aqui sozinha. Obrigada!

Aos meus irmãos queridos, Paulo, Helena, Ricardo, Marcelo, Anna e Rafael, pelo carinho e apoio. Adoro todos vocês!

Ao meu avô Oswaldo Sante Refosco, pelo grande carinho.

A todos meus familiares, especialmente tia Sandra, tia Cida, tio Renato, tio Carlos, e meus primos Alexandre, Gustavo, Giovanni e Giulia.

Ao meu namorado e melhor amigo e confidente, Victor, por todo o amor, apoio, compreensão, conselhos, e por compartilhar a vida comigo. *“Young Love must live twice only for us”* - Te amo *^infinito!*

À minha “segunda família”, por estarem sempre me incentivando: Dna. Tânia, Sr. André, Caio, André, Raquel, Tomás e Beatriz.

À minha amiga e colega de laboratório, Cláudia, por toda ajuda e compreensão em tempos difíceis, onde encontrei alguém para me apoiar.

A todos os meus colegas do Laboratório de Sinalização Celular, por serem sempre alegres e prestativos. Foi muito bom ter trabalhado com vocês ao longo desses dois anos e meio! E vamos continuar!

Aos meus amigos, em especial à Carolina, Tânia e Diogo, pelo apoio dentro da nossa área de pesquisa e ensino de Biologia.

Ao Dr. Evandro Faustino, por acreditar em meus trabalhos pedagógicos e me convidar para participar do Volare e demais projetos em que estamos lutando juntos.

A todos do Colégio Volare, principalmente minhas queridas alunas, pela imensa vontade de aprender e pelos momentos especiais em nossas aulas de Ciências.

Ao professor Dr. Gilberto Tadeu R. da Silva e à professora Ms. Irani Gomes dos Santos, pela indicação, acolhimento na Faculdade Santa Marcelina e confiança em meu trabalho como docente. Agradeço também aos meus alunos de graduação, pela aprendizagem e incentivo.

Ao Maestro Parcival Módolo e todos do Coral Universitário Mackenzie. É uma honra imensa poder cantar com vocês!

A CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

E2F1 pertence a uma família de fatores de transcrição e possui papel central no controle da expressão de genes relacionados à regulação da proliferação celular, pois ativa genes que participam da síntese de DNA. A atividade de E2F1 é regulada por meio da proteína pRB que, quando fosforilada por quinases associadas à ciclinas (Ciclinas/CDK) libera este fator de transcrição, promovendo assim a proliferação. A disfunção da complexa via de regulação da divisão celular pode acarretar em proliferação exacerbada, sendo a superexpressão de E2F1 bastante comum em diferentes tipos de tumores. Este fenômeno pode ser o principal fator para a alta proliferação de células tumorais. Desta forma, a inibição da atividade de E2F1 através de RNA de interferência (RNAi) pode ser promissora como tratamento para a diminuição da proliferação de células de melanoma. Assim sendo, objetiva-se neste trabalho inativar por RNAi o gene *E2f1* em células B16mCAR, derivadas de melanoma de C57BL/6 e que superexpressam o receptor CAR, e averiguar os efeitos de sua ausência na proliferação celular, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Palavras chave: E2F1, RNAi, melanoma, adenovírus, proliferação celular.

ABSTRACT

E2F1 belongs to a family of transcription factors and plays a central role in controlling the expression of genes related to regulation of the cell-cycle progression, since it activates genes involved in DNA synthesis. The activity of E2F1 is regulated by pRB protein, that when phosphorylated by cyclin-dependent kinases cyclins (Cyclins/CDK) releases this transcription factor, thereby promoting proliferation. The dysfunction of the complex regulatory pathway of cell division can lead to excessive proliferation, which overexpression of E2F1 is quite common in different types of tumors. This phenomenon may be the main factor for the high proliferation of tumor cells. Thus, inhibition of E2F1 activity by RNA interference (RNAi) may be promising as a treatment for decreased proliferation of melanoma cells. Therefore, the purpose of this work is the inactivation of the *E2f1* gene through RNAi in B16mCAR cells, derived from C57BL/6's melanoma and overexpresses the CAR receptor, and also verifies the effects of its absence on cell proliferation *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: E2F1, RNAi, melanoma, adenoviruses, cell proliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As diferentes fases do ciclo celular.....	pág.2
Figura 2. Diferentes fases do Ciclo Celular e sua interação com as Ciclinas e quinases dependentes de Ciclinas.....	pág.3
Figura 3. Domínios de Rb, fases do ciclo celular na qual ocorre ativação dos complexos CDKs e interação entre Rb e E2F.....	pág.5
Figura 4. Família E2F de fatores de transcrição.....	pág.7
Figura 5. Controle da expressão gênica de Rb/E2F.....	pág.8
Figura 6. Domínio organizacional de E2F1.....	pág.9
Figura 7. Relação entre as vias de p53 e E2F com o ciclo celular.....	pág.10
Figura 8. Melanoma.....	pág.13
Figura 9. Estimativa de novos casos de câncer de pele para o ano de 2010 no Brasil.....	pág.14
Figura 10. Representação do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) após inserção de duplas fitas de RNA (dsRNAs) em dois estudos distintos.....	pág.18
Figura 11. Mecanismo de ação do RNAi.....	pág.19
Figura 12. Representação da estrutura do duplex de siRNA e sua região semente.....	pág.20
Figura 13. Importância da descoberta do RNA de interferência.....	pág.21
Figura 14. RNA de interferência: diferentes tipos de moléculas efetoras (siRNA, dsRNA, plasmídeo ou vetor viral) e seus sistemas de entrega.....	pág.23
Figura 15. Índice de utilização de diferentes veículos para entrega de material genético em ensaios clínicos para Terapia Gênica no ano de 2010.....	pág.24
Figura 16. Partículas adenovirais e reconhecimento do adenovírus pela célula.....	pág.25
Figura 17. Esquema de vetor adenoviral para a entrega de RNAi.....	pág.27
Figura 18. Utilização de shRNAs direcionados para inativação da expressão gênica.....	pág.28
Figura 19. Esquemática dos objetivos do presente trabalho.....	pág.29
Figura 20. Seqüência parcial do mRNA do gene de rato similar ao <i>E2f1</i> de camundongo, utilizada para a identificação de trechos potenciais para alvo para a atuação do siRNA...	pág.31
Figura 21. Seqüência parcial do eGFP e identificação do alvo para a atuação de siRNAs.....	pág.32
Figura 22. Esquema da região codificadora de shRNAs.....	pág.33

Figura 23. Esquema do processo de construção da partícula viral, onde um plasmídeo é gerado a partir da recombinação do plasmídeo de transferência com o plasmídeo pAd Δ E1/E3.....	pág.34
Figura 24. Representação de efeito citopático obtidos pela transdução com adenovírus..	pág.39
Figura 25. Diagrama de placa de 96 poços contendo diluições seriadas de partículas adenovirais para titulação pelo método TCID ₅₀	pág.39
Figura 26. Modelo de transdução <i>in vitro</i> em placa de 12 poços contendo diferentes adenovírus na mesma concentração (partículas/ml).....	pág.42
Figura 27. Representação de curvas de amplificação obtidas em SDS software – <i>Amplification plot</i>	pág.50
Figura 28. Representação de curvas de dissociação obtidas após qRT-PCR em SDS software – <i>Dissociation curve</i>	pág.51
Figura 29. Exemplo de gráfico para cálculo da eficiência do par de <i>primers</i> para o gene <i>E2f1</i>	pág.53
Figura 30. Biotério do INFAR (Instituto Nacional de Farmacologia – UNIFESP).....	pág.56
Figura 31. Gel 0,8% de agarose para verificação da integridade de DNA plasmideal de pAdshE2F1-B e pAdshGFP.....	pág.59
Figura 32. Seqüenciamento da fita senso dos plasmídeos pAdshE2F1-B e pAdshGFP...pág.60	
Figura 33. Gel 1% de agarose para verificação da digestão de DNA plasmideal com a enzima de restrição <i>Pac I</i>	pág.60
Figura 34. Eficiência da simples transdução em células B16mCAR com AdRSVLacZ.....	pág.62
Figura 35. Eficiência da dupla transdução em células B16mCAR com AdRSVLacZ.....	pág.62
Figura 36. Representação de gel de agarose 2% com amostras do produto da RT-PCR..pág.63	
Figura 37. Análise da expressão de <i>E2f1</i> por PCR em Tempo Real e Western Blot.....	pág.64
Figura 38. Expressão de RNAm de <i>E2f1</i> por PCR em tempo real e análise da expressão da proteína de <i>E2f1</i> por Western Blot.....	pág.65
Figura 39. Expressão de RNAm de <i>E2f2</i> e <i>E2f3</i> por PCR em tempo real.....	pág.66
Figura 40. Expressão de RNAm de Ciclina E por PCR em tempo real.....	pág.67
Figura 41. Curva de expressão de <i>E2f1</i> por PCR em Tempo Real em células B16mCAR com simples transdução de AdshGFP e AdshE2F1-B.....	pág.68

Figura 42. Curva de expressão de E2f2 por PCR em Tempo Real em células B16mCAR com simples transdução de AdshGFP e AdshE2F1-B.....	pág.68
Figura 43. Curva de expressão de E2f3 por PCR em Tempo Real em células B16mCAR com simples transdução de AdshGFP e AdshE2F1-B.....	pág.69
Figura 44. Ensaio fenotípico de proliferação celular <i>in vitro</i> em células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B (simples transdução) ou não transduzidas.....	pág.70
Figura 45. Ensaio fenotípico de proliferação celular <i>in vitro</i> em células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B (dupla transdução) ou não transduzidas.....	pág.71
Figura 46. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	pág.72
Figura 47. Medida da espessura das patas de camundongos C57BL/6 ao longo de três semanas.....	pág.73
Figura 48. Curva de crescimento de células B16mCAR <i>in vivo</i>	pág.74
Figura 49. Peso das patas posteriores de camundongos C57BL/6 após duas ou três semanas.....	pág.74
Figura 50. Medida da espessura das patas de camundongos C57BL/6 ao longo de três semanas.....	pág.75
Figura 51. Representação da medida da espessura das patas de camundongos C57BL/6 ao longo de três semanas.....	pág.76
Figura 52. Espessura das pernas posteriores de camundongos C57BL/6 após três semanas.....	pág.77
Figura 53. Representação da espessura das pernas posteriores de camundongos C57BL/6 após três semanas.....	pág.77
Figura 54. Verificação da especificidade do AdshE2F1-B.....	pág.83
Figura 55. Genealogia dos camundongos <i>inbred</i> C57BL.....	pág.102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüência das construções de siE2f1-B e siGFP.....	pág.33
Tabela 2: Reagentes para confecção da Solução X-Gal.....	pág.41
Tabela 3: Quantidade de reagentes do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, água DEPC e RNA para síntese de cDNA.....	pág.47
Tabela 4: Quantidade de reagentes para preparação da PCR.....	pág.48
Tabela 5: Quantidade de reagentes e cDNA para preparação da qRT-PCR.....	pág.49
Tabela 6: Lista de oligonucleotídeos utilizados e suas respectivas seqüências.....	pág.52
Tabela 7: Reagentes e quantidades para preparo da curva de diluição.....	pág.54
Tabela 8: Lista de anticorpos e diluições utilizadas para Western Blot.....	pág.55
Tabela 9: Títulos dos diferentes adenovírus em passagem P4.....	pág.61
Tabela 10: Ensaio fenotípico de proliferação celular <i>in vitro</i> em células B16mCAR longo de 8 dias (simples transdução).....	pág.70
Tabela 11: Ensaio fenotípico de proliferação celular <i>in vitro</i> em células B16mCAR ao longo de 8 dias (dupla transdução).....	pág.71
Tabela 12: Análise das fases do ciclo por citometria de fluxo.....	pág.72
Tabela 13: Curva de proliferação celular <i>in vivo</i> em células B16mCAR com AdshE2F1-B, AdshGFP (dupla transdução) ou não transduzidas ao longo de três semanas.....	pág.75
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.....	pág.76
Tabela 15: Cronograma de avaliação de documentos do Comitê de Ética da UNIFESP.....	pág.103

LISTA DE ABREVIações

Ago2 – Argonauta do tipo 2
CAR – “*coxsackie-adenovirus receptor*”
CDKI ou CDK – quinases dependentes de ciclinas
CKI – inibidores de quinases dependentes de ciclinas
cDNA - fita do DNA complementar
DMEM – “*Dulbecco's modified eagle's medium*”
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico
dsRNAs - duplas fitas de RNA
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
mCAR – “*mouse coxsackie-adenovirus receptor*”
MEM – “*Minimal essential medium*”
NTC - *No Template Control*
PBS – “*phosphate buffered saline*”
PCR – reação em cadeia da Polimerase
PP – “*pocket proteins*”
pRb – proteína retinoblastoma
PTGS - silenciamento gênico pós-transcricional
qRT-PCR – PCR em Tempo Real
RISC - *RNA-induced silencing complex*
RNA – ácido ribonucléico
RNAi – RNA de interferência
RNAm – RNA mensageiro
RNA pol II: RNA polimerase II
RNA pol III: RNA polimerase III
RPM – rotações por minuto
RPMI – “*Roswell Park Memorial Institute - 1640 medium modification*”
RSV - *Rous sarcoma vírus*
RT – Transcriptase reversa
RT-PCR – transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase
SDS – sódiodecilsulfato
siRNA – *small interfering RNA*
shRNA – *short hairpin RNA*
TBS-T – tampão Tris-salina-Tween
T_m - Temperatura de *melting*
UV – luz ultravioleta
X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo Celular.....	pág.1
1.2.1 Ciclinas e Ciclinas quinases.....	pág.2
1.2.1 Proteína RB.....	pág.4
1.2 Fatores de transcrição: Família E2F.....	pág.5
1.2.1 E2F1 e seu papel no Ciclo Celular e Apoptose.....	pág.9
1.3 Melanoma.....	pág.12
1.3.1 Ocorrência e importância do estudo de melanomas.....	pág.13
1.3.2 Disfunção do ciclo celular no melanoma.....	pág.14
1.4 Silenciamento gênico por RNA de Interferência.....	pág.16
1.4.1 Descoberta e utilização do RNAi.....	pág.16
1.4.2 Como gerar a interferência.....	pág.22
1.5 Vetores virais.....	pág.24
1.5.1 Utilização de partículas adenovirais.....	pág.24
1.5.2 Inserção de adenovírus com RNAi.....	pág.26

2 OBJETIVOS

2.3 Objetivo Geral.....	pág.29
2.4 Objetivos Específicos.....	pág.29

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo Celular.....	pág.30
--------------------------	--------

3.1.1	Células de melanoma de camundongo.....	pág.30
3.1.2	Manuseio de Células B16mCAR e HEK 293.....	pág.30
3.2	Obtenção dos vetores de Adenovírus.....	pág.31
3.2.1	Produção de AdshE2F1-B, AdshGFP e AdRSVLacZ....	pág.31
3.2.1.1	Produção de bactérias competentes.....	pág.35
3.2.1.2	Transformação bacteriana e preparação de plasmídeos em média escala.....	pág.35
3.2.1.3	Seqüenciamento.....	pág.36
3.2.1.4	Transfecção por cálcio-fosfato e amplificação dos adenovírus.....	pág.37
3.2.1.5	Quantificação das partículas adenovirais e cálculo da titulação.....	pág.39
3.3	Transdução <i>in vitro</i>	pág.40
3.3.1	Uso de AdRSVLacZ como controle da transdução.....	pág.41
3.3.2	Validação do AdshE2F1.....	pág.42
3.3.3	Transdução de partículas virais em células B16mCAR (simples e dupla transdução).....	pág.43
3.3.3.1	Curva de expressão dos genes <i>E2f1</i> , <i>E2f2</i> , <i>E2f3</i> e <i>Ciclina E</i>	pág.43
3.3.3.2	Ensaio de proliferação <i>in vitro</i>	pág.44
3.3.3.3	Citometria de fluxo.....	pág.44
3.4	Extração de RNA.....	pág.45
3.4.1	Extração por TRIzol.....	pág.45
3.4.2	Tratamento com DNase I.....	pág.46

3.4.3 Síntese da fita do DNA complementar (cDNA).....	pág.47
3.4.4 RT-PCR.....	pág.47
3.4.5 PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....	pág.48
3.4.6.1 Construção e validação de oligonucleotídeos.....	pág.51
3.5 Extração de Proteínas.....	pág.53
3.5.1 Extração de proteínas citoplasmáticas.....	pág.53
3.5.2 Dosagem de proteínas.....	pág.54
3.5.3 Western Blot.....	pág.54
3.5.3.1 Anticorpos utilizados.....	pág.55
3.5.3.2 Revelação por quimiluminescência.....	pág.56
3.6 Transdução <i>in vivo</i>	pág.56
3.6.1 Padronização do crescimento tumoral <i>in vivo</i>	pág.57
3.6.2 Injeção das células transduzidas.....	pág.57
3.6.3 Ensaio de proliferação <i>in vivo</i>	pág.58
3.6.3.1 Obtenção de medidas e peso dos camundongos.....	pág.58
3.7 Análise Estatística.....	pág.58

4. RESULTADOS

4.1 Preparação dos plasmídeos e adenovírus.....	pág.59
4.2 Titulação dos vetores adenovirais.....	pág.61
4.3 Otimização da transdução com AdRSVLacZ em células B16mCAR	pág.61
4.3.1 Eficiência por simples transdução.....	pág.61
4.3.2 Eficiência por dupla transdução.....	pág.62

4.4 Validação da construção de cassete de expressão de shE2f1 em vetor adenoviral em células B16mCAR.....	pág.62
4.5 Perfil de expressão em células transduzidas com AdshE2F1-B....	pág.65
4.5.1 Análise da expressão de E2f1.....	pág.65
4.5.2 Análise da expressão de E2f2 e E2f3.....	pág.66
4.5.3 Análise da expressão de Ciclina E.....	pág.67
4.5.4 Curva de expressão de E2f1 em células B16mCAR.....	pág.67
4.5.5 Análise fenotípica da proliferação em células B16mCAR transduzidas com AdshE2F1-B.....	pág.69
4.5.6 Análise do Ciclo Celular.....	pág.72
4.6 Papel de E2F1 na proliferação celular <i>in vivo</i>	pág.73
4.6.1 Padronização do crescimento tumoral em camundongos C57/BL6 com células B16mCAR.....	pág.73
4.6.2 Análise da proliferação celular em camundongos C57/BL6 com células B16mCAR e células B16mCAR transduzidas com AdshGFP e AdshE2F1-B.....	pág.75
5. DISCUSSÃO.....	pág.78
6. CONCLUSÃO.....	pág.90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	pág. 91
8. ANEXO – Utilização de modelos <i>in vivo</i>.....	pág. 100
8.1 Aspectos gerais da utilização de modelos <i>in vivo</i>	pág. 100
8.1.1 Origem e características de camundongos C57BL/6.....	pág. 101
8.2 Documentação do Comitê de Ética.....	pág. 103
8.3 Resumos apresentados.....	pág. 113

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo Celular

Todos os organismos são constituídos por células que se multiplicam, em sua maioria, através de divisões celulares. Em células eucarióticas, o ciclo celular consiste em quatro fases distintas, nomeadas de G₁, S, G₂ e M. A intérfase corresponde ao maior período de vida das células, e abrange as fases G₁, S e G₂, onde a síntese de DNA é realizada durante a fase S. A fase mitótica (M), que vêm sendo estudada desde 1880, é responsável pela divisão do DNA de forma igualitária, contando com um aparato específico para a distribuição do material genético no decorrer da mitose até o término da divisão, na citocinese (revisto em Mitchison *et al*, 2001; Lodish *et al*, 2002; Alberts *et al*, 2008).

Estudos envolvendo o ciclo celular foram aumentando e se aprimorando através de ferramentas genéticas e biomoleculares. Nas décadas de 1970 e 1980, os pesquisadores Hartwell, Hunt e Nurse identificaram moléculas que regulavam o ciclo em células eucarióticas. Hartwell identificou genes específicos envolvidos no controle do ciclo, denominados genes *CDC* (genes da divisão do ciclo celular), e elucidou o papel essencial dos “*checkpoints*” (ponto de restrição) ao longo do ciclo. Nurse identificou o gene *cdc2*, fundamental para transição da fase G₂ para M; e Hunt descobriu as ciclinas, proteínas que se ligam a moléculas Cdks (quinases dependentes de ciclinas). Estes achados foram de grande importância não só para a melhor compreensão do funcionamento do ciclo celular, mas também para entender como se desenvolve a instabilidade cromossômica em células tumorais, o que abriu novas possibilidades para o estudo do câncer e futuras terapias. Tendo-se demonstrado a relevância destas descobertas, Hartwell, Hunt e Nurse receberam conjuntamente o Prêmio Nobel em Medicina em 2001 (Hunt *et al*, 1983; Hunt, 2002; Nurse, 2002; Hartwell, 2002 e 2004; Sherr *et al*, 2004; Sánchez *et al*, 2005; Santamaria *et al*, 2006; Alberts *et al*, 2008).

Deste modo, a progressão do ciclo e a divisão celular em mamíferos é dada pela ativação seqüencial de ciclinas associadas à Cdks (fig.1). Estas, por

sua vez, são moléculas que controlam e coordenam a síntese de DNA, a separação dos cromossomos e a divisão celular (Hunt, 2004; Santamaria *et al*, 2006; Alberts *et al*, 2008).

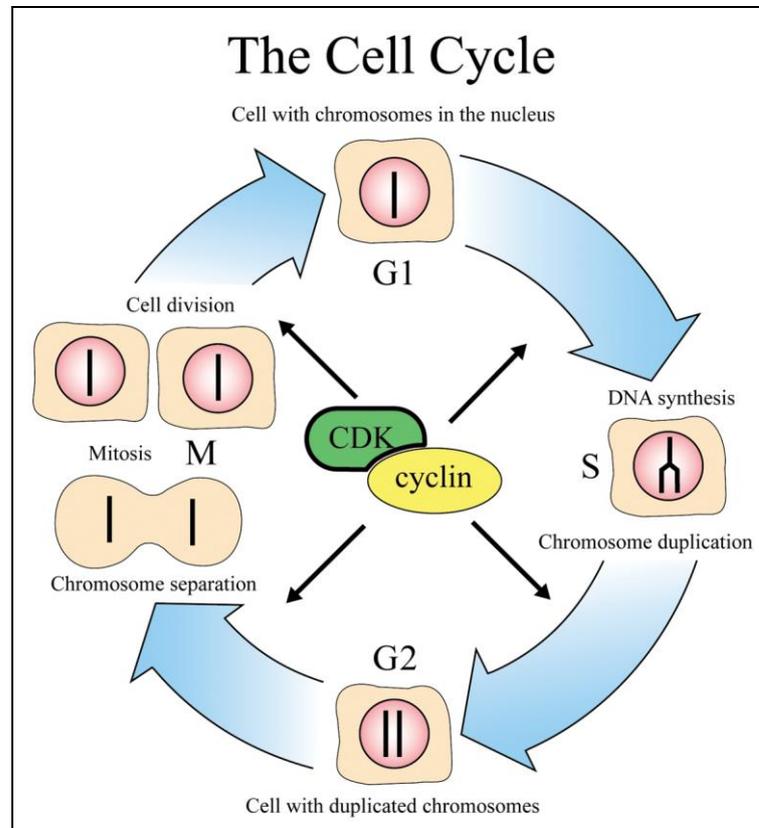


Figura 1. As diferentes fases do ciclo celular. Na primeira fase, denominada G₁, ocorre o crescimento da célula. Quando esta atinge um determinado tamanho, inicia-se a fase S, onde o DNA será sintetizado e os cromossomos serão duplicados. Na fase G₂, a células se prepara para a divisão; enquanto que na fase mitótica (M), os cromossomos são separados e segregados para as células filhas, onde cada uma é idêntica à célula de origem. As células filhas entram novamente em G₁, completando assim o ciclo (retirado do site *The Nobel Prize in Physiology or Medicine*, seção *Press Release – A great impact of the discoveries*, 2001; disponível em: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/).

1.1.2 Ciclinas e Ciclinas quinases

Como visto anteriormente, a passagem pelas diferentes fases do ciclo, incluindo o ponto de restrição e a entrada na fase S, são coordenadas pela ativação e inativação seqüencial das proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs). As ciclinas são proteínas que regulam a atividade das Cdk e

selecionam proteínas alvo a serem fosforiladas, sendo posteriormente degradadas durante a mitose. Atualmente já foram identificadas 10 diferentes ciclinas em humanos (A a H), sendo as Ciclinas A, B, D e E (fig. 2A) as mais estudadas. A transição da fase G_1 para S é regulada pelas ciclinas A, D e E; enquanto que a entrada na fase M é mediada em grande parte pelo complexo Ciclina B-Cdk1. O complexo Ciclina E-Cdk2 é responsável pela regulação da proliferação e diferenciação, e pode também apresentar papel fundamental durante a espermatogênese de mamíferos, uma vez que a deficiência deste complexo mostrou reduzir a fertilidade de camundongos machos, podendo inclusive levar à infertilidade (Hunt, 1983; Ikezawa *et al*, 1998; Hunt, 2004; Yu *et al*, 2008; Lindqvist *et al*, 2009).

Os complexos Cdk/ciclinas são compostos por uma subunidade de ciclina reguladora e por uma subunidade catalítica de quinase dependente de ciclina (fig. 2B), controlando assim os processos celulares ao longo do ciclo. Deste modo, quando associadas à ciclinas, as CDKs formam complexos estáveis (Morgan *et al*, 1997; Jackman *et al*, 2001; Lodish *et al*, 2002), e estes ainda participam na fosforilação de uma família de proteínas conhecida como “*pocket proteins*” (PP) (Halaban *et al*, 2005; Alberts *et al*, 2008).

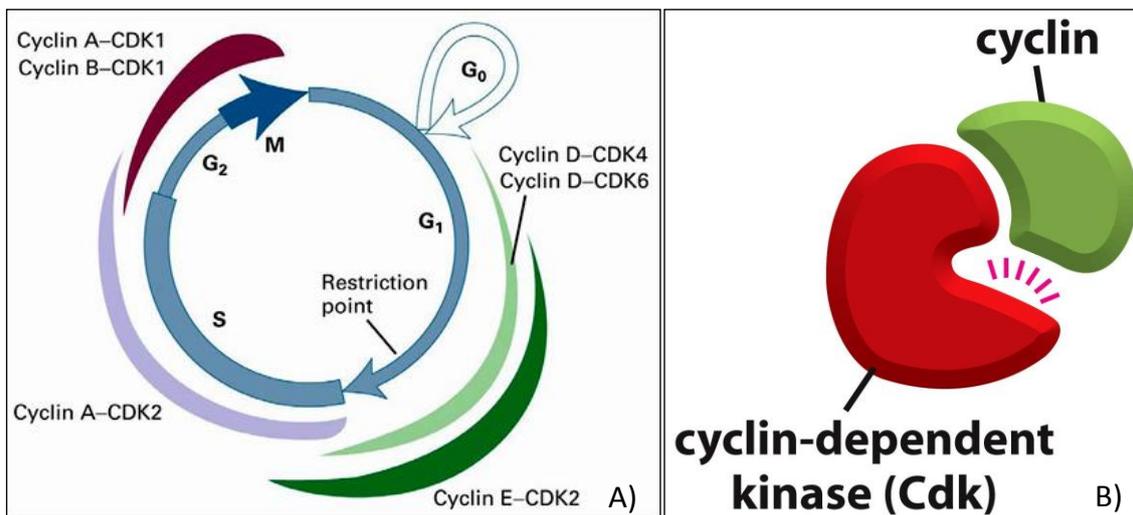


Figura 2. Diferentes fases do Ciclo Celular e sua interação com as Ciclinas e quinases dependentes de Ciclinas. A) Atividades dos complexos ciclina-Cdk em mamíferos (Lodish, 2002). Fase G_1 : regulação por Ciclinas D e E; fase S: regulação por Ciclina A; ciclinas mitóticas (transição da fase G_2 para M): Ciclinas A e B. A largura das faixas coloridas ao redor de cada fase do ciclo representa a atividade dos complexos Cdk ao longo do ciclo. B) Componentes do

controle do ciclo celular. Quando uma ciclina forma um complexo com uma Cdk, a proteína quinase é ativada para alvejar eventos específicos do ciclo celular. Sem a associação com a ciclina, a Cdk permanece inativa (Alberts, 2008).

Outro mecanismo de regulação do ciclo celular é dado por inibidores de quinases dependentes de Ciclinas, os CDKIs ou CKIs, que antagonizam a via acima descrita. Duas famílias gênicas de CDKIs foram descritas: INK4 (p15, p16, p18 e p19), que liga-se à CDK4 e CDK6 e previne a associação destas com as ciclinas D; e WAF/KIP (p21^{cip1/waf1}, p27^{kip1} e p57^{KIP2}), que forma complexos heterotriméricos com os complexos de Ciclina D/CDK4, Ciclina D/CDK6 e Ciclina E/CDK2. Através da ação destes inibidores não há fosforilação de certas proteínas específicas (*pocket proteins*) pelas CDKs impedindo, assim, a progressão do ciclo celular, uma vez que essas proteínas ficam livres para seqüestrar fatores de transcrição da família E2F (Blain *et al*, 1997; LaBaer *et al*, 1997; Ikezawa *et al*, 1998; Cheng *et al*, 1999).

1.1.3 Proteína RB

Em mamíferos, a família das “*pocket proteins*” (PPs) consiste em três proteínas: pRb, p107 e p130. Dentre estas, a mais importante é a proteína retinoblastoma (pRb), que é um supressor tumoral e tem como função principal manter as células em G₁ por meio do seqüestro de fatores de transcrição E2F (Stevens & Thangue, 2003; Reis, 2007; Poznic, 2009). O gene *Rb* encontra-se localizado no cromossomo 13 (13q14.2), e seu produto é uma fosfoproteína nuclear que reprime genes necessários para a transição entre a fase G1 e S, ou seja, reprime os genes necessários através do seqüestro de E2F, resultando assim em parada do ciclo celular (Xing *et al*, 1999; Giacinti *et al*, 2006).

Segundo Halaban (2005), Rb participa na regulação do ciclo celular, na senescência, nos processos de desenvolvimento, na homeostase tecidual e responde a quimioterapia (revisto em Liu, 2004; e em Poznic, 2009). A fosforilação de Rb pelos complexos ciclina D-Cdk4/Cdk6 e ciclina E-Cdk2

ocorre na fase final de G₁ (fig. 3), e muda suas estruturas secundária e terciária liberando assim os fatores de transcrição E2F e desencadeando a progressão do ciclo celular (Polyak *et al*, 1994; DeGregori *et al*, 1995; Sherr, 1996; Lundberg *et al*, 1998). As proteínas relacionadas ao supressor de tumor retinoblastoma Rb e aos fatores da família E2F são conservadas na maioria das células eucarióticas, incluindo animais e plantas. Deste modo, a via Rb-E2F é fundamental para a regulação do ciclo celular e tumorigênese (Weinberg, 1995; revisto em Cao *et al*, 2010).

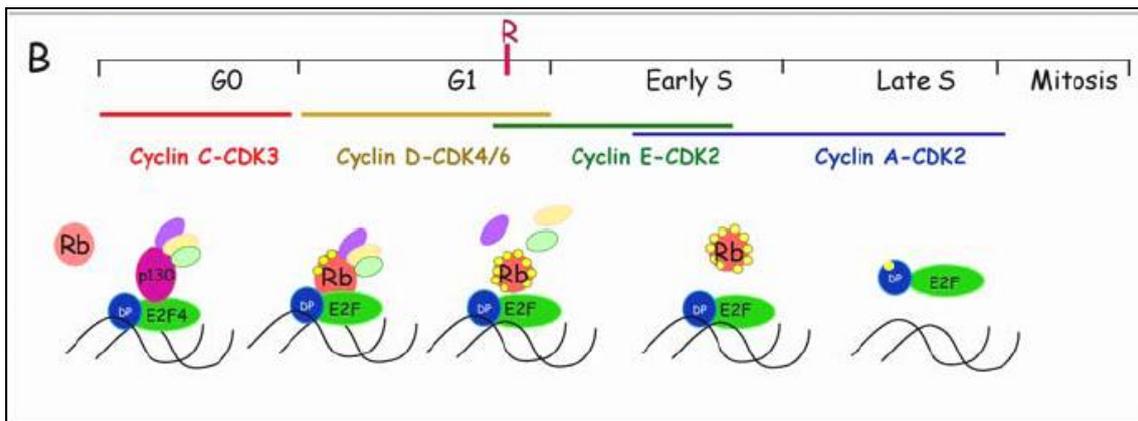


Figura 3. Domínios de Rb, fases do ciclo celular na qual ocorre ativação dos complexos CDKs e interação entre Rb e E2F (Halaban, 2005). O diagrama mostra a ativação temporária dos complexos CDKs, a fosforilação de Rb e sua associação com os fatores E2F ao longo da intérfase (entrada em G₁, passagem pelo ponto de restrição – R – e entrada na fase M). Apenas Rb completamente fosforilada libera os fatores de transcrição, permitindo assim a progressão do ciclo. Neste exemplo, quando Rb não se encontra fosforilada, esta não consegue se ligar à E2F em G₀, e seu papel passa a ser executado pela PP p130. Outro fato importante é interação entre os complexos CDKs no decorrer do ciclo, onde nota-se que cada ciclina surge em determinada fase, e a ativação do complexo seguinte é dependente da expressão da ciclina anterior.

1.2 Fatores de transcrição: Família E2F

A família E2F é composta por oito genes e nove proteínas que, de uma forma geral, podem ser classificadas como ativadoras ou repressoras da transcrição (revisto em Crosby *et al*, 2004; Kong *et al*, 2007; Iaquineta & Lees, 2007). Dentro desta classificação, E2F1 a E2F3a são reconhecidos como

ativadores, enquanto que E2F3b a E2F8 são repressores da transcrição (DeGregori & Johnson, 2006; Iaquineta & Lees, 2007; revisado em Cao *et al*, 2010).

Apesar de suas diferenças funcionais, as proteínas E2F1 a E2F6 compartilham a mesma estrutura por possuírem domínio de dimerização com proteínas da família DP (fig. 4), formando um complexo de fatores funcionais de transcrição que se ligam ao DNA com alta afinidade, regulando conjuntos sobrepostos de genes. Além disso, E2F1 a E2F5 também possuem domínio de ligação com as proteínas da família PP (revisado em Tsantoulis & Gorfoulis, 2005; e DeGregori & Johnson, 2006). Em células normais, a atividade de E2F1 a E2F5 é fortemente regulada durante o ciclo celular por meio da associação e liberação das PPs, onde E2F1 a E2F3 apresentam-se associadas à pRb, enquanto que E2F4 e E2F5 podem se associar com qualquer uma das PPs (revisado em DeGregori & Johnson, 2006). Os genes E2F1 a E2F6 requerem dimerização com uma das três proteínas da família DP para formar fatores funcionais de transcrição que se liguem ao DNA com alta afinidade (fig. 4). No entanto, existem outros níveis de controle da atividade de E2F, como a associação entre ciclina A/cdk2 e E2F1 quando as células estão para entrar na fase S (Stevens & Thangue, 2003).

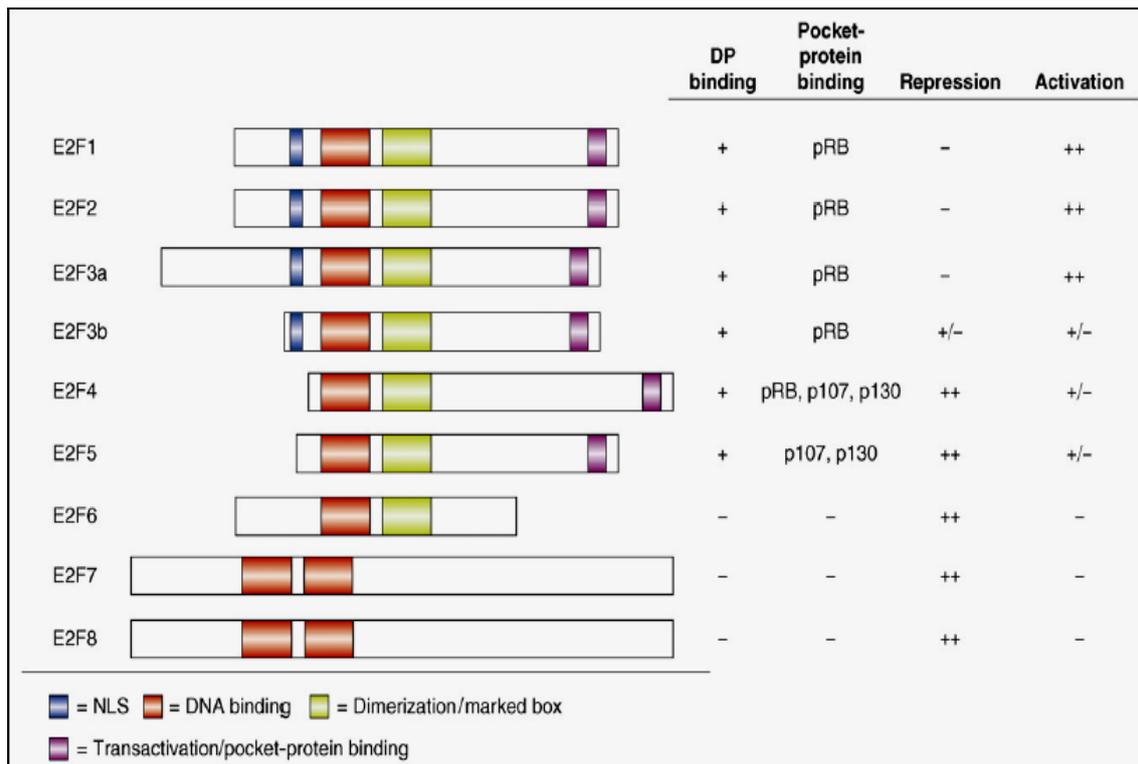


Figura 4. Família E2F de fatores de transcrição (laquinta & Lee, 2007). A família E2F é dividida em três grupos, baseados na estrutura e função de cada membro. Todos os E2Fs contêm um domínio homólogo de ligação ao DNA (representado em vermelho). Os membros ativadores da transcrição, E2F1, E2F2 e E2F3a, apresentam em comum um sinal de localização nuclear (NLS, representado em azul) e um domínio de ligação com as proteínas da família PP (em roxo). Nos membros repressores da transcrição nota-se a ausência do domínio N-terminal de E2F4 a E2F8, falta do NLS em E2F4 e E2F5 e perda do domínio de ligação com as PPs em E2F6 a E2F8, sendo estes últimos membros independentes da associação com as *pocket proteins*.

A liberação de E2F, causada pela dissociação das proteínas PP, parece ser o agente principal na regulação da proliferação celular, uma vez que desencadeia a transativação de genes como: *ciclina A e E*, *c-myc*, *cdc2*, *PCNA*, e *timidina quinase*, levando as células à fase S do ciclo (DeGregori, 2002; revisto em Vasques *et al*, 2009). Outra característica da família E2F é a função repressora passiva da expressão gênica, uma vez que o complexo Rb/E2F também tem a capacidade de ligar-se ao DNA e recrutar desacetilases de histonas (HDAC) e histonas metiltransferases (Suv39H1), que geram modificações epigenéticas promovendo o silenciamento gênico (Stevens & Thangue, 2003; Halaban, 2005).

Como visto acima, a atividade de E2F pode ser regulada direta ou indiretamente por diferentes mecanismos, como: inibição por CDKIs; inibição da transcrição por interação de pRB/E2F ocultando domínios de transativação; repressão da transcrição por seqüestro de E2F através de membros da família PP; e recrutamento de fatores de remodelamento da cromatina. Estes diferentes mecanismos de regulação encontram-se ilustrados na figura 5 (Stevens & Thangue, 2003).

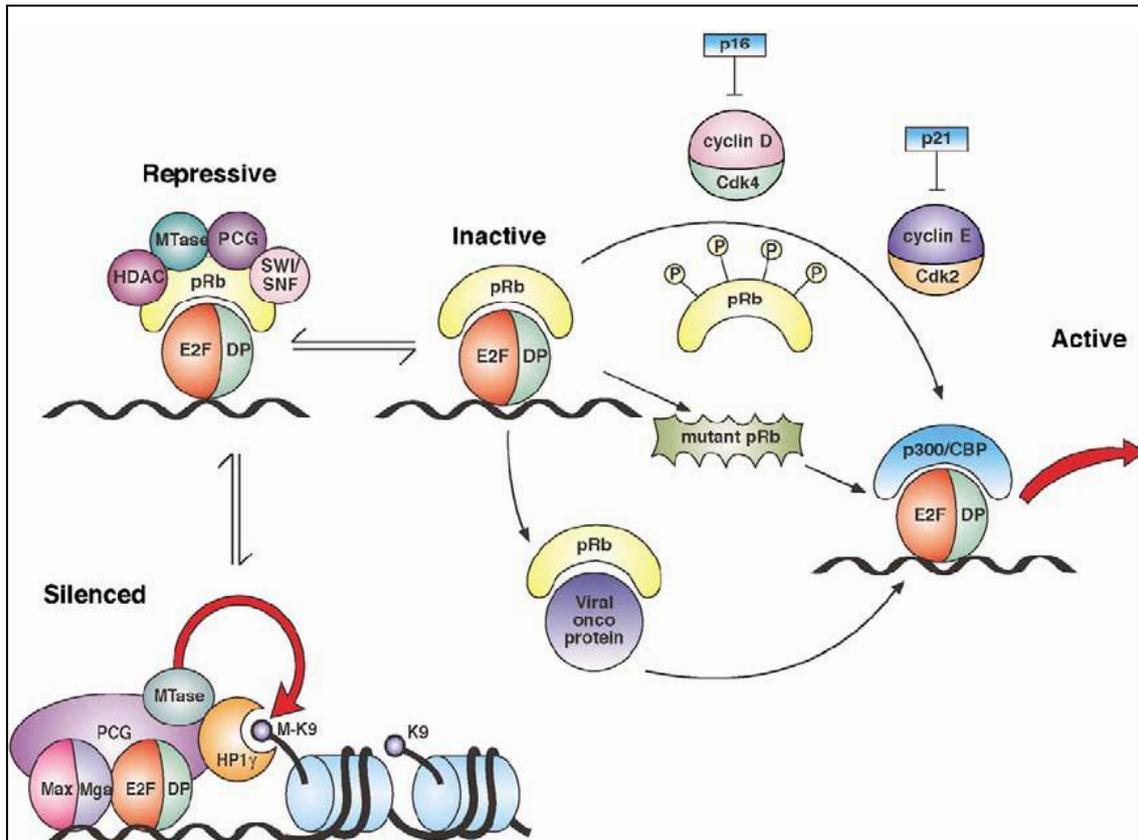


Figura 5. Controle da expressão gênica de Rb/E2F. O heterodímero E2F/DP liga-se às PPs, como pRb. Durante a progressão da fase G1 do ciclo celular as CDKs fosforilam pRb, liberando então E2F. Em células de tumor, a pRb mutante falha na ligação com E2F. O complexo Rb/E2F torna-se um repressor ativo da transcrição ao recrutar proteínas como HDAC, MTase, PCG e SWI/SNF, que alteram a cromatina, favorecendo a inativação (figura extraída da revisão de Stevens e Thangue, 2003).

1.2.1 E2F1 e seu papel no Ciclo Celular e Apoptose

Dentre os membros da família E2F, o mais bem estudado e caracterizado até o momento é o fator de transcrição E2F1 (fig. 6). Apesar da associação de pRb incidir sobre os diferentes E2Fs, E2F1 é o que possui papel principal no controle da resposta regulatória de pRb (Wells *et al*, 2003; Kaelin, 2003; Frolov & Dyson, 2004).

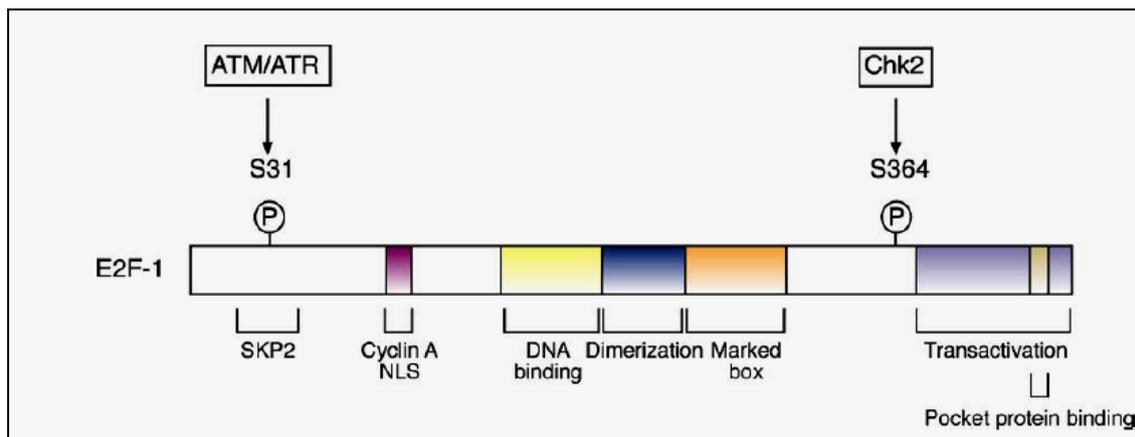


Figura 6. Domínio organizacional de E2F1 (Stevens & Thangue, 2004). O fator de transcrição E2F1 possui um domínio N-terminal com sítio de ligação ao complexo ciclina A-Cdk, um sinal nuclear de localização (NLS) e um sítio de ligação para a proteína Skp2 (componente da proteína ubiquitina ligase SCFSkp2). Os domínios de ligação com as proteínas PP e de transativação estão localizados no C-terminal de E2F1. O domínio de dimerização permite que E2F1 se associe com o heterodímero DP-1, formando um fator funcional que se ligue ao DNA com alta afinidade.

Entretanto, E2F1 possui a habilidade de atuar em duas vias antagônicas: induzir a progressão do ciclo celular e a apoptose (Pierce *et al*, 1999; Stevens & Thangue, 2003; De Gregori & Johnson, 2006). A indução de E2F1 para a morte celular pode ocorrer por duas vias, p53-independente e p-53 dependente, conforme ilustra a figura 7 (Stevens & Thangue, 2002; Pützer, 2007; Iaquinta & Lees, 2007). Além disso, como descrito anteriormente, outro meio de controle da atividade de E2F é dado através da associação entre a ciclina A/cdk2 e E2F1, assim que as células entram na fase S. O complexo ciclina A/cdk2 fosforila a proteína DP-1 ligada a E2F1, gerando a perda da

atividade de ligação desta última pelo DNA e, portando, promove a saída da fase S (Krek *et al*, 1994; Xu *et al*, 1994).

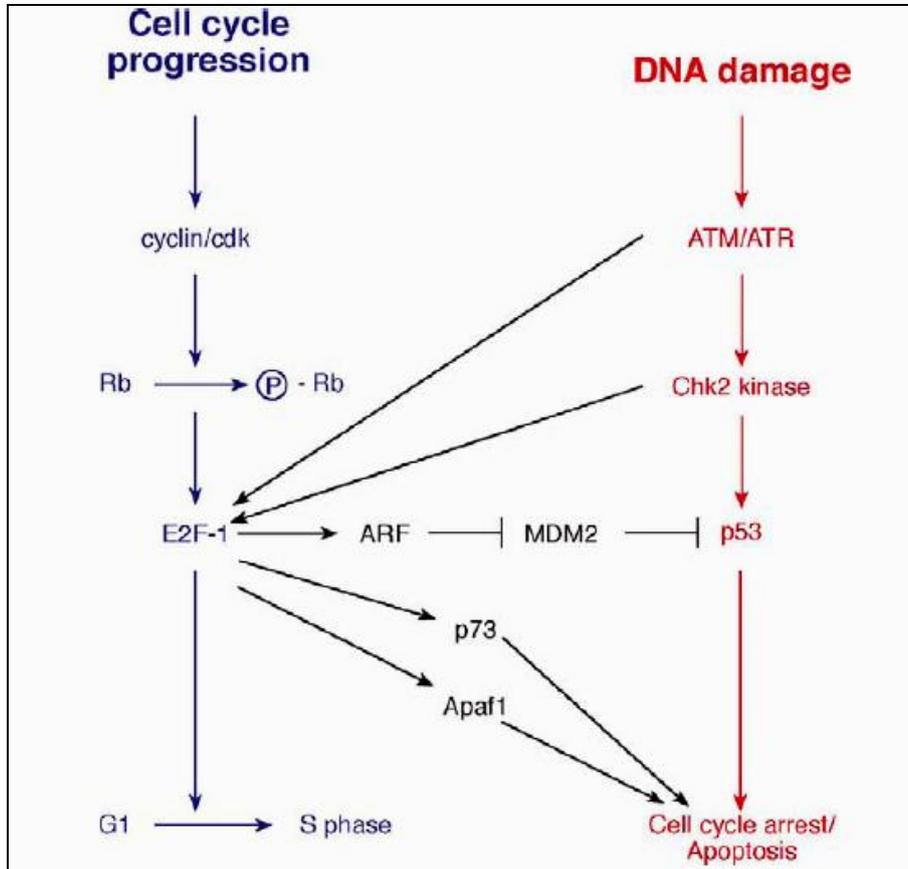


Figura 7. Relação entre as vias de p53 e E2F com o ciclo celular (Stevens & Thangue, 2002). A progressão do ciclo celular é regulada pelos complexos Cdks e a interação pRB/E2F (em azul). E2F1 é fosforilado por ATM/ATR e Chk2, que se encontram envolvidas no processo de sinalização da via de resposta ao dano no DNA e que levam ao aumento do nível de E2F1, resultando na apoptose (em vermelho).

Estudos revelaram que em células humanas de melanoma as três proteínas Rb estão hiperfosforiladas, e muitos genes de E2F (E2F1 a E2F4) estão altamente expressos e livres, fato que não ocorre em células normais. Outro evento complementar a este é a supressão de CDKIs e a superexpressão de ciclinas, levando a ativação de CDKs em melanomas (revisto em Halaban, 2005). O fato de múltiplas mutações nos genes da família

E2F não ocorrerem em apenas um tipo de tumor sugerem que a inativação de qualquer um deles, em conjunto com a regulação de Rb, seja suficiente para favorecer a tumorigênese (Stevens & Thangue, 2003).

Segundo observações de Nelson *et al* (2006), a inibição da atividade de E2F1 pode ser efetiva para o tratamento de melanomas. Isso porque a proteína Rb é altamente expressa na sua forma não-mutada na maioria dos cânceres, incluindo em melanomas, e E2F1 apresenta-se consideravelmente mais expresso em metástases do que em melanomas primários, fato também observado por Alla *et al* (2009). De fato, a desregulação da expressão gênica de *E2F1* é um evento comum na maioria dos tumores, onde este se encontra superexpresso ao invés de mutado (Sherr, 1996; Dyson, 1998). Alguns fatores podem contribuir para esta superexpressão, como por exemplo, o aumento exacerbado na fosforilação de Rb ou ausência desta, induzindo à liberação de E2F1 (Halaban, 2005).

No entanto, os estudos realizados por Humbert *et al* (2000) e Wu *et al* (2001), questionam o papel central de E2f1 na proliferação. Segundo os autores, a divisão celular em animais *knockout* para E2f1 é mantida; e estudo posterior de Kong *et al* (2007) observou a presença de um mecanismo de compensação a longo prazo, realizado por meio de outros genes da família E2F. Contudo, outras pesquisas não demonstraram qualquer alteração na expressão de outros genes de E2F em células *knockout* para E2F1 ou duplo *knockout* para *E2f1/E2f2* (Li *et al*, 2003; Goto *et al*, 2006). Assim, tanto o papel de E2F1 no controle da proliferação celular como o efeito compensatório de outros membros da família na ausência de E2F1 permanecem controversos.

Deste ponto de vista, torna-se importante o estudo da expressão de *E2F1* em tumores, observando principalmente se este realmente favorece a progressão e a metástase; e ainda, se a diminuição deste fator implica em algum mecanismo de compensação entre os demais membros ativadores da família E2F (Rounbehler *et al*, 2002; Curtin *et al*, 2005; Roberts, 2006; Kong *et al*, 2007; Alla *et al*, 2009; Coleman *et al*, 2010).

1.3 Melanoma

A partir de algumas evidências históricas, acredita-se que o melanoma tenha sido identificado há mais de 2400 anos (Urteaga *et al*, 1966). No entanto, a primeira definição do melanoma como doença maligna só ocorreu em 1804, por René Laennec (Laennec, 1806).

O melanoma é um câncer de pele que se desenvolve a partir da transformação maligna de melanócitos. Os melanócitos, por sua vez, são células da pele produtoras de melanina, sendo esta a pigmentação responsável pelas diferentes tonalidades da pele. A melanina também participa da proteção contra a exposição prolongada à irradiação ultravioleta (UV), que podem ser prejudiciais ao indivíduo (Jellouli-Elloumi *et al*, 2003). Quando há excesso de exposição à UV, o DNA presente nos melanócitos pode sofrer mutações, promovendo uma proliferação celular anormal, originando assim o melanoma (Whiteman *et al*, 1999).

Um tumor benigno primário geralmente é derivado de algum sinal na pele que já contenha excesso de melanócitos (fig. 8B). A degeneração maligna desses melanócitos é a responsável pelo início do tumor, que pode ser de quatro subtipos: expansivo superficial, nodular, lentigo maligno e lentiginoso das extremidades (revisto em Abeloff *et al*, 2004). Dentre os subtipos de melanoma, o expansivo superficial é o mais comum, acometendo aproximadamente 70% dos casos.

O melanoma maligno segue uma progressão clássica, onde se origina e cresce localmente, iniciando depois uma penetração vertical no tecido (fig. 8A). Desta forma, as células malignas podem ser carregadas através da via linfática ou até mesmo pelo sistema circulatório, tornando-se um tumor metastático. Quando este tipo de tumor se espalha, pode afetar também os pulmões, rins, cérebro e ocasionalmente os ossos. Se não tratado, o melanoma metastático compromete esses órgãos vitais, levando o indivíduo a óbito (Carlson *et al*, 2003).

As predisposições para o desenvolvimento do melanoma maligno podem ser ambientais, como a exposição excessiva ao sol, ou genéticas, onde 89%

dos casos de melanoma apresentam mutações nos genes NRAS e BRAF (Davies *et al*, 2002; Omholt *et al*, 2003). Alterações no gene CDKN2A (cromossomo 9p), que codifica as proteínas p16 e p19, conhecidos como supressores tumorais, também foram identificados.

O principal método de análise para o diagnóstico de melanoma é a biópsia. O tratamento é fundamentalmente cirúrgico, com remoção da região do tecido acometido pela doença, sendo o uso da radioterapia um tratamento limitado e indicado apenas para pacientes que apresentam metástase cerebral ou óssea (Weinstock, 2000).

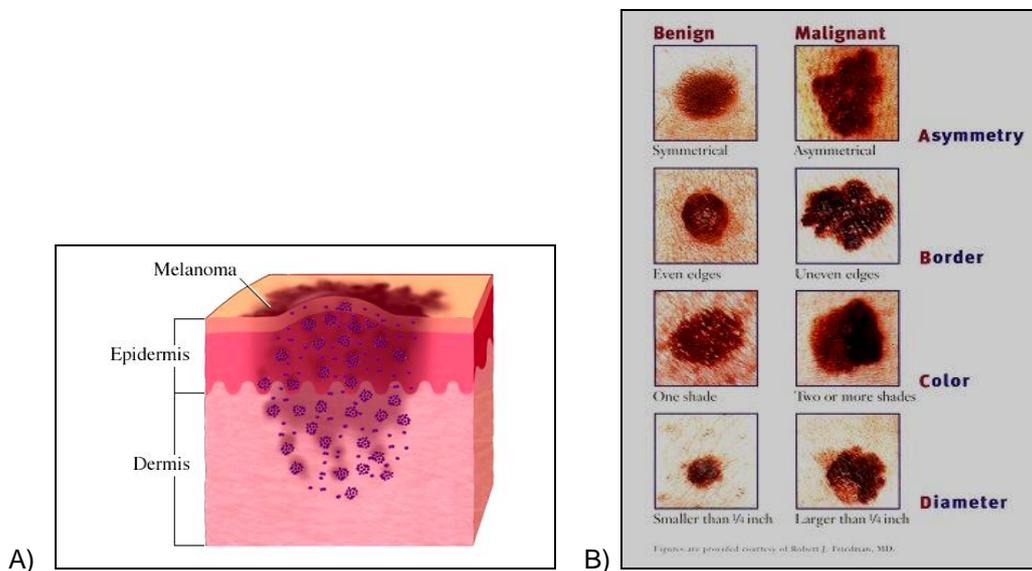


Figura 8. Melanoma. A) Transformação maligna de melanócitos, com espalhamento do melanoma. B) Guia “ABCD” de identificação de sinais de melanomas benignos e malignos. Fonte: Site do Cancer Research (disponível em: <http://www.cancerresearch.org>).

1.3.1 Ocorrência e importância do estudo de melanomas

Dentre os tumores de pele, o melanoma é o menos freqüente, porém apresenta um alto índice de letalidade, de aproximadamente 70%. A Organização Mundial de Saúde estima que anualmente ocorram cerca de 132 mil novos casos de melanoma no mundo; e o Instituto Internacional do Câncer estima que 1,8% da população nascida todos os dias seja diagnosticada com melanoma em alguma fase da vida.

No Brasil, o melanoma também apresenta letalidade elevada, porém com baixa incidência. Segundo o Instituto Nacional do Câncer – INCA, no ano de 2010 as estimativas de melanoma são de 2.960 casos novos em homens e 2.970 casos novos em mulheres (fig.9), atingindo assim cerca de 3% dos indivíduos que apresentam algum tipo de câncer. No entanto, se o mesmo for diagnosticado nos estágios iniciais, o prognóstico dos pacientes pode ser considerado bom, onde este tipo de câncer pode ser curável por métodos cirúrgicos (Nelson *et al*, 2006).

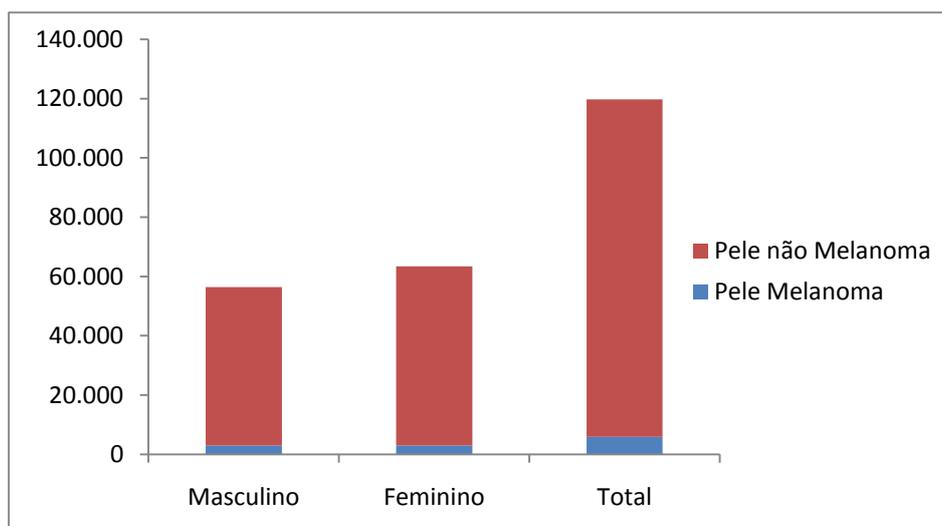


Figura 9. Estimativa de novos casos de câncer de pele para o ano de 2010 no Brasil. Fonte: INCA (disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>).

1.3.2 Disfunção do ciclo celular no melanoma

A formação de tumores pode ser promovida através da disfunção da complexa via de regulação do ciclo celular, acarretando em uma proliferação exacerbada. De fato, a desregulação da expressão gênica de *E2F1* é um evento comum na maioria dos tumores, onde este se encontra superexpresso ao invés de mutado (Sherr, 1996; Dyson, 1998). A superexpressão de *E2F1* é devida ao *feedback* positivo desta proteína sobre seu próprio promotor, além de um alto grau de fosforilação de pRb, ou ausência de função do mesmo, ambos resultando na liberação de E2F1. As razões principais para este

fenômeno são a alta atividade de CDK4, CDK6 e CDK2, ausência de CDKI e superexpressão de ciclinas (Halaban, 2005).

Em células humanas de melanoma os fatores de transcrição da família gênica *E2F* (*E2F1* a *E2F4*) estão altamente expressos, encontram-se livres e em alta atividade, podendo promover uma alta proliferação celular. No entanto, o mesmo não ocorre em melanócitos humanos normais. Nas primeiras passagens destas células, as proteínas mais presentes da família são *E2F2* e *E2F4*, enquanto que *E2F1* quase não é detectada (Halaban *et al*, 2000). Além disso, melanócitos de camundongo *knockout* para *E2f1* possuem uma significativa diminuição na sua proliferação, quando comparada às células normais, demonstrando que o seu crescimento é modulado por esta proteína (Halaban *et al*, 1998).

Em concordância com estas observações, estudos mais recentes sugerem que freqüentemente são encontradas amplificações no cromossomo 20q11 em melanomas, região esta que pode conter oncogenes que apresentam papel importante no desenvolvimento e progressão destes tumores (Curtin *et al*, 2005; Nelson *et al*, 2006; Roberts, 2006). Uma vez que *E2F1* está localizado nesta mesma região, parece ser um possível candidato. De fato, Nelson *et al* (2006) observaram que melanomas com translocações envolvendo a região 20q11 possuem alta expressão do gene *E2F1*. Os autores diminuíram a expressão de *E2F1* em linhagem de melanoma e observaram uma diminuição na formação de colônias *in vitro*. O mesmo foi observado em trabalho recentemente publicado em nosso grupo, onde foi observada uma importante diminuição da proliferação em células de glioma de rato *knockdown* para *E2f1* (Vasques *et al*, 2009).

Entretanto, estes resultados contrastam com as conclusões feitas por Humbert *et al* (2000) e Wu *et al* (2001), que sugerem que *E2f1* não possui papel central na proliferação, uma vez que a divisão celular em animais *knockout* para *E2f1* é mantida. De fato, Kong *et al* (2007) observou que outros genes da família *E2f* (*E2f2* e *E2f3*) encontram-se superexpressos em células oriundas de animais *knockout* para *E2f1*, sugerindo que a perda a longo prazo

de E2f1 é compensada por outros genes da família. Porém, estudos anteriores não demonstraram qualquer alteração na expressão de E2F2 e/ou E2F3 tanto em células HeLa, *knockdown* para E2F1 (Goto *et al*, 2006), como em células de murinos duplo-*knockout* E2f1/E2f2 (Li *et al*, 2003). O presente fato também não foi observado em células de glioma de rato *knockdown* para E2f1 (Vasques *et al*, 2009), onde não houve aumento da expressão dos genes E2f2 e E2f3. Assim sendo, estes trabalhos demonstram que ainda é controverso o papel de E2F1 no controle da proliferação celular, bem como, o efeito compensatório de outros genes da família como resposta à sua ausência.

Uma vez que pRb é a PP mais importante e está preferencialmente associada com E2F1, e que, como visto acima, é controverso seu papel na proliferação celular, a inativação de E2f1 para estudo de sua função na progressão da proliferação de células de melanoma de camundongo, tanto *in vitro* como *in vivo*, deve ser melhor estudada.

1.4 Silenciamento gênico por RNA de Interferência

1.4.1 Descoberta e utilização do RNAi

A interferência por RNA é um fenômeno que promove o silenciamento pós-transcricional através de pequenos RNAs (*small interfering RNAs* - siRNAs). Este eficiente processo de regulação gênica baseia-se na introdução de duplas fitas de RNAs (dsRNAs) em células alvo, o que leva à ativação do mecanismo do RNAi e promove a degradação do RNAm homólogo, resultando em *knockdown* da expressão de genes específicos (Cottrell *et al*, 2003; Leung *et al*, 2005; Kurreck, 2009). A interferência por RNA é um mecanismo natural e evolutivamente conservado em eucariotos, tendo por principal função a proteção do genoma contra invasões virais e elementos transponíveis (Tuschl, 2001). Em mamíferos esta função provavelmente foi perdida durante a evolução, já que não há evidências de sua ativação durante a invasão viral (Tuschl, 2001; revisto em Dillon *et al*, 2005). Para a proteção do genoma destes organismos, a resposta interferon promovendo a morte celular por

apoptose é acionada, na tentativa de impedir a disseminação do vírus (Tuschl, 2001; revisto em Kurreck, 2009).

Nos últimos anos a interferência por RNA se destacou dentre outras metodologias de inativação gênica pós-transcricional por ser uma potente ferramenta para manipulação da expressão gênica, pois atua de maneira específica (Dillon *et al*, 2005). Desta forma, os siRNAs vêm sendo amplamente utilizados para análise da função de diversos genes, tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo um método seletivo relativamente simples e rápido para o silenciamento gênico (Hall, 2004; Leung *et al*, 2005).

A interferência por RNAs foi detectada inicialmente em plantas. Observações anteriores verificaram a presença natural de fitas antisenso de RNA em diversos organismos eucariontes, mas sem compreender ainda sua função *in vivo* (revisto em Simons, 1988). Estudos subseqüentes revelaram que esses pequenos RNAs antisenso em petúnias (fig. 10A) levaram à co-supressão de genes específicos (que haviam sido inseridos para superexpressar a coloração púrpura), gerando diferentes fenótipos nas flores (Van der Krol *et al*, 1990; Napoli *et al*, 1990).

Alguns anos mais tarde, o mecanismo de ação desses RNAs foi elucidado por Andrew Fire e Craig Mello (1998), sendo a partir de então denominados RNAs interferentes. Neste trabalho, os pesquisadores utilizaram o nemátoda *C. elegans* para manipular a expressão de um gene codificante para uma proteína miofilamentosa, e investigar como acontecia o silenciamento por RNAi. Para tanto, foram observados os efeitos fenotípicos em *C. elegans* após injeções com simples ou dupla fita de RNAs (RNA senso, RNA antisenso e RNA dupla fita). Surpreendentemente, as purificações contendo RNAs simples fita apresentaram um efeito muito modesto, enquanto que as duplas fitas causaram uma interferência potente e específica (fig.10B), tanto nos nemátodos adultos como em sua progênie (Fire *et al*, 1998).

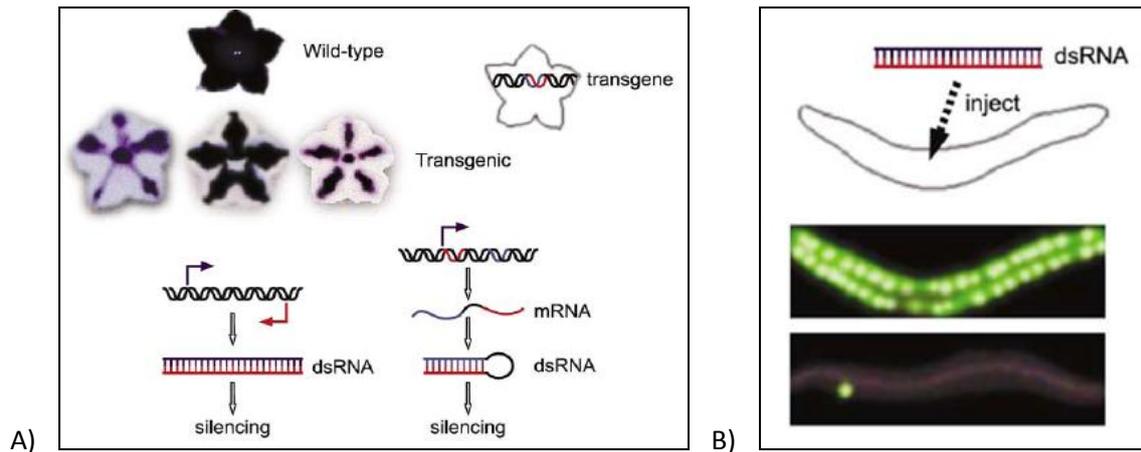


Figura 10. Representação do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) após inserção de duplas fitas de RNA (dsRNAs) em dois estudos distintos. A) Resultado da interferência por RNA em petúnias, levando à co-supressão do gene codificante para a pigmentação púrpura. Neste trabalho, realizado por Napoli *et al* (1990), o objetivo era produzir plantas transgênicas com coloração púrpura intensificada, através de superexpressão do RNAm da chalcona sintase, uma enzima responsável pela biosíntese de pigmentação. No entanto, o efeito final dessa superexpressão resultou em co-supressão, onde o fenótipo adquirido apresentou perda de coloração ao invés de intensificação. No entanto, a compreensão destes dados só foi possível alguns anos mais tarde, após a descoberta do mecanismo da via do RNAi. B) Resultado da interferência por RNA em *C. elegans*. Fire e Melo (1998) observaram que a injeção com duplas fitas de RNAs resultava em um silenciamento gênico específico, muito mais potente do que o efeito observado com a inserção de simples fitas de RNA. A inativação é adquirida com apenas algumas moléculas de dsRNAs, e pode ser observada no verme adulto e na sua progênie (adaptado de Kent *et al*, 2004).

Com seus achados, o grupo de Fire e Melo conseguiu identificar o processo e a maquinaria envolvida na interferência por RNA (fig.11), o que lhes rendeu o Prêmio Nobel em Medicina em tempo recorde, no ano de 2006.

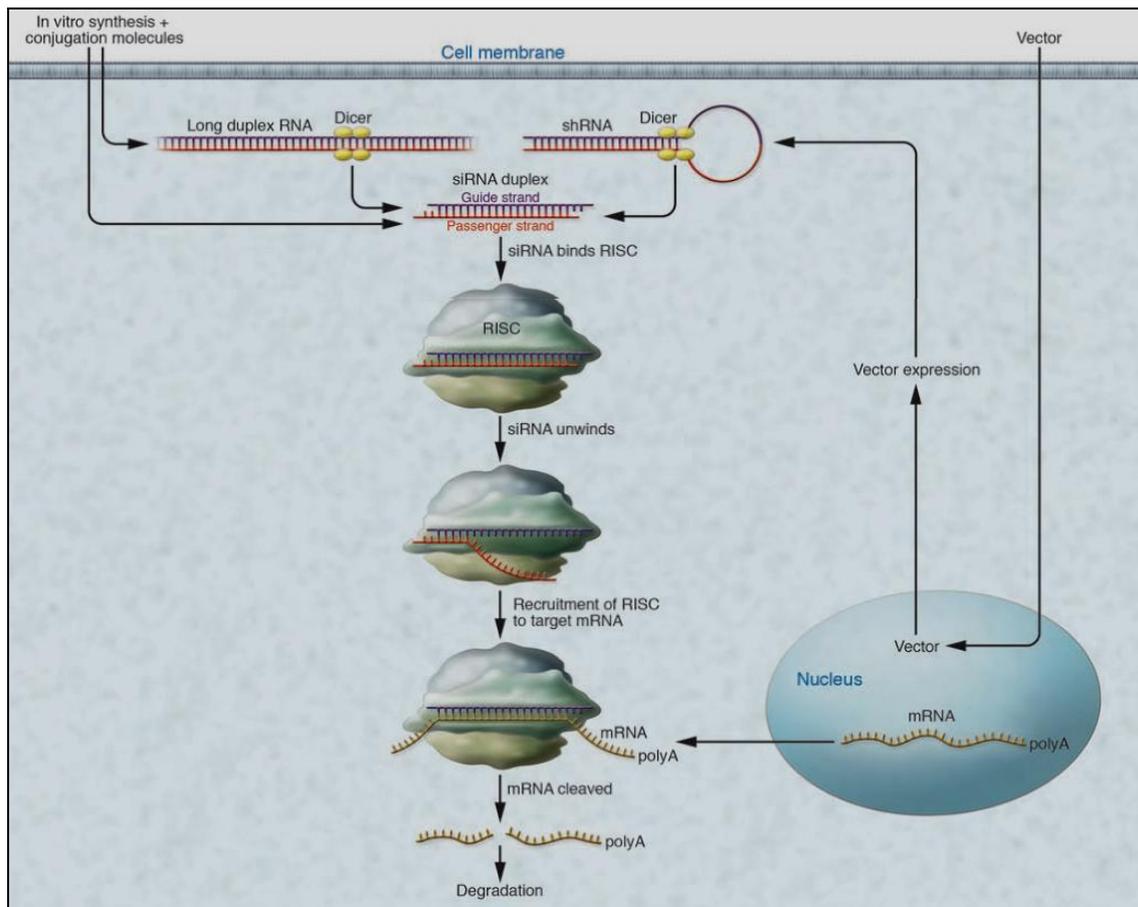


Figura 11. Mecanismo de ação do RNAi. A fita dupla longa de RNA (dsRNA) ou o shRNA (produzidos por vetores virais) são introduzidas na célula e clivadas pela enzima *Dicer*, formando os siRNAs. O siRNA liga-se então ao complexo RISC, e nele a fita sentido é clivada e degradada, enquanto que a antisenso permanece no complexo. A fita antisenso do siRNA é então exposta, permitindo o reconhecimento do RNA alvo (mRNA) por meio de complementaridade com a mesma. O mRNA é então clivado por enzimas do complexo RISC, sendo posteriormente degradado por RNases, resultando em um silenciamento gênico pós-transcricional (Grimm *et al*, 2007).

No processo do RNAi, as duplas fitas de RNA exógeno são clivadas pela enzima citoplasmática *Dicer*, que é uma endoribonuclease pertencente à família gênica das RNases III, gerando os *duplexes* de pequenos RNAs interferentes (siRNAs) de aproximadamente 21 nucleotídeos com 2 nucleotídeos desemparelhados nas extremidades 3'. Um passo anterior, que utiliza a maquinaria dos microRNAs - via prima da RNAi - é necessário para os casos específicos dos shRNAs, pois são transcritos no núcleo celular, e precisam ser exportados para o citoplasma. Isto é alcançado através da Exportina 5 e seu

co-fator Ran-GTP (Bohnsack *et al*, 2004), só então, são clivados em siRNAs pela Dicer (Shuey *et al*, 2002; He *et al*, 2004).

Os *duplexes* de siRNA são incorporados pela Dicer ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), que é constituído por ribonucleoproteínas e é responsável pela clivagem do RNAm homólogo. Os domínios helicase presentes na Dicer/RISC separam os *duplexes* de siRNA; onde a fita senso é clivada, enquanto que a antisense continua em RISC. O complexo Dicer possui também uma proteína denominada TRBP (*Transactivator RNA Binding Protein*), responsável pela incorporação do siRNA no complexo RISC (Chendrimada *et al*, 2004). Dentro do complexo RISC podemos destacar a ação da proteína Ago2, pertencente à família das Argonautas, e que contém um domínio com RNase H, sendo então a responsável pela atividade catalítica da clivagem do RNA alvo (Shuey *et al*, 2002; revisto em Kurreck, 2009).

Um fator de extrema importância é a complementaridade entre o RNA alvo e a fita antisense do siRNA; pois a clivagem só ocorrerá se esta for total. Para tanto, o complexo RISC possui um domínio, denominado PIWI, onde se inicia a ligação entre o alvo e o siRNA, numa região denominada semente (fig.12). Após extensão da complementaridade da região semente para o restante do RNAm, a Ago2 é ativada, clivando o alvo e gerando o silenciamento (Hammond, 2005).

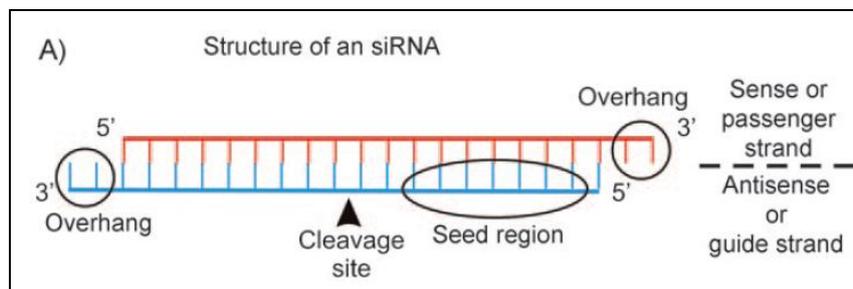


Figura 12. Representação da estrutura do duplex de siRNA e sua região semente (adaptado de Kurreck, 2009). Os siRNAs possuem uma dupla fita que contém entre 19 a 23 nucleotídeos. Esta dupla fita possui 2 nucleotídeos não emparelhados (*overhang*) na extremidade 3', enquanto que a extremidade 5' encontra-se fosforilada. A região semente compreende os nucleotídeos 2 a 8 e é de extrema importância, uma vez que é através desta que se inicia a

interação do siRNA com o RNA alvo. O sítio de clivagem representa o local onde a Ago2 exercerá sua atividade catalítica, clivando o RNAm.

Com esta grande especificidade encontrada em seu processo, a metodologia do RNA de interferência mostra-se apropriada para estudos tanto em células em cultura (Elbashir *et al*, 2001), como *in vivo* (McCaffrey *et al*, 2002; Tiscornia *et al*, 2003; revisto em Behlke, 2006), podendo ser direcionado para inativação em tecido específico. Esta ferramenta também é adequada para estudos *in vitro* que tenham por objetivo a compreensão do processo tumoral, especialmente eventos envolvidos na proliferação e na sinalização celular (Tuschl, 2001). O próprio Comitê do Prêmio Nobel destacou, em dados publicados em 2006 (fig.13), a importância da descoberta do RNA interferente e dos processos envolvidos no seu mecanismo de ação. Mais recentemente, a RNAi tem-se mostrado uma potencial estratégia para a terapia gênica (revisto em Castanotto *et al*, 2009; Kurreck, 2009).

1. O RNAi protege contra infecções virais
2. O RNAi assegura a estabilidade genômica por meio do silenciamento de elementos móveis
3. Mecanismos envolvidos ao RNAi reprimem a síntese de proteínas e regulam o desenvolvimento dos organismos
4. Mecanismos envolvidos ao RNAi mantêm a condensação da cromatina e a supressão da transcrição
5. O RNAi é uma nova ferramenta experimental que consegue silenciar genes de modo específico
6. O RNAi pode ser uma poderosa ferramenta para a Terapia gênica futura

Figura 13. Importância da descoberta do RNA de interferência (adaptado do site *The Nobel Prize in Physiology or Medicine*, seção *Advanced Information – Significance of the Discovery of RNAi*, 2006; disponível em: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/).

1.4.2 Como gerar a interferência

O primeiro passo para se gerar a interferência por RNA é a identificação e o reconhecimento da seqüência alvo, seguidos do desenho de siRNAs. Para a composição de um RNA interferente existem diversos aspectos a serem respeitados e seguidos, e o principal é que o siRNA contenha entre 19 a 23 nucleotídeos; uma vez que estudos anteriores demonstraram que duplexes de 21 nucleotídeos de RNAs reduzem a indução de resposta interferon em células de mamíferos (Elbashir *et al*, 2001; revisto em Dillon, 2005). Existem diversas ferramentas de bioinformática para auxiliar no desenho de siRNAs, fornecidos por diversas empresas do ramo, incluindo alguns softwares.

Além disso, é importante se verificar a estabilidade do siRNA adquirido. Estudos realizados por Schubert e colaboradores (2005) demonstraram que a termodinâmica presente nas duas extremidades do siRNA (3' *overhang* e 5' fosforilada) são importantes para a eficiência da inativação, e que para que a fita antisenso seja incorporada ao complexo RISC ela deve apresentar a estabilidade necessária e conseqüentemente ter acesso ao RNA-alvo. Em pesquisa recente realizada por Kurreck (2009), a inativação gênica foi muito mais efetiva com o uso da fita antisenso do siRNA, onde foi verificada a preferência da fita antisenso para incorporação ao complexo RISC, exatamente por esta obter maior estabilidade na extremidade 3' *overhang*, corroborando com os achados de anteriormente descritos.

No entanto, a entrega de siRNAs nas células alvo (fig.14) é o maior desafio para o desenvolvimento das aplicações do RNAi. Atualmente contamos com diversos métodos de entrega de siRNAs sintéticos, bem como vetores de expressão em células eucariontes direcionados para a transcrição de pequenos *hairpins* de RNA (shRNAs – *short hairpin RNAs*) através da RNA polimerase II ou RNA polimerase III, sendo este último o mais utilizado. A otimização do sistema de entrega também depende de outros fatores, como o tipo celular utilizado, a escolha do modelo *in vivo* e duração do experimento. Uma das maiores dificuldades da utilização da RNAi como ferramenta para a inativação gênica é o acesso do siRNA à região alvo na molécula de RNA, devido às suas

estruturas secundárias e terciárias. Desta forma, para garantir o silenciamento é aconselhável a seleção de três ou quatro regiões alvo, as quais devem ser validadas em cultura de células (Paul *et al*, 2002; Barton & Medzhitov, 2002; Schuey *et al*, 2002; Tiscornia *et al*, 2003; Zhang *et al*, 2005; Dillon *et al*, 2005).

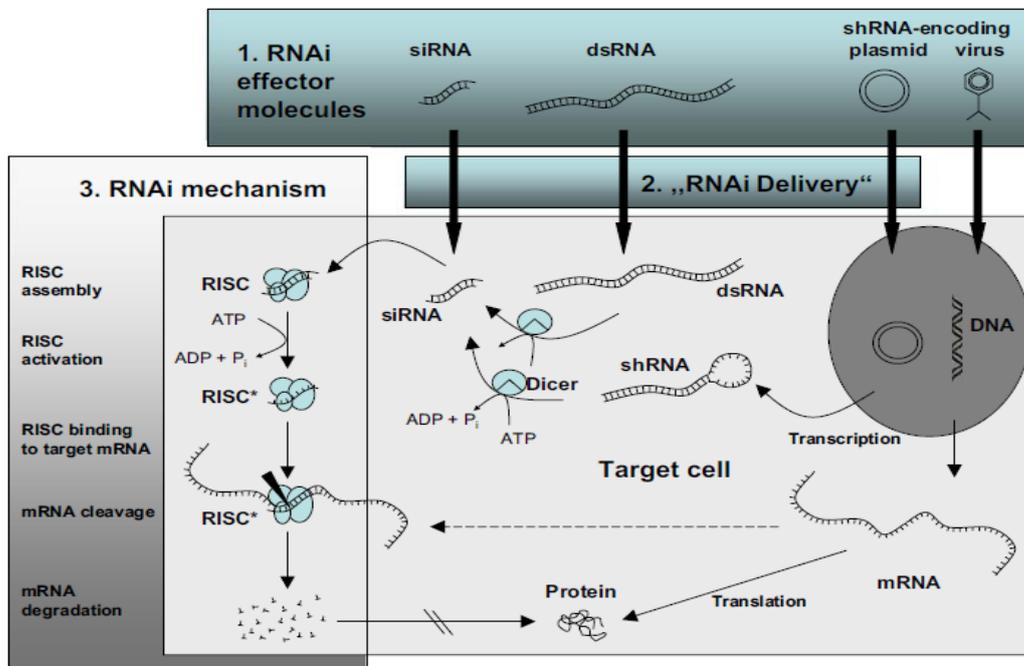


Figura 14. RNA de interferência: diferentes tipos de moléculas efectoras (siRNA, dsRNA, plasmídeo ou vetor viral) e seus sistemas de entrega, levando ao mesmo mecanismo de ação da RNAi, onde o RNA alvo é por fim clivado e degradado, promovendo assim a inativação gênica específica (Aigner *et al*, 2007).

Dentre os sistemas de entrega citados destacam-se os vetores virais, que têm sido amplamente utilizados e são significativamente mais eficientes que os demais sistemas de entrega (Hall, 2004). Para a transferência gênica em vetores virais, é necessária a remoção de parte do seu genoma, sendo este substituído por um transgene ou por um cassete de expressão de shRNAs, que então será clivado em siRNAs pela Dicer endógena (Kurreck, 2009).

1.5 Vetores virais

1.5.1 Utilização de partículas adenovirais

Vetores são veículos que facilitam a transferência de informação genética para dentro das células, podendo ser virais ou não-virais. Os vetores virais são os mais utilizados, pois são muito eficientes na transferência da informação genética (Ponder, 2001). Dentre estes, os adenovírus têm se mostrado muito populares para uso em ensaios de terapia gênica (Li *et al*, 2006), onde 23,8% dos testes clínicos em humanos utilizam este tipo de vetor (fig.15).

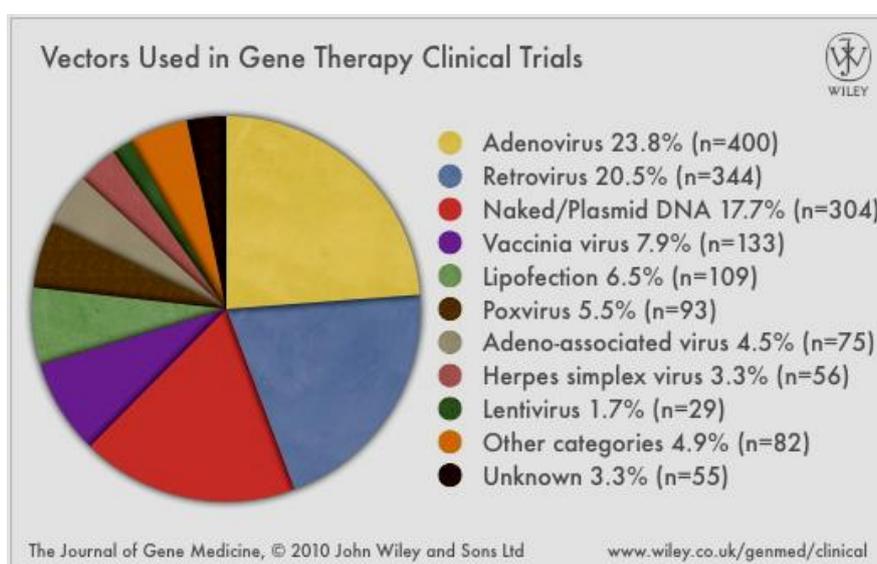


Figura 15. Índice de utilização de diferentes veículos para entrega de material genético em ensaios clínicos para Terapia Gênica no ano de 2010. Fonte: *The Journal of Gene Medicine* (disponível em: www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/).

Os adenovírus são caracterizados por possuírem tamanho entre 60 e 90 nanômetros de diâmetro e genoma composto por DNA linear de dupla fita, variando entre 30 e 40 kb (Roy-Chowdhury *et al*, 2002; Volpers *et al*, 2004). Seu genoma é dividido em dois grupos de genes, de acordo com a ordem de expressão e função gênica: o primeiro é formado por genes que codificam proteínas para a internalização e replicação viral (chamados de *early genes* ou E), e o segundo grupo consiste em genes codificadores de proteínas estruturais (*late genes* ou L). Dentre os genes E, destacam-se E1A e E1B,

responsáveis pela replicação e transcrição viral, e pela transformação da célula hospedeira, respectivamente. Por motivos de segurança tanto na manipulação, como para os fins terapêuticos, os genes E1 encontram-se deletados na primeira geração de vetores adenovirais. O gene E3 também encontra-se freqüentemente deletado em produções adenovirais, visado assim aumentar a capacidade de clonagem do transgene (Bett *et al*, 1994; Ponder *et al*, 2001), uma vez que este gene é responsável pela tradução de proteínas que modulam a resposta imune das células hospedeiras e não é essencial para a confecção e amplificação dos vetores (Roy-Chowdhury *et al*, 2002). Conseqüentemente, para sua produção é necessário o uso de linhagens celulares contendo o complemento gênico para a produção das partículas virais (linhagem HEK 293) (Graham *et al*, 1977; Roy-Chowdhury *et al*, 2002; Kurreck, 2009).

Uma vez que este sistema de entrega de material genético é bastante eficiente, e que, a interferência por RNA tem sido amplamente utilizada com sucesso, estas ferramentas estão sendo utilizadas conjuntamente, apresentando um alto nível de efetividade (Zhang *et al*, 2005; Dillon *et al*, 2005; Nelson *et al*, 2006). Além disso, diversos trabalhos indicam que o adenovírus (fig. 16) pode transduzir uma alta gama de células, induzindo o silenciamento da expressão gênica tanto *in vivo* como *in vitro* (Dillon *et al*, 2005; Halaban, 2005).

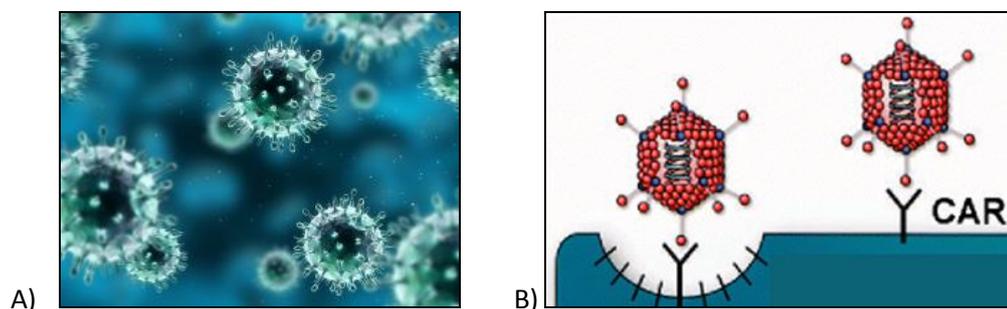


Figura 16. A) Partículas adenovirais (disponível em: www.adenovirus.com). B) Reconhecimento do adenovírus pela célula (adaptado de Khurana *et al*, 2003). Adenovírus recombinantes entram nas células através da ligação entre os receptores CAR e as proteínas virais (chamadas *knobs*). As integrinas da membrana são as proteínas responsáveis pela