**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**GENOMA FUNCIONAL E ANÁLISE *IN SILICO* NA
CARACTERIZAÇÃO E NO ISOLAMENTO DE
GENES ENVOLVIDOS EM GLIOMAS HUMANOS**

Theri Leica Degaki

Orientação: Mari Cleide Sogayar

**Tese de doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica da USP**

Depósito na SPG: 07 de Agosto de 2006
Defesa de Tese: 20 de Setembro de 2006

"Um dia uma molécula disse sim à outra molécula e nasceu a vida"

Clarice Lispector

Aos meus pais, por todo amor e apoio!

Às minhas irmãs, Karin, Carla e Karina,
pelo amor, carinho, amizade e tudo mais...

Ao Ricardo, por tudo!

Agradecimentos

À Prof^a. Mari por todos esses anos no seu laboratório, desde a iniciação científica até hoje. Pela orientação, amizade, confiança, entusiasmo e ensinamentos científicos. Por compartilhar suas experiências profissionais e pelas inúmeras oportunidades de aprendizado.

À Prof^a. Malu, pela orientação inicial durante a iniciação científica e por sempre acreditar no meu potencial. E pela amizade que perdura até hoje.

À Prof^a. Anna Carla Goldberg, por seu apoio amizade e companherismo.

Aos professores, colegas e funcionários do Instituto de Química pelo apoio, atenção e amizade.

Aos colegas do laboratório Marcos, Leonardo, André, Letícia Labriola, Antero, Karin, Luciana Cruz, Rita, Angelita, Fernanda, Ricardo Corrêa, Tatiana, Juan, Renata, Adriano, Helene, Tiago, Ana Carolina, Fernando, Matheo, Flavia, Humberto, Graça, Ícaro, Tatiane, Luciana Gomes, Daniel, Cristiane, Gustavo, Marina, Leticia Terra e Gisella.

Aos técnicos do laboratório Ricardo, Patricia, Zizi, Rafael, Débora, Dona Helena, Isnar e Sandra.

Aos amigos que já deixaram o laboratório, Katlin, Mario, Beth, Sylvia, Tatiana, Renato Puga, Jean, Wagner, Ana Paula, Diana, Sheila, Christian e Gabi.

À turma “antiga” do laboratório: Maki, Léo, FeOrtis, Alexandre, LuHe, Malu, Mário, Renato, Cleber, Áurea, Roberto.

Aos amigos Wagner Montor, Fernando Abdulkader, Marcos Demasi, Fernanda Festa, Leonardo Rodrigues, Fernanda Ortis, Karin Krogh, Sheila Winnischofer, Rita Figueira e Gabriela Bomfim.

À Fernanda Festa minha primeira e única aluna de iniciação científica.

Às pessoas com qual tive o prazer de trabalhar e conviver mais diretamente, compartilhando momentos de muita descontração: Wagner, Gabi (Pipoca), Fernanda, Leo, Rita, Leticia e Karin.

Ao Fernando, Marcos e, principalmente, Fernanda Festa pelas revisões da tese: muito obrigada!

Às pessoas que passaram pelo laboratório: Gisele Peters, Mariana Callero, Ryan Driskel.

Apoio Financeiro

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos

PRP-USP – Pró-Reitora de Pesquisa da USP

Índice Geral

1.	Introdução	18
1.1.	Gliomas	18
1.2.	Terapias disponíveis para gliomas	22
1.3.	Modelo celular ST1	23
1.4.	Análise funcional de NRP/B na reversão fenotípica das células ST1 promovidas por GCs.	25
1.5.	Busca de genes associados com tumores do sistema nervoso central humano	29
2.	Objetivos	35
2.1.	Objetivos Gerais	35
2.2.	Objetivos Específicos	35
3.	Materiais e Métodos	36
3.1.	Materiais	36
3.2.	Métodos	43
4.	Resultados	71
4.1.	Isolamento e Identificação do cDNA correspondente ao transcrito completo de NPRB de rato e descrição da sua estrutura genômica.	71
4.2.	Expressão de NRP/B em células ST1 e em outros tecidos de rato	80
4.3.	Análise Funcional de NRP/B em células ST1 – Superexpressão de NRP/B de rato em células ST1	87
4.4.	Análise Funcional de NRP/B em células ST1 – Silenciamento de NRP/B de rato em células ST1	105
4.5.	Avaliação do papel de NRP/B na progressão do ciclo celular – resultados preliminares	114
4.6.	Avaliação da expressão de NPRB em tecidos humanos	115
4.7.	Identificação de putativos genes associados com tumores do sistema nervoso central.	119
5.	Discussão	159
5.1.	Clonagem e descrição do transcrito completo de NRP/B de rato	159
5.2.	Expressão de NRP/B em células ST1 e em outros tecidos de rato	160
5.3.	Análise funcional de NRP/B	162
5.4.	Considerações Finais	169
5.5.	Identificação de genes putativamente associados com tumores do sistema nervoso central e avaliação de expressão em linhagens e amostras clínicas de glioma humano.	171
6.	Conclusões	185
7.	Bibliografia	188

Índice de Figuras

Figura 1: Amplificação do cDNA completo de NRP/B de rato.	71
Figura 2: Confirmação da clonagem de r-NRP/B no vetor pENTR2B por digestão com enzimas de restrição.	72
Figura 3: PCR de colônia dos fragmentos de NRP/B sonificados.	73
Figura 4: Alinhamento dos 4 <i>contigs</i> (Contigs 3, 4, 5 e 6) originados da montagem da sequência do cDNA correspondente ao transcrito completo de NRP/B de rato na sequência do genoma de rato pelo Programa BLAT (http://genome.ucsc.edu).	74
Figura 5: Sequência do transcrito completo de NRP/B de rato.	75
Figura 6: Determinação da fase aberta de leitura de NRP/B de rato através do Programa <i>ORF Finder</i> do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orf).	76
Figura 7: Identificação do gene NRP/B de rato.	77
Figura 8: Alinhamento da sequência de NRP/B de rato (gi50347091) com seus ortólogos no Programa Clustal W (1.85).	78
Figura 9: Depósito do gene completo de NRP/B de rato no Genbank (NCBI).	79
Figura 10: Ensaios de Northern e Western blot para análise da expressão de NRP/B em células ST1 sob tratamento com hormônio glicocorticóide Hidrocortisona (Hy). ...	81
Figura 11: Ensaio de Western blot para análise da expressão de NRP/B em extratos citoplasmáticos e nucleares de células ST1 sob tratamento com o hormônio glicocorticóide hidrocortisona (Hy).	83
Figura 12: Localização sub-celular de NRP/B.	85
Figura 13: Padrão de expressão de NRP/B em diferentes tecidos de rato.	86
Figura 14: Amplificação da região codificante de r-NRP/B e vetores utilizados para clonagem.	87
Figura 15: Clonagem e confirmação de clonagem da região codificante de NRP/B em vetor pLPCX de expressão em células de mamífero e no vetor de entrada do Sistema Gateway pENTR2B.	88
Figura 16: Células ST1 transduzidas com retrovírus contendo a construção pLPCX-EGFP em microscópio de contraste de fase invertido fluorescente.	91
Figura 17: Morfologia celular das populações de células ST1 infectadas com retrovírus contendo as construções: pLPCX, pLPCX-NRP/B e pLPCX-EGFP.	92
Figura 18: Ensaio de Northern blot para confirmação da superexpressão de NRP/B em células ST1.	93
Figura 19: Ensaio de Q-PCR para confirmação da superexpressão de NRP/B em células ST1.	94
Figura 20: Ensaio de Western blot para confirmação da superexpressão de NRP/B em células ST1.	95
Figura 21: Ensaio de imunofluorescência para confirmação da superexpressão de NRP/B em células ST1.	96
Figura 22: Gráfico do ensaio de citometria de fluxo para avaliação do padrão de distribuição no ciclo celular das células ST1 parentais e transduzidas com retrovírus contendo vetor vazio ou a construção pLPCX-EGFP.	97
Figura 23: Curvas de Crescimento das células ST1 e das populações ST1-pLPCX, ST1-EGFP e ST1-NRP/B.	99
Figura 24: Crescimento em suspensão de agarose das células ST1 e das populações ST1-pLPCX e ST1-NRP/B.	100
Figura 25: Gráfico de Crescimento em suspensão de agarose das células ST1, ST1 pLPCX e ST1 NRP/B.	101
Figura 26: Ensaio de tumorigênese <i>in vivo</i>	103
Figura 27: Ensaio de imunohistoquímica nos tumores formados no subcutâneo de camundongos nude.	104
Figura 28: Produção de lentivírus em células empacotadoras 293T.	107
Figura 29: Titulação dos lentivírus em células 293T.	108

Figura 30: Células ST1 transduzidas com lentivírus.	109
Figura 31: Quantificação da expressão relativa de NRP/B por PCR quantitativo.	110
Figura 32: Quantificação da expressão relativa de NRP/B nas células carenciadas para soro por 24h e tratadas com hormônio hidrocortisona (Hy) por diferentes períodos.	111
Figura 33: Gráficos de ensaio de citometria de fluxo para avaliação do padrão de distribuição no ciclo celular (fases G0-G1/ G2-M/ S) das células ST1 parentais e transduzidas com lentivirus contendo siNRP/B (271, 761 e 956).....	112
Figura 34: Quantificação da expressão relativa de NRP/B por PCR quantitativo.	113
Figura 35: Análise da expressão de NRP/B durante a progressão no ciclo celular. ..	114
Figura 36: Análise por citometria de fluxo do padrão de distribuição no ciclo celular das células parentais ST1 e da população transduzida com as construções de RNAi de NRP/B denominada ST1-siRNANRP/B triploB.....	115
Figura 37 : Avaliação da expressão de mRNA de NRP/B em tecidos humanos através de PCR quantitativo.....	118
Figura 38: Vias genéticas para desenvolvimento de glioblastoma multiforme.	120
Figura 39: Região cromossômica no cromossomo 22 associada com progressão tumoral de astrocitomas.	121
Figura 40: Classificação no <i>Gene Ontology</i> das 21 seqüências <i>Full length</i> localizadas no cromossomo 22 humano.	128
Figura 41: Classificação no <i>Gene Ontology</i> dos genes diferencialmente expressos entre a linhagem ST1 e P7, localizados no cromossomo 22 humano.....	135
Figura 42: Análise de expressão gênica das ESTs em linhagens celulares de glioma humano.....	139
Figura 43: Análise de expressão gênica das seqüências <i>Full length</i> em linhagens celulares de glioma humano.....	142
Figura 44: Análise de expressão gênica de genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano.	145
Figura 45: Análise de expressão gênica das seqüências de ESTs em amostras clínicas de gliomas humanos e controle de cérebro não tumoral.....	149
Figura 46: Análise de expressão gênica das seqüências <i>Full length</i> em amostras clínicas de gliomas humanos e controle de cérebro não tumoral.....	153
Figura 47: Análise de expressão gênica de genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano em amostras clínicas de gliomas humanos e controle de cérebro não tumoral.....	157

Índice de Tabelas

Tabela 1. Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.	45
Tabela 2. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de Real Time PCR.....	60
Tabela 3: Crescimento tumoral de células ST1 em camundongos <i>nude</i> (via subcutânea).....	102
Tabela 4: Contigs e seus respectivos clones genômicos localizados na região entre os marcadores D22S282 e D221169 no cromossomo 22.....	122
Tabela 5: ESTs mapeadas na região 22q13.31 a 22q13.33 através do Banco de Dados do Transcriptoma Humano.	124
Tabela 6: Sequências full length de cDNA completos mapeados na região 22q13.31 a 22q13.33 através do Banco de Dados do Transcriptoma Humano.....	127
Tabela 7: Genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano.	134
Tabela 8: Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em linhagens celulares de glioma humano das ESTs.	140
Tabela 9: Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em linhagens celulares de glioma humano das sequências <i>Full length</i>	143
Tabela 10: Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em linhagens celulares de glioma humano de genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano.	146
Tabela 11: Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em amostras clínicas de gliomas humanos das ESTs.	150
Tabela 12: Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em amostras clínicas de glioma humano das sequências <i>Full length</i>	155
Tabela 13 : Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em amostras clínicas de glioma humano de genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano.	158

Lista de Abreviaturas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
36B4	Fosfoproteína ribossomal ácida
Abs	Absorbância
ATXN10	ataxin 10
BSA	Albumina de soro bovino
BZRP	<i>benzodiazapine receptor (peripheral)</i>
C	Controle
C22orf23	<i>chromosome 22 open reading frame 23</i>
CDKN	<i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor</i>
cDNA	DNA complementar
CELSR1	<i>cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila)</i>
CERK	<i>ceramide kinase</i>
CYC	ciclina
Da	Dalton
DIP	<i>death-inducing-protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>
EP300	<i>E1A binding protein p300</i>
ERBB2	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i>
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAM118A	<i>family with sequence similarity 118, member A</i>
FBLN1	<i>fibulin 1</i>
FLJ20699	<i>hypothetical protein FLJ20699</i>
FLJ23588	<i>CAP-binding protein complex interacting protein 1 (FLJ23588)</i>
FLJ27365	<i>FLJ27365 protein</i>

GAB4	<i>GRB2-associated binding protein family, member 4</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC	glicocorticóide
gDNA	DNA genômico
GRE	Elemento responsivo a glicocorticóide
GTSE1	<i>G-2 and S-phase expressed 1</i>
HMOX1	Heme oxigenase
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferase
Hy	Hidrocortisona
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Meio de Luria-Bertani
LIM-15	Laboratório de Investigação Médica - FMUSP - laboratório 15
LOH	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
MDM2	<i>transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)</i>
MYO18B	<i>myosin XVIII B</i>
mL	mililitros
MMP	Metaloproteinases de matriz
MKL1	<i>megakaryoblastic leukemia (translocation) 1</i>
MKP-1	<i>Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-1</i>
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propanossulfônico
mRNA	RNA mensageiro
NF2	<i>neurofibromin 2</i>
NPTXR	<i>neuronal pentraxin receptor</i>
NRP/B	<i>Nuclear restrict protein in brain</i>
NTC	<i>Non-Template Control</i>
NUP50	<i>nucleoporin 50kDa</i>
OD	Densidade óptica
pRB	<i>Retinoblastoma protein 1</i>
p53	<i>Tumor Protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)</i>
PARVG	<i>parvin, gamma</i>
pb	pares de base
PBSA	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>
PIM3	<i>pim-3 oncogene</i>
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PKDREJ	<i>polycystic kidney disease (polycystin) and REJ (sperm receptor for egg jelly homolog, sea urchin)-like</i>

PM	Peso molecular
PNPLA3	<i>patatin-like phospholipase domain containing 3</i>
PPARA	<i>peroxisome proliferative activated receptor, alpha</i>
PPM1F	<i>protein phosphatase 1F</i>
PRR5	<i>proline rich 5 (renal)</i>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
Q-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RABL4	<i>RAB, member of RAS oncogene family-like 4</i>
RIBC2	<i>RIB43A domain with coiled-coils 2</i>
RNA	Ácido ribonucléico
Rnase	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	<i>Reverse Transcription PCR</i>
SAMM50	<i>sorting and assembly machinery component 50 homolog (S. cerevisiae)</i>
SDF2L1	<i>stromal cell-derived factor 2-like 1</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Eletroforesis</i>
SEC14L2	<i>SEC14-like 2 (S. cerevisiae)</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SOX10	<i>SRY (sex determining region Y) box 10</i>
SSC	Solução Salina contendo citrato de sódio
SULT4A1	<i>Sulfotransferase family 4A, member 1 (SULT4A1)</i>
SYNGR1	<i>synaptogyrin 1</i>
TBC1D22A	<i>TBC1 domain family, member 22A</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline Tween 20</i>
TCF20	<i>transcription factor 20</i>
TE	Tris-EDTA
TIMP	Inibidor tecidual de MMPs
TIMP3	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases-3</i>
TOB2	<i>transducer of ERBB2, 2</i>
TOM1	<i>target of myb1</i>
TRMU	<i>tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase</i>
TST	<i>thiosulfate sulfurtransferase</i>
YWHAH	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide</i>

Resumo

São poucos os avanços obtidos em intervenções cirúrgicas ou terapias para melhora na qualidade de vida e/ou prognósticos dos pacientes acometidos por gliomas, que são os tumores mais comuns e fatais que acometem o sistema nervoso central.

O modelo celular ST1 de glioma de rato responde ao tratamento com hormônio glicocorticóide (GC) com uma reversão fenotípica tumoral-normal *in vitro* e *in vivo* e o modelo celular P7 é resistente a este tratamento. Ambas as linhagens são utilizadas, no laboratório, como modelos de estudo de genes associados à origem de neoplasias e controle de proliferação celular, com potenciais aplicações na doença humana.

Este trabalho possui dois objetivos gerais: a) clonagem e caracterização funcional do gene NRP/B de rato, previamente descrito no laboratório como sendo induzido durante o tratamento das células ST1 com GC; b) identificação de genes humanos no *locus* 22q13, frequentemente deletado e associado à progressão tumoral de gliomas.

A identificação, clonagem e determinação da seqüência completa de NRP/B de rato, até então desconhecida, foi realizada neste trabalho e depositada no GenBank (número de acesso AY669396). Sua expressão parece ser cérebro-específica, sendo modulada positivamente durante o tratamento com GC nas células ST1. A superexpressão de NRP/B em células ST1 foi realizada para avaliar o papel do gene na reversão fenotípica tumoral-normal induzida por GC. Os resultados obtidos sugerem que NRP/B provoca diminuição da capacidade de crescimento independente de ancoragem em meio semi-sólido e do potencial tumorigênico das células ST1 em ensaios de tumorigênese *in vivo*. Experimentos preliminares sugerem o envolvimento da expressão de NRP/B no processo de progressão celular e em tumores humanos cerebrais e de mama.

Para a identificação de genes humanos no *locus* 22q13 associados ao desenvolvimento de gliomas, foram adotadas duas estratégias: utilização do Banco de Dados do Transcriptoma para identificação de mRNAs e ESTs alinhadas no *locus* associado ao câncer cerebral 22q13 e utilização dos dados de genes localizados no cromossomo 22 diferencialmente expressos em

microarrays entre as linhagens ST1 e P7, ambas tratadas com GC. Como resultado da análise *in silico*, foram selecionados alguns genes para análise por Q-PCR em linhagens celulares e amostras clínicas de gliomas humanos, o que evidenciou a existência de algumas correlações positivas ao nível transcricional entre os genes. Três genes (KIAA1644, SULT4A1 e PARVG) apresentaram maior expressão em amostras clínicas de cérebro não-tumoral quando comparadas com amostras de gliomas, o que sugere um possível envolvimento destes na progressão de gliomas humanos.

A caracterização dos alvos moleculares na ação dos genes analisados neste estudo é importante para melhor entendimento dos mecanismos moleculares que controlam a proliferação celular e, futuramente, para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para estes tumores cerebrais.

Abstract

Gliomas are the most fatal central nervous system tumors and to date, satisfactory results from chemotherapies or surgical interventions are still not available.

The ST1 rat glioma cell line is hyper-responsive to treatment with glucocorticoids (GC), undergoing a complete tumoral to normal phenotypic reversion, both *in vitro* and *in vivo*. The P7 glioma cell line is resistant to the action of GC. Both cell models are used in our lab to search for targets which are important to understand the origin of tumors and the control of cell proliferation.

For the present study, we aimed at: a) cloning and functional characterization of the rat NRP/B gene, which had previously been identified as being induced during GC-treatment of the ST1 cells; b) identification of human genes located at the 22q13 locus, known to be involved in gliomagenesis.

The previously unknown cDNA for rat NRP/B was identified, cloned, sequenced, and deposited in the GenBank (Acc. N° AY669396). It displays brain-specific expression and positive modulation during GC treatment of ST1 cells. The role of NRP/B in the tumoral to normal phenotypic reversion induced by GC was analyzed by its overexpression in ST1 cells. The results suggest that induction of NRP/B partially impairs cell growth in semi-solid substrate and lowers its tumorigenic potential *in vivo*. Preliminary studies suggest that NRP/B expression is involved in cell cycle progression and in brain and human breast tumors.

To identify additional human genes located in the glioma-related 22q13 locus, two strategies were used: a) analysis of the Ludwig - Fapesp Transcriptome Project database to identify mRNAs and ESTs that align to the referred locus and b) analysis of microarray data of differentially expressed genes in ST1 and P7 cells (both treated with GC) that also localize in chromosome 22. To validate the *in silico* analysis, Q-PCR was used to evaluate the expression of several genes in human brain tumor cell lines and clinical samples, being possible to find some positive correlations between genes at the transcriptional level. Three genes (KIAA1644, SULT4A1 e PARVG) displayed significantly higher expression levels in non-tumoral clinical samples, when

compared to their tumor counterparts suggesting their involvement in human glioma progression.

A better understanding of the molecular mechanisms by which these genes are involved may contribute with important information to understand the control of cell proliferation and may lead, in the future, to the development of new therapeutical strategies for brain cancer therapy and diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gliomas

O tecido cerebral é composto por dois tipos celulares, os neurônios e a glia. A grande importância da glia para a função cerebral é evidenciada pelo seu aumento percentual durante a evolução, constituindo 25%, 65% e 90% do total de células do tecido cerebral em, respectivamente, drosófila, roedores e humanos (Pfrieger & Barres, 1995). A glia é composta por diversos tipos celulares (50% astrócitos, 40% oligodendrócitos, 5% ependimócitos e 5% microglia), desempenhando função de suporte estrutural (Bloom, 1994), regeneração (Gimenez y Ribotta et al., 2001), desenvolvimento neuronal no Sistema Nervoso Central (SNC) (Noctor et al., 2001) e apresentando capacidade de comunicação através das redes gliais (Kast, 2001).

Dentre os tumores que acometem o SNC, os tumores da neuroglia, chamados genericamente de gliomas, são os mais frequentes e fatais. (Akbasak & Sunar-Akbasak, 1992), podendo ser de origem astrocítica, oligodendroglial ou ependimal (Watkins et al., 1996). Os glioblastomas são mais comuns e malignos, representando pelo menos 70% dos gliomas malignos que afetam adultos, enquanto oligodendrogliomas e oligoastrocitomas representam cerca de 5 e 15% cada um (Louis & Gusella, 1995). Mundialmente, aproximadamente 189 mil casos de câncer do SNC são diagnosticados por ano, com uma taxa de mortalidade estimada em 141 mil pacientes (Parkin et al., 2001; Parkin et al., 2005). São poucos os avanços obtidos em terapias ou intervenções cirúrgicas para melhora dos pacientes acometidos por estes tumores (Galanis et al., 1998; Leenstra et al., 1998).

Os estados de pré-malignidade são assintomáticos, não sendo detectados. Assim, sabe-se pouco sobre os pré-eventos da oncogênese. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os gliomas de acordo com sua linha de diferenciação, ou seja, se possui características de astrócitos, oligodendroglial ou ependimal. Em seguida, são classificados em escala de I a IV, de acordo com o grau de malignidade, dado por várias características histológicas correlacionadas com a evolução clínica dos pacientes portadores do tumor (Behin et al., 2003; Collins, 2004; Kleihues & Sobin, 2000). Os astrocitomas de

grau I (astrocitoma pilocítico) são biologicamente benignos e podem ser curados se a extirpação cirúrgica ocorrer logo após o diagnóstico. Normalmente de ocorrência na infância, apresentam prognóstico muito bom, por constituírem astrocitomas de menor grau de malignidade e de crescimento lento. Já os astrocitomas de grau II (astrocitoma difuso) nem sempre são curados por remoção cirúrgica, e o prognóstico do paciente (normalmente em idade média avançada) depende da manutenção das características diferenciadas do tumor. Cerca de 70% dos astrocitomas difusos se transformam em astrocitomas grau III e IV após 5 a 10 anos do diagnóstico. Estes são chamados de glioblastomas secundários, sendo que os glioblastomas sem evidências clínicas e histopatológicas prévias, são denominados glioblastomas primários ou *de novo* (Kleihues & Sobin, 2000). Os astrocitomas de grau III e IV (astrocitomas anaplásicos e glioblastoma multiforme ou GBM, respectivamente) são tumores mais agressivos, altamente invasivos, neurologicamente destrutivos e incuráveis, sendo que astrocitomas anaplásicos são letais depois de alguns anos após o diagnóstico (incidência entre 25 a 50 anos de idade). Os glioblastomas levam à letalidade em menos de um ano (pico de incidência entre 45 e 70 anos de idade). A natureza invasiva destes tumores de maior grau de malignidade promove a infiltração de células cancerosas no cérebro, impossibilitando a cura mesmo em locais onde a remoção cirúrgica seja possível (Behin et al., 2003; Collins, 1998; Maher et al., 2001).

Anormalidades genéticas envolvidas na formação e progressão de tumores estão mais bem caracterizadas nos tumores astrocíticos. Em astrocitomas de baixo grau de malignidade (normalmente, em astrocitomas grau II), observa-se perda de heterozigose (LOH – *loss of heterozygosity*) no cromossomo 17p e mutações no gene supressor de tumor *TP53*, que codifica um fator de transcrição (*p53*) que regula o ciclo celular, reparo de DNA e apoptose em resposta a estresse celular (Louis et al., 2001). Na ausência de mutações, a função de *p53* pode estar alterada por mecanismos indiretos, como por exemplo, inativação de *p14^{ARF}*, um importante regulador positivo de *p53*, através da inibição transcricional (hipermetilação do promotor) ou protéica (degradação) (Nakamura et al., 2001b). Uma outra anomalia normalmente encontrada em astrocitomas de grau II é a superexpressão do fator de

crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e de seu receptor (PDGFR), o que resulta na ativação autócrina de vias subseqüentes, como a via de *Ras* (Maher et al., 2001). Tais alterações também são encontradas nos outros graus de astrocitomas, sugerindo que a superexpressão de PDGF e PDGFR seja importante no início da patogênese de astrocitomas (Hermanson et al., 1992). Existem outras alterações cromossômicas presentes nos astrocitomas de baixo grau, incluindo ganho de função no cromossomo 7, e perda de função nos cromossomos 22q, 13q, 10p e nos cromossomos sexuais (Cavaliere et al., 2005; Ichimura et al., 2000; Wessels et al., 2002).

Em astrocitomas anaplásicos (grau III), mutações no gene *TP53* também são encontradas com a mesma freqüência (~60%) observada em astrocitomas de grau II. Várias técnicas genéticas moleculares mostram perda de alelos nos cromossomos 6q, 17p, 19q e 22q em astrocitomas de grau III (Collins, 2004). Cerca de 20% dos astrocitomas anaplásicos possuem anormalidades genéticas semelhantes aos glioblastomas, envolvendo componentes da via de *p53* (*MDM2* e *p14^{ARF}*) e da via de *pRB* (Collins, 2004; Ichimura et al., 1996). Dentre as alterações genéticas mais encontradas em GBMs estão a ausência de *p53* selvagem ou *p14^{ARF}*, ou superexpressão de *MDM2* (inibidor de *p53*) (Ichimura et al., 2000; Nakamura et al., 2001a) e inativação do gene retinoblastoma (*pRb*) (Nakamura et al., 2001c). A proteína *pRb* é regulada por fosforilação; assim, quando hipofosforilada, seqüestra o fator de transcrição *E2F*. A perda da funcionalidade de *pRb* selvagem resulta na proteína não funcional, e, conseqüentemente, na liberação de *E2F*, o qual promove a expressão de genes envolvidos com a progressão no ciclo celular. A proteína *p16^{INK3A}* é um inibidor do complexo *CYC/CDK4* e 6, que catalisa a fosforilação e inibição de *pRb* (Sherr & Roberts, 1999). A fosforilação inapropriada de *pRb* é resultante da perda da expressão de *p16^{INK3A}* ou superexpressão de *CDK4*, anormalidades normalmente encontradas em 90% dos glioblastomas (Behin et al., 2003; Ichimura et al., 2000). Além das alterações nas vias de *p53* e *pRb*, mais de 90% dos GBMs apresentam perda de alelos no cromossomo 10q, onde se encontra o gene supressor de tumor *PTEN/MMAC1/TEP1*, normalmente mutado em 45% dos GBMs. O fosfatidilinositol trifosfato (*PIP3*) é o maior substrato de *PTEN*, e a perda de controle do grau de fosforilação de *PIP3* provoca ativação contínua da via de *Akt* (Holland et al., 2000; Ichimura et

al., 2000; Li et al., 1997; Myers et al., 1998). A amplificação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) é encontrada em 35% dos GBMs, podendo ocorrer devido à superexpressão do gene ou de rearranjo do gene, que origina um transcrito aberrante de EGFR, o qual é constitutivamente ativado, podendo ser um alvo potencial para tratamento destes tumores (Mischel & Cloughesy, 2003; Nishikawa et al., 1994). Altos níveis de expressão de ligantes e receptores de PDGF também são observados em tumores astrocíticos de elevado grau de malignidade, sugerindo a presença de alças autócrinas (Lokker et al., 2002).

Os glioblastomas multiformes (grau IV) podem ser de origem primária (*de novo* glioblastoma) ou secundária (tumor que evolui de astrocitomas grau II e III). Os GBMs secundários são bem menos freqüentes e muito pouco estudados (Reifenberger et al., 1996). Análises recentes têm demonstrado que os GBMs primários e secundários se desenvolvem por vias genéticas diferentes (Liang et al., 1994; von Deimling et al., 1993; Watanabe et al., 1996). Os GBM primários ocorrem, principalmente, em pacientes mais idosos, sendo caracterizados por superexpressão/amplificação de *EGFR*, mutação em *PTEN*, deleção homozigótica de *p16^{INK4a}* e perda de heterozigose no cromossomo 10 (Fujisawa et al., 2000; Tohma et al., 1998; Watanabe et al., 1996). Já os GBMs secundários se desenvolvem em pacientes mais jovens, e, normalmente, apresentam mutações em *p53*, LOH predominantemente nos cromossomos 10q e 19q (Fujisawa et al., 2000; Nakamura et al., 2000; Tohma et al., 1998; Watanabe et al., 1996) e metilação do promotor de *pRB* (Nakamura et al., 2001c).

A perda de heterozigose em 10q não é somente a alteração genética mais freqüente em GBMs, como, também, está presente juntamente com outras alterações genéticas (Ohgaki et al., 2004). Ao contrário, mutações em *TP53*, deleções de *p16^{INK4a}*, amplificação de *EGFR* e mutações em *PTEN* mostram associações inversas entre si, exceto pela correlação positiva entre deleção de *P16^{INK4a}* e amplificação de *EGFR*. Tais observações sugerem que LOH em 10q e pelo menos mais uma ou duas outras alterações genéticas podem contribuir para o desenvolvimento da maioria dos glioblastomas (Ohgaki, 2005; Smith et al., 2001).

1.2. Terapias disponíveis para gliomas

Apesar dos avanços recentes de cirurgia, radio e quimioterapia, ainda não há uma terapia realmente efetiva para o tratamento de gliomas. Devido à complexidade dos gliomas, há a necessidade de um estudo multidisciplinar para integrar todas as informações e compreender melhor os mecanismos celulares e genéticos que estão envolvidos na biologia deste tipo de tumor (Maher et al., 2001).

Devido ao envolvimento dos fatores de crescimento, como EGF e PDGF, está sendo testada nos gliomas uma abordagem utilizando-se inibidores terapêuticos que interferem na função dos receptores de PDGF (PDGFR), denominado Imatinib (Gleevec®) ou de EGFR, denominados Gefinitib e Erlotinib (Iressa® e Tarceva®, respectivamente), os quais têm apresentado resultados preliminares promissores para tumores incuráveis até o momento (Kesari et al., 2005; Sawyers, 2004).

Outra abordagem terapêutica consiste na utilização de compostos que atuem no restabelecimento de vias inibitórias de proliferação associada à diferenciação celular, como, por exemplo, o ácido retinóico e seus derivados, que são utilizados como agentes terapêuticos em cânceres hematológicos (Altucci & Gronemeyer, 2001). A indução de diferenciação poderia inibir a capacidade migratória (associada ao estado indiferenciado) e diminuir o comportamento invasivo de gliomas (Schmidt et al., 2000; See et al., 2004). Os retinóides foram primeiramente testados em diversas linhagens de gliomas com resultados animadores de inibição de crescimento em monocamada e em suspensão (Bouterfa et al., 2000), mas, na clínica, os resultados não foram animadores, principalmente pelo aparecimento de efeitos adversos e resistência (Defer et al., 1997; Wismeth et al., 2004).

Devido à capacidade de interferir com o potencial proliferativo das células tumorais, outros agentes são rotineiramente utilizados para pacientes de tumores cerebrais, como os hormônios glicocorticóides (GCs) (Nahaczewski et al., 2004). Foi demonstrado que dexametasona, um derivado do hormônio glicocorticóide, promove a inibição da proliferação de linhagens celulares de glioblastomas humanos (Kaup et al., 2001). Os hormônios GCs são produzidos na glândula adrenal, sendo utilizados na terapia de gliomas para diminuição de

edema e dos efeitos colaterais da radioterapia (Freshney, 1984; Koehler, 1995), além de apresentarem capacidade antineoplásica (Kaup et al., 2001). O efeito antiproliferativo de GC está bem caracterizado em células epiteliais mamárias e de fígado (Ramos et al., 1999), sendo utilizado também na clínica no tratamento de leucemias agudas (Addeo et al., 2004).

Os hormônios glicocorticóides, ao contrário dos hormônios peptídicos que possuem receptores na membrana plasmática, possuem receptores intracelulares que permanecem no citoplasma devido à ligação com a proteína HSP-90 (*Heat Shock Protein-90*). Quando o hormônio se liga ao receptor, a interação com HSP-90 é desfeita, expondo as seqüências de localização nuclear e permitindo que o complexo hormônio-receptor migre para o núcleo, onde se liga a elementos ativadores da transcrição, denominados GREs (*glucocorticoid responsive elements*) presentes nas regiões regulatórias de diferentes genes responsivos à glicocorticóides, resultando em uma alteração da transcrição (Picard et al., 1990; Yamamoto, 1985). O efeito de GCs de suprimir o crescimento celular, de modo geral, ocorre por cascatas celulares, onde a inibição ou ativação de genes de resposta primária, mediada direta ou indiretamente pela ligação do complexo GR-GC aos GREs, regulam a transcrição e/ou atividade de um conjunto de genes, incluindo fatores importantes para a progressão no ciclo celular (Cha et al., 1998).

Em nosso laboratório, as células ST1 de glioma de rato, descritas no próximo item, são utilizadas como modelo de estudo das bases moleculares da ação de hormônios glicocorticóides como agentes anti-tumorais.

1.3. Modelo celular ST1

A utilização de modelos de outros organismos para o estudo de gliomas humanos é de grande importância em todos os estágios das pesquisas sobre os aspectos moleculares envolvidos nas alterações celulares, já que estes modelos são sistemas controlados e com menor variação, assim permitem avaliar a função de potenciais alvos terapêuticos (Hesselager & Holland, 2003). Os modelos de tumores cerebrais de rato são os mais utilizados entre todos os modelos animais utilizados para pesquisa sobre gliomas (Gill et al., 1989), e tem fornecido vasta informação sobre a biologia, a bioquímica e os novos alvos

terapêuticos experimentais de tumores cerebrais na área de neuro-oncologia experimental (Barth, 1998).

A linha de pesquisa principal do nosso laboratório é o isolamento e a caracterização de genes associados com o controle de proliferação celular e a origem de neoplasias (Armelin et al., 1996). Para tanto, utilizamos a linhagem C6 de glioma de rato (Benda et al., 1968) como modelo de estudo. Por apresentar receptores para hormônios glicocorticóides e conseqüente resposta celular, esta linhagem tem sido utilizada como modelo dos efeitos de GCs em gliomas. Os hormônios glicocorticóides (GCs) inibem o crescimento de células C6 em substrato sólido e semi-sólido (Freshney, 1984; Gambarini et al., 1979).

Com o objetivo de estudar as bases moleculares da atividade anti-tumoral de hormônios glicocorticóides em gliomas, utilizamos as variantes ST1 e P7 da linhagem celular C6 de glioma de rato, que foram isoladas por Sogayar e colaboradores (Armelin & Armelin, 1983; Armelin et al., 1983). Ambas variantes possuem o fenótipo completamente transformado em cultura e são tumorigênicas *in vivo*. O tratamento de células ST1 com o hormônio glicocorticóide hidrocortisona provoca uma série de efeitos, entre os quais encontram-se: achatamento celular, diminuição da taxa de crescimento, crescimento dependente de ancoragem e de fatores peptídicos de crescimento e ausência do potencial tumorigênico *in vivo*, resultando numa dramática reversão fenotípica de tumoral para normal. Já a variante P7 apresenta-se resistente ao tratamento com hidrocortisona (Hy). Este efeito inibitório de GC sobre a proliferação celular de células ST1 é resultado do bloqueio na fase G1 do ciclo celular (Armelin et al., 1983).

A procura de genes regulados por hormônios glicocorticóides, cujos produtos estejam associados com a reversão fenotípica da variante ST1, é de extrema importância para o entendimento dos mecanismos moleculares associados à atividade anti-tumoral de GC. Desta forma, várias tecnologias foram utilizadas, sendo que por hibridização diferencial foram isolados genes correspondentes às metalotioneínas 1 e 2 de rato, a seqüência de env de retrovírus endógeno de rato e o gene Orosomucoid 1 (Valentini & Armelin, 1996). Outra tecnologia utilizada, denominada *Differential Display* (Liang & Pardee, 1992), identificou e confirmou os mesmos genes induzidos por GC (Sasahara, 1995). Utilizando-se uma outra técnica denominada SSH

(*Suppression Subtractive Hybridization*) (Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996), foram isolados novos genes regulados por hidrocortisona: Tenascina-X, Trombospondina-1, NRP/B (*nuclear restricted protein in brain*), Folistatina, Tirosina fosfatase CL-100, Ciclina G, Subunidade catalítica da fosfatase tipo 2A (PP2A) (Vedoy & Sogayar, 2002). Mais recentemente, uma abordagem proteômica (Görg et al., 1988; Görg et al., 2004) foi utilizada para identificação de polipeptídeos diferencialmente representados após tratamento das células ST1 com Hy, por espectrometria de massa (Demasi, 2005; Demasi et al., 2006). Nesta abordagem algumas proteínas foram identificadas: Proteína Dissulfeto Isomerase, Anexina 2, Ribonucleoprotina Heterogênia Nuclear A3 e Ubiquitina, sendo que 2 polipeptídeos são compostos por duas proteínas: Subunidade regulatória 6B do proteassoma 26S e Proteína Dissulfeto Isomerase A6, e o outro polipeptídeo é composto por Dinactina 2 e Ribonucleoproteína F. Uma abordagem em larga escala foi utilizada, também, utilizando-se, para isso, microarrays comerciais da Affymetrix®, resultando numa listagem de mais de mil genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7, ambas tratadas com Hy por 24h e 5%SFB (soro fetal bovino) (Colin, 2006).

1.4. Análise funcional de NRP/B na reversão fenotípica das células ST1 promovidas por GCs.

Neste projeto, foi proposta a análise funcional de um dos genes isolados em nosso laboratório como sendo regulado por hidrocortisona em células ST1, um clone celular hiper-responsivo ao tratamento com hormônios glicocorticóides. Utilizando a tecnologia de hibridização subtrativa (SSH), um doutorando do laboratório (Cleber Vedoy, Processo Fapesp N°96/04713-4) obteve genes regulados por glicocorticóides que atuam no controle da diferenciação celular (Vedoy & Sogayar, 2002). O clone de cDNA escolhido para caracterização funcional foi o ST1Hy-24-85 (BG016125), que possui homologia com o gene *NRP/B* (*Nuclear Restricted Protein in Brain*) (Genebank N° AF059611) também chamado de *Enc-1* (*Ectodermal-Neural CórteX-1*) (Genebank N° XM_032553). A biblioteca de cDNA ST1HY24 utilizada na tecnologia de SSH foi construída

com o propósito de direcionar o enriquecimento de seqüências reguladas, exclusivamente, por hidrocortisona. Para tanto, foram utilizados, como *templates* para a construção da biblioteca, mRNAs de células ST1 carenciadas por 24h na presença de 0,2% SFB, seguido do tratamento com hidrocortisona (100ng/mL) por 24h. Esse tratamento foi realizado com o intuito de acumular o maior número possível de células que sofreram o fenômeno de reversão fenotípica tumoral→normal promovida pelo hormônio.

O gene *NRP/B* codifica uma proteína de matriz nuclear. A matriz nuclear tem sido alvo de atenção de várias pesquisas sobre a sua função celular e seu papel na tumorigênese (Berezney & Coffey, 1974). Contendo 98% de proteína, 0,1% de DNA, 0,5% de fosfolípidos e 1,2% de RNA, a matriz nuclear é um suporte tridimensional que possui funções fundamentais em muitas atividades celulares, como: determinação da morfologia nuclear, estabilização e orientação do DNA durante a replicação, organização de complexos regulatórios de genes e síntese de RNA (Mancini et al., 1996; Replogle-Schwab et al., 1996). A matriz nuclear coordena, também, diferentes processos que ocorrem na cromatina, a qual se encontra sob rígido controle do ciclo celular (Loidl & Eberharter, 1995). Assim, por exemplo, o produto do gene retinoblastoma (*pRB*) está associado com a matriz nuclear durante o ciclo celular (Mancini et al., 1996). Algumas proteínas que interagem com *pRB* também estão associadas com a matriz nuclear, incluindo oncoproteínas virais inativadas (antígeno *large T* de SV-40, proteína E1a de adenovírus e proteína E7 de papiloma humano), laminina A1C (Ozaki et al., 1994) e p84 (Durfee et al., 1994).

O gene que codifica *NRP/B* contém dois elementos estruturais importantes: o domínio *BTB* que prediz a região NH₂-terminal e o motivo *kelch* que prediz o domínio COOH-terminal (Kim et al., 1998). As proteínas que contêm estes dois domínios são abundantes no genoma humano, sugerindo a importância destes domínios como componentes de genes altamente conservados durante a evolução (Albagli et al., 1995). O domínio BTB tem sido caracterizado por mediar interações entre proteína-proteína ou proteína-DNA, as quais organizam estruturas importantes envolvidas na organização do citoesqueleto ou no *folding* de cromatina (Geisert et al., 1990), ubiquitinação protéica via complexo *ubiquitina-ligase E3* baseado em *culina-3* (Furukawa et al., 2003;

Geyer et al., 2003; Pintard et al., 2003), além de mediar formação de dímeros e heterodímeros *in vitro* (Albagli et al., 1995; Chen et al., 1995). O domínio é conservado durante a evolução, sendo encontrado em vários fatores de transcrição do tipo *zinc-finger* de Drosófila e mamíferos, em fases abertas de leitura de poxvirus e em proteínas ligantes de actina, que possuem o domínio *kelch* (Albagli et al., 1995; Bomont et al., 2000; Collins et al., 2001; Zollman et al., 1994). A dimerização de NRP/B foi observada por experimentos de *crosslinking* e *pull-down*, sendo que somente o domínio BTB é suficiente para translocação da proteína para o núcleo das células. Embora não exista o sinal de localização nuclear (NLS) clássico completo na seqüência protéica de NRP/B, foi proposto que a translocação para o núcleo deva ocorrer devido à dimerização de duas seqüências incompletas de NLS no domínio BTB ou por co-transporte por outra proteína carreadora nuclear (Kim et al., 2005; Kim et al., 1998). Este domínio BTB também é essencial para a diferenciação neuronal, por regular o crescimento de neuritos por interação com p110^{RB} (Kim et al., 2005).

O domínio *kelch* possui, como característica, seqüências de 50 aminoácidos contendo dois resíduos adjacentes de glicina, sendo repetido por 6 vezes na região C-terminal do gene NRP/B. As seqüências repetidas *kelch* sugerem que os motivos, em β -sheet, formem uma estrutura de *superbarrel* (Albagli et al., 1995; Bork & Doolittle, 1994; Xue & Cooley, 1993), que poderiam ter significância funcional na ligação à actina, no *folding* de proteína ou nas interações proteínas-proteínas. Membros da família *kelch* são importantes na organização e função do citoesqueleto (Varkey et al., 1995). Recentemente, um novo domínio denominado *BACK* foi descrito na IVS (*InterVening Sequence*) em proteínas *BTB-kelch*, possuindo, talvez, um papel funcional e estrutural na degradação protéica mediada por culina-3 (Stogios & Prive, 2004).

O gene de estudo *NRP/B* foi primeiramente descrito como *PIG10* (*p53-induced gene 10*) em linhagem celular de câncer colorretal. A linhagem celular DLD1 foi transfectada com p53, sendo *PIG10* um dos 14 genes que apresentavam expressão aumentada em mais de 10 vezes (Polyak et al., 1997). Utilizando-se bibliotecas de cDNAs do hipocampo cerebral fetal e adulto humanas, a proteína NRP/B foi isolada e caracterizada (Kim et al., 1998). Para um melhor entendimento do desenvolvimento do sistema nervoso (SN), o gene

Enc-1 foi identificado como de expressão limitada ao SN de camundongo (Hernandez et al., 1997). Portanto, estes são os nomes alternativos adotados para o gene *NRP/B*, sendo que o gene *PIG10* contém múltiplas mutações e deleções quando comparado ao *NRP/B/Enc-1*.

O gene que codifica a proteína humana de *NRP/B* possui uma ORF (*open reading frame* ou fase aberta de leitura) de 1.767 nucleotídeos, que codifica uma proteína de 589 aminoácidos e duas isoformas: de 67 e 57 kDa de massa molecular. As duas isoformas foram detectadas por imunoprecipitação de lisados protéicos de neurônios primários, células SH-SY5Y e PC-12, enquanto que somente a isoforma de 67kDa foi identificada no precipitado nuclear neuronal, o que indica que *NRP/B* utiliza um segundo códon de iniciação ATG em outros tipos celulares (Kim et al., 1998). As seqüências dos cDNAs de *NRP/B* humano e de camundongo são altamente conservadas, possuindo 99% de homologia. O mRNA de *NRP/B* é abundantemente expresso em cérebro humano e adulto com uma expressão menor em pâncreas, porém observa-se uma menor expressão em cérebro fetal, sugerindo que *NRP/B* seja regulado durante a embriogênese e possua funções tecido-específicas em diferentes estágios de desenvolvimento neuronal. A proteína é expressa abundantemente em cérebro, especificamente em neurônios primários, porém não é expressa em astrócitos primários (Kim et al., 1998; Kim et al., 2000). Estudos confirmaram que esta nova proteína de matriz nuclear interage com *pRB* e participa da regulação do processo de formação neuronal (Kim et al., 1998). Análise confocal de *NRP/B* em células de glioblastomas U87-MG indica localização nuclear (Kim et al., 2000), assim como em neurônios primários de rato (Kim et al., 1998). A localização citoplasmática foi também descrita em tumores cerebrais (Liang et al., 2004) e co-localizado com actina em células Daoy (Hernandez et al., 1997).

Curiosamente, em linhagens humanas de tumores cerebrais (linhagens de neuroblastomas: SMS-KCNR, LA-N-5, SHF, SK-N-SH, SK-N-LO, neuroepitelioma: SK-N-MC, meduloblastoma: Daoy, SNB40, D283Med, D341Med e em linhagens celulares de glioblastomas: SNB-19, SK-MG-12, U87MG, U251MG e U343MG), foi observada baixa expressão do mRNA de *NRP/B* (Hernandez, 1998), sendo que outro grupo de pesquisa mostrou uma abundante expressão nas linhagens celulares de neuroblastoma: IMR32, SKN-

MC, SKN-SH; glioblastoma: A172, T98G, U87-MG, U118-MG, U138-MG e U373-MG; neuroglioma: H4 e em linhagens celulares de astrocitomas: CCF-STTG1 e SW1088) e em amostras clínicas de GBM, tanto por ensaios de Northern blot como por ensaios de RT-PCR, sugerindo um papel no desenvolvimento de tumores cerebrais (Kim et al., 1998; Kim et al., 2000). O gene NRP/B também foi isolado como sendo diferencialmente expresso em meduloblastoma humano (Yokota et al., 2004). Porém, esta expressão abundante em tumores cerebrais descrita para o gene NRP/B não corroborava nossos resultados, nos quais a sua expressão era maior em células ST1 de glioma de rato tratadas com o hormônio anti-tumoral hidrocortisona (Vedoy & Sogayar, 2002), condição na qual apresentam um fenótipo normal. Contudo, recentemente, a publicação de um trabalho do mesmo grupo (Liang et al., 2004) descreve a existência de mutações (13 no domínio *Kelch*, 2 na *IVS-intervening sequence* e 2 no domínio *BTB*) no gene *NRP/B* de tumores cerebrais humanos, as quais contribuem para a tumorigênese cerebral por promover proliferação celular (aumentam ativação de *ERK*), suprimir apoptose (atenuam a ativação de caspases) e afetar a dinâmica do citoesqueleto nuclear (reduzem a afinidade de ligação por actina). Somente as mutações no domínio *Kelch* provoca redução na afinidade de ligação à actina. Desse modo, esses novos resultados apóiam a nossa idéia do gene NRP/B ser um putativo gene supressor de tumor.

1.5. Busca de genes associados com tumores do sistema nervoso central humano.

O câncer é uma doença genética associada com o acúmulo de mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumores que provocam a perda do controle da proliferação celular e das interações célula-célula. É uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 13% dos óbitos ocorridos no Brasil. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (Inca), órgão do Ministério da Saúde sediado no Rio de Janeiro, pouco mais de 2 milhões de brasileiros morreram da doença entre 1979 e 2002. Novos métodos de prevenção, detecção de susceptibilidade, diagnóstico, tratamento, marcadores de prognóstico e de resposta à terapia anti-tumoral são necessários, devido ao

aumento de incidência de câncer no Mundo e à baixa velocidade de progresso no tratamento efetivo desta doença. O seqüenciamento, a identificação e a caracterização estrutural e funcional de genes diferencialmente expressos entre tecidos tumorais e normais constituem etapas fundamentais para permitir a melhor compreensão do processo carcinogênico e o desenvolvimento de novas estratégias anti-tumorais.

A transformação maligna de células neuronais e gliais é um processo complexo. Assim, as bases moleculares da patogênese dos tumores do SNC (Sistema Nervoso Central) ainda permanecem obscuras. A inativação de genes supressores de tumor e a ativação e/ou superexpressão de oncogenes são os maiores responsáveis pelo processo tumorigênico, podendo ainda se somarem a outros eventos, como: alterações na progressão do ciclo celular, anormalidades em vias de transdução de sinal, processo de invasão celular e angiogênese (Kufe, 2003).

A inativação de genes supressores de tumor é uma das vias de progressão tumoral mais bem estudada. LOH (*loss of heterozygosity*) ou perda de heterozigose é uma das alterações genéticas observadas no câncer responsável pela inativação do segundo alelo destes *loci* gênicos (Knudson, 1971). A utilização de *loci* de microssatélites inclusos nestas regiões de deleções alélicas torna possível a detecção destas alterações (Gyapay et al., 1994). A alelotipagem de alguns tipos de tumores, utilizando estes marcadores, permite estimar quais regiões do genoma apresentam maior frequência de LOH. Com a definição destas áreas de perdas frequentes, torna-se possível a investigação de novos genes supressores que possam ser importantes no processo de tumorigênese, e que auxiliem no diagnóstico do câncer.

Os astrocitomas, incluindo o GBM, são os tumores cerebrais primários mais comuns que acometem os adultos. Perdas cromossômicas características estão associadas com estes tumores e refletem a inativação de genes supressores de tumor (GST), sendo geralmente, associadas com graus de malignidade específicos. Assim, por exemplo, há LOH descritos nos cromossomos 9p, 10p, 10q, 13q, 17p, 22q (von Deimling et al., 2000). Em todos os graus de malignidade dos astrocitomas ocorrem alterações genéticas como LOH nos cromossomos 17p, 22 e mutação no gene *TP53*. A deleção hemi- ou homozigótica no gene *CDKN2A* ou, alternativamente, inativação de *pRB* ou

amplificação de *CDK4* estão presentes em quase todos astrocitomas de alto grau (Ichimura et al., 1996). No cromossomo 10 há dois GSTs normalmente deletados, ou seja: *PTEN/MMAC1* e *DMBT1* e o gene *EGFR* geralmente está amplificado em astrocitomas de elevado grau (Li et al., 1997; Libermann et al., 1985; Mollenhauer et al., 1997; Steck et al., 1997). Em oligodendrogliomas, as alterações genéticas características são LOH em 1p e 19q, encontradas em todos os graus de malignidade (Reifenberger et al., 1994). Embora pacientes com neurofibromatose tipo 2 (NF2) possuam risco maior de desenvolver glioma, com exceção de ependimomas (Birch et al., 1996), o gene *NF2* (localizado no cromossomo 22q12.2) não está mutado em gliomas (De Vitis et al., 1996; Hoang-Xuan et al., 1995; Ng et al., 1995; Rubio et al., 1994; Watkins et al., 1996). Isto sugere que outras regiões do cromossomo 22 podem carregar outros genes envolvidos na tumorigênese de gliomas.

Para a identificação de GSTs em regiões com freqüente LOH é realizada a determinação de deleções parciais ou intersticiais em tumores individuais para se determinar a região de consenso comum. Após a primeira descrição de perda de heterozigose no cromossomo 22 em tumores gliais (James et al., 1988), vários estudos já foram realizados para se determinar a região mínima de deleção. LOH no cromossomo 22 parece ser interessante, já que esta perda alélica é um evento comum em gliomas, ocorrendo numa freqüência de 11-39%. Interessantemente, LOH 22q parece ser incomum em astrocitomas de baixo grau, mas mais freqüente em anaplásico e GBM (Nakamura et al., 2005). Deleções parciais foram detectadas na região 22q13 (Rey et al., 1992) entre 22q12 e 22q12 (Watkins et al., 1996) ou em regiões distais ou proximais do gene *NF2* (Hoang-Xuan et al., 1995; Muhammad et al., 1997). Aumentando-se o número de amostras e marcadores de microsátélites, 2 regiões de sobreposição foram identificadas entre os marcadores D22S533 e D22S689, no 22q11.23 – 12.1 e entre D22S928 e D22S1169 no 22q13.31-13.32 (Hartmann, 2004; Iino, 1999; Oskam et al., 2000). Curiosamente, além de ependimomas (Huang et al., 2002; Kraus et al., 2001), vários estudos de tumores extracraniais mostram regiões cromossômicas de putativos GSTs de astrocitomas semelhantes, como no câncer de mama (Allione et al., 1998; Castells et al., 2000; Iida et al., 1998) colon (Castells et al., 2000; Castells et al., 1999), de ovário (Bryan et al., 2000) da cavidade oral (Miyakawa et al., 1998) e de ilhotas

pancreáticas (Wild et al., 2001). Perda alélica de 22q é observada raramente em carcinoma ductal de mama, mas é observado em mais de 66% de carcinomas distais invasivos e 75% de carcinomas lobulares (Allione et al., 1998; Iida et al., 1998), ocorrendo , com maior frequência, em estágios avançados de outros tumores, sugerindo uma associação entre LOH 22 e progressão tumoral. Um putativo GST, *hSNF5/Inl1*, foi identificado em tumores malignos de *rhabdoid* com deleções homozigóticas e mutações truncadas (Versteeg et al., 1998), porém é encontrado em menor frequência em alguns tumores do SNC como meduloblastomas (Sevenet et al., 1999). Entretanto, não foram detectadas mutações neste gene em tumores astrocíticos (Weber et al., 2001).

Vários genes mapeados no 22q foram avaliados para o seu papel potencial como GST. Assim como os genes *NF2*, e *hSNF5/INI1*, outros genes foram analisados em relação à existência de mutações como o *MYO18B*, *DJI042K10.2*, *MKL1* e *EP300*, mas foram detectados somente polimorfismos de nucleotídeo simples (*SNPs – single nucleotide polymorphisms*) (Hartmann, 2004). O gene *TIMP-3*, localizado na região 22q12.3, avaliado quanto à metilação em seu promotor, apresenta-se normalmente hipermetilado, correlacionando-se com a perda da sua expressão em glioblastomas secundários e com a sobrevida de pacientes com astrocitoma de grau II (Nakamura et al., 2005). Num estudo combinando-se a tecnologia de hibridização genômica e análise de microssatélite, foram identificados três genes localizados em regiões já descritas anteriormente (Hartmann, 2004; Ino, 1999; Oskam et al., 2000), *DEPDC5/KIAA0645*, *YWHAH* e *C22orf24/HSN44A4A* (Seng et al., 2005b).

O cromossomo 22 é o segundo menor cromossomo autossômico humano, com o tamanho de 49,6Mb. A eucromatina do cromossomo 22 foi completamente seqüenciada em 1999 (Collins et al., 2003; Dunham et al., 1999). Evidências experimentais mostraram a existência de 62 genes no cromossomo 22, antes somente preditos por algoritmos computacionais (Das et al., 2001). Estes resultados indicam que há, pelo menos, entre 5.000 a 9.000 genes humanos adicionais no genoma inteiro, que não possuem similaridade com genes ou proteínas conhecidas, aumentando, desse modo, a estimativa

do número total de genes humanos para 41.000 a 45.000 (Camargo et al., 2002).

Existem fortes evidências para associação entre perdas de regiões no cromossomo 22 e o desenvolvimento de gliomas humanos, sendo que nenhum candidato a gene supressor de tumor importante foi encontrado neste cromossomo até agora. Utilizando-se ferramentas computacionais, bancos de dados e análise *in silico* pode-se identificar prováveis genes supressores de tumor em regiões deletadas do cromossomo 22, durante o desenvolvimento de gliomas humanos, sendo este um dos objetivos do presente trabalho. Para este objetivo, foram utilizadas duas abordagens disponíveis no laboratório, que poderiam direcionar a busca de genes envolvidos na progressão tumoral de gliomas neste cromossomo: utilização do banco de dados desenvolvido para o Projeto TFI (*Transcript Finishing Initiative*), projeto desenvolvido sob coordenação do nosso laboratório, juntamente com o laboratório da Dra. Anamaria A. Camargo do Instituto Ludwig para Pesquisa sobre o Câncer e, posteriormente, utilização de dados de expressão diferencial entre as linhagens ST1 e P7 (menos e mais tumorigênica, respectivamente) (Colin, 2006).

Em vista do sucesso obtido pelo consórcio FAPESP/LICR, devido principalmente à estratégia ORESTES - *Open Reading Frame Expressed Sequence Tags*, a qual gera fragmentos de cDNAs a partir de porções centrais de genes expressos, onde se localizam as regiões codificadoras (de Souza et al., 2000; Dias Neto et al., 2000), um novo projeto foi desenvolvido a fim de compilar as seqüências ORESTES e validar experimentalmente (por RT-PCR) seus transcritos correspondentes. Este projeto foi denominado: *Transcript Finishing Initiative* - TFI (Camargo et al., 2001). O Projeto TFI surgiu como uma extensão do HCGP (*Human Cancer Genome Project*), tendo, como objetivo, a identificação de novos genes humanos através do desenho de *primers* para validação de genes putativos, através da junção de *clusters* de ESTs (*expressed sequence tags*) contíguos que, teoricamente, poderiam pertencer a um único transcrito, baseado no mapeamento de ESTs na seqüência do genoma humano, na predição computacional de exons e nos padrões de organização genômica. Tal mapeamento tornou-se possível após a construção de uma interface gráfica (desenvolvida pela Rede de Bioinformática coordenado pelo Prof. Sandro de Souza) que possibilitou, além do alinhamento

das ESTs e ORESTES ao rascunho do genoma humano, a existência de informações sobre quais tecidos originaram cada EST, sobre a porcentagem de identidade com o DNA genômico e, também, sobre o mapeamento de *tags* 3' dos genes. A validação, por RT-PCR a partir de diversos tecidos humanos, originou, de um total de 489 seqüências selecionadas para validação, 211 seqüências denominadas TFUs (*Transcript Finishing Units*) que foram anotadas e descritas (Sogayar et al., 2004). Os dados para a construção da interface gráfica foram utilizados para mapear os genes e ESTs localizados no cromossomo 22 para posterior avaliação de sua expressão em linhagens e tecidos cerebrais.

Os dados obtidos da hibridização de *microarray* da Affymetrix, resultando numa lista de genes diferencialmente expressos entre a linhagem ST1 e P7 de glioma de rato (realizada no trabalho de Doutorado do doutorando Christian Colin em nosso laboratório) foram utilizados para se identificar genes no cromossomo 22 humano. Foi demonstrado que a expressão de vários genes selecionados através de *microarray* da Affymetrix foi confirmada em amostras clínicas de glioma humano (Colin, 2006). Deste modo, nos propusemos a investigar se genes localizados no cromossomo 22, com maior expressão em células ST1 em relação às células P7 (considerada mais maligna, por ser resistente ao tratamento com hormônio glicocorticóide), poderiam estar associados à formação de glioma humano.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Este trabalho possui como objetivos gerais:

a) Investigar os mecanismos moleculares da ação anti-tumoral de hormônios glicocorticóides nas células ST1 através da análise funcional do gene NRP/B na reversão fenotípica tumoral-normal destas células induzidas por glicocorticóides. Este gene foi recentemente isolado no nosso laboratório (Vedoy & Sogayar, 2002) e apresenta sua expressão induzida durante a reversão fenotípica das células ST1.

b) Selecionar genes supressores associados com Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) no cromossomo 22 humano, através de duas abordagens disponíveis no laboratório: utilização do banco de dados desenvolvido para o Projeto TFI (*Transcript Finishing Initiative*), e, posteriormente, utilização de dados de expressão diferencial entre as linhagens ST1 e P7 (menos e mais tumorigênica, respectivamente) (Colin, 2006).

2.2. Objetivos Específicos

a) Clonar e descrever o transcrito de NRP/B de rato.

b) Analisar o perfil de expressão de NRP/B, ao nível de mRNA e de proteína, durante a reversão fenotípica tumoral-normal das células ST1 tratadas com glicocorticóides.

c) Analisar os efeitos da superexpressão e silenciamento de NRP/B sobre a proliferação e resposta a hormônios glicocorticóides nas células ST1.

d) Analisar o perfil de expressão de NRP/B em linhagens e amostras clínicas de tecidos humanos.

e) Selecionar genes supressores associados com tumores do Sistema Nervoso Central.

f) Analisar a expressão de alguns destes genes em linhagens celulares de glioma humano e em amostras clínicas de gliomas humanos.

- pDEST12.2: Vetor de expressão plasmideal em células de mamíferos do sistema Gateway, contendo um promotor de citomegalovírus e cassetes que conferem resistência a neomicina.

- pLPCX: Vetor de expressão retroviral contendo elementos do vírus Moloney de leucemia murina (MoMuLV) e do vírus Moloney de sarcoma murino (MoMuSV) e um promotor interno do citomegalovírus humano, além de um cassete que confere resistência a puromicina. (Clontech, EUA).

- pLPCX-EGFP: Vetor de expressão retroviral pLPCX contendo o cDNA codificante para EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) construído e cedido pelo Dr. Marcos A. Demasi (pós-doutorando em nosso laboratório).
- pLPCX-NRP/B: Vetor de expressão retroviral contendo a região codificadora de NRP/B selvagem de rato, construído neste trabalho

As seguintes construções foram geradas em colaboração com o Dr. Ricardo Corrêa, que então se encontrava no Salk Institute for Biological Studies - (Tiscornia et al., 2003).

- pMDL - Vetor codificante das seqüências gag e pol.
- pREV – Vetor codificante das seqüências do envelope viral, que regula a expressão lentiviral ao nível pós-transcricional.
- pVSVG – Vetor codificante das seqüências do envelope viral heterólogo, derivado de (*G glycoproteins of vesicular stomatitis vírus*).
- pEGFP - Vetor lentiviral que expressa o gene EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*).
- siNRP/B 271, 761 e 956 – Vetores lentivirais contendo 3 diferentes seqüências de RNAi para NRP/B foram clonadas de modo à fundir-se com a proteína EGFP, possibilitando a fácil confirmação da transfecção e infecção celular sob microscopia de fluorescência. Os números das construções de RNAi para o gene NRP/B correspondem à posição em que a seqüência de dsRNA foi desenhada, baseada na seqüência de rato depositada no GenBank com o número de acesso: AY669396.

3.1.2. Linhagens Celulares

- P7: clone celular derivado da linhagem C6 de gliomas de rato (ATCC CCL107), resistente ao tratamento com hormônio glicocorticóide, obtida em nosso laboratório (Armelin & Armelin, 1983; Armelin et al., 1983).
- ST1: clone celular derivado da linhagem C6 de glioma de rato (ATCC CCL107), hipersensível ao tratamento com hormônio glicocorticóide, obtido em nosso laboratório (Armelin & Armelin, 1983; Armelin et al., 1983).
- ST1-pLPCX: população de células ST1 transduzidas estavelmente com o vetor retroviral pLPCX.
- ST1-EGFP: população de células ST1 transduzidas estavelmente com o vetor retroviral pLPCX-EGFP.
- ST1-NRP/B: população de células ST1 transduzidas estavelmente com o vetor retroviral pLPCX-NRP/B.
- NIH-3T3: linhagem de fibroblastos derivadas de embrião de camundongo Swiss do NIH (Jainchill et al., 1969).
- T98G: linhagem de glioblastoma multiforme humano, apresenta crescimento independente de ancoragem e se mostra incapaz de formar tumores *in vivo*

quando injetadas no dorso de camundongos imunodeprimidos do tipo *nude* (Stein, 1979).

- A172: linhagem derivada de glioblastoma multiforme humano, com crescimento independente de ancoragem e incapaz de formar tumores *in vivo* (Giard et al., 1973).
- HOG: linhagem celular de oligodendroma humano (Post & Dawson, 1992).
- U343MG: linhagem celular de astrocitoma humano (Dirks et al., 1997).
- U373MG: linhagem celular de glioblastoma multiforme humano, altamente invasiva em ensaios de invasão *in vitro* (de Ridder et al., 1987).
- U87MG: linhagem de astrocitoma humano – grau III, capaz de formar tumores quando injetada subcutaneamente no dorso de camundongos imunodeprimidos do tipo *nude* (astrocitoma anaplásico) (Ponten & Macintyre, 1968).
- MCF-7: linhagem celular epitelial de câncer de mama humano. A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 69 anos (Soule et al., 1973).
- ZR-75-1: linhagem celular epitelial de câncer de mama humano. A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 63 anos (Engel et al., 1978).
- MDA-MB-435: linhagem celular epitelial de câncer de mama humano. A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 31 anos (Cailleau et al., 1978).
- MDA-MB-231: linhagem celular epitelial de câncer de mama humano. A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 51 anos (Cailleau et al., 1978).
- HS578T: linhagem celular epitelial de câncer de mama (Hackett et al., 1977)
- PC-3: linhagem celular epitelial de adenocarcinoma de próstata humana. A linhagem parental foi isolada de um homem de 62 anos (Kaighn et al., 1979).
- DU 145: linhagem celular epitelial de adenocarcinoma de próstata humana. A linhagem parental foi isolada de um homem de 69 anos (Stone et al., 1978).
- LNCaP: linhagem celular epitelial de adenocarcinoma de próstata humana. A linhagem parental foi isolada de um homem de 50 anos (Horoszewicz et al., 1980).
- Siha: linhagem celular de células de carcinoma cervical humana. A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 55 anos (Friedl et al., 1970).
- Ca Ski: linhagem celular de células de carcinoma cervical humana. A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 40 anos. (Pattillo et al., 1977)
- C33-A: linhagem celular de células de carcinoma cervical humana. A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 66 anos (Auersperg, 1964)
- HeLa: linhagem celular de células de carcinoma cervical humana. A linhagem parental foi isolada de uma mulher de 31 anos (Gey et al., 1952).

- IMR-90: linhagem celular de fibroblastos de pulmão humano. A linhagem parental foi isolada de um feto feminino de 16 semanas (Nichols et al., 1977).
- NCI-H23: linhagem celular de adenocarcinoma de células não pequenas de pulmão humano. A linhagem parental foi isolada de um homem de 51 anos (Gazdar et al., 1980).
- NCI-H1155: linhagem celular de adenocarcinoma de células não pequenas de pulmão humano. A linhagem parental foi isolada de um homem de 36 anos (Gazdar et al., 1980).
- A549: linhagem celular de carcinoma de pulmão humano. A linhagem parental foi isolada de um homem de 58 anos (Giard et al., 1973).

3.1.3. Soluções e Meio de Cultura para células de mamíferos

- Meio de Cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco BRL-Life Technologies, Inc., USA).
- Soro Fetal Bovino Cultilab (Cultilab Materiais para Cultura de Células, Brasil).
- PBSA Solução Salina tamponada pH 7,2, composta por NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂PO₄ 8mM e KH₂PO₄ 1,4mM.
- Tripsina, solução 0,1% diluída em PBSA, contendo EDTA 1mM (ICN Pharmaceuticals Ins., USA; Gibco Limited, UK).
- Antibióticos: puromicina (Sigma).
- Hidrocortisona, polibreno (Sigma).

3.1.4. Soluções e Meio de Cultura para bactérias

- Meio LB (Luria-Bertani) para cultivo bacteriano, composto por triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 10g/L, pH 7,5. Para preparo de meio sólido, adicionou-se 15g/L de agar (Gibco-BRL).
- Meio SuperBroth para cultivo bacteriano, composto por tristona 32g/L, extrato de levedura 20g/L, NaCl 5g/L, pH 7,5.
- Antibiótico Ampicilina (Sigma, USA). Concentração utilizada: 150µg/mL.
- Antibiótico Kanamicina (Sigma, USA). Concentração utilizada: 50µg/mL.

3.1.5. Isótopos radioativos

- $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP, 3000 Ci/mmol (Amersham Biosciences).

3.1.6. Antisoros

- Antisoros Primários:

α -Enc-1/NRP/B: 611210 (BD Biosciences,).

α -c-Fos (H-125): sc-7204 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

α -BRG-1 (G-7): sc-17796 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

α -tubulina policlonal (Weinstein & Solomon, 1990).

- Antisoros Secundários:

anti-IgG de coelho e de camundongo conjugado com peroxidase (Vector Laboratories, USA).

3.1.7. Soluções

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, seguindo formulações descritas em manuais de laboratório (Asubel F, 1998; Sambrook J, 1989).

- Agarose para ensaio de crescimento celular em suspensão: Agarose Medium EEO (Fisher Scientific, New Jersey, USA).
- Gel de agarose: UltraPure™ Agarose (Invitrogen).
- Tampão MOPS: Acetato de sódio 10mM; EDTA 1mM; MOPS 40mM.
- SSC 20X: NaCl 3M; citrato trissódico dihidratado 300mM; pH 7,0.
- Solução I para lavagem de membrana de Northern blot: SSC 2X; SDS 0,1%.
- Solução II para lavagem de membrana de Northern blot: SSC 0,1X; SDS 0,1%.
- TBE (5X): 446mM Tris-Base; 445mM ácido bórico; 10mM EDTA; pH 8,0.
- Tampão de amostra para DNA: formamida deionizada 98%; EDTA 10mM; xileno cianol 0,025%; azul de bromofenol 0,025%.
- Tampão de lise para extração de RNA: isotiocianato de guanidina 4M; citrato de sódio 25mM pH 7,0; β -mercaptoetanol 0,1M.
- Solução de cloreto de cézio: cloreto de cézio 5,7M; acetato de sódio 25mM; pH 5,0.
- TE: Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0.
- TBS: NaCl 150mM, Tris-HCl 50mM, pH 7,5.
- TBST: NaCl 150mM, Tris-HCl 50mM, pH 7,5; Tween 20® 0,05%.

- RIPA⁺: Tris-HCl 10mM pH7,5, deoxicolato de sódio 1%*m/v*, NonidetP40 1%*v/v*, NaCl 150mM, SDS 0,1%*m/v*, PMSF 1mM, DTT 1mM, Aprotinina 1µg/mL, Leupeptina 5µg/mL, pepstatina 1µg/mL, NaF 10mM.
- Tampão de amostra para proteína (3x): Tris-HCl 150mM pH6,8; SDS 6%*m/v*, glicerol 30%*v/v*, β-mercaptoetanol 15%*v/v*, azul de bromofenol 0,3%*m/v*.
- Tampão de transferência: Glicina 39mM, Tris-HCl 48mM pH8,3, SDS 0,037%*m/v*, metanol 20%*v/v*.
- Corante de Ponceau: Ponceau 0,1%*m/v*, ácido acético glacial 10%.
- Tampão hipotônico: Hepes 10mM pJ7,9, KCl 1mmM, EGTA 0,1mM, EDTA 0,1mM, 1X Protease Inhibitor Mix (Amersham, NJ, EUA).
- Tampão de extração nuclear: Hepes 20mM pH7,9, NaCl 400mM, EGTA 1mM, EDTA 1mM, 1X Protease Inhibitor Mix (Amersham, NJ, EUA).
- Tampão CSK: NaCl 100mM, sacarose 300mM, Pipes 10mM pH6,8, MgCl₂ 3mM, EGTA 1mM, Triton X-100[®] 0,5%*v/v*, 1X Protease Inhibitor Mix (Amersham, NJ, EUA).
- Tampão RSB-Majic: NaCl 10mM, MgCl₂ 3mM, Tris-HCl 10mM pH7,4, Tween[®]20 1%*v/v*, deoxicolato de sódio 0,5%*m/v*, 1X Protease Inhibitor Mix (Amersham, NJ, EUA).
- Tampão para citometria de fluxo: NaCl 140mM, KCl 3,75mM, KH₂PO₄ 2mM, Na₂HPO₄, LicL 10mM, Na-EDTA 1mM, azida sódica 3mM pH7,4.
- Tampão de transferência: 48mM Tris-Base; 39mM glicina: 20% metanol; 0,037% SDS.

3.1.8. *Primers*

Os *primers* foram desenhados utilizando-se o programa *Primer 3* (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>) (Rozen & Skaletsky, 2000) e a síntese dos mesmos foi feita pelas empresas Invitrogen e Biomer.

- NRP/B 5': 5' ATATGTCGACGCAGGCTCACTCTCCCCTGGCTA 3'
- NRP/B 3': 5' GGGGCGGCCCGCCTAATAATTTATTGACCTT 3'
- NRP/B RAT For: 5' GCAGTCGAC**CAC**CATGTCCGTCAGCGTGCATGAGAA 3'
- NRP/B RAT Rev: 5' AAAAGCGGCCCGCATTAGGAAGGCAGGTGTTT 3'
- NRP/B ORF For: 5' CTACTGTTACCTCCCGGAAGT 3'

Após o desenho pelo programa, foram adicionadas algumas bases na extremidade 5' dos *primers* acima, a fim de se facilitar a posterior clonagem em vetores:

- sítio para clivagem com a enzima de restrição *Sal I* (sublinhado);
 - seqüência Kozak (**em negrito**);
 - e sítio para clivagem com a enzima de restrição *Not I* (duplo sublinhado).
-
- NRP/Bcontig6 For: 5' CACGAGATGTCGTTTCTGCT 3'
 - NRP/Bcontig2 For: 5' GCTGACCTGGCTGACTGAAT 3'
 - NRP/Bcontig4 Rev: 5' TCCCCCTACTGGTGTGGTTA 3'
 - NRP/Bcontig5 Rev: 5' GGGATCAAAACAGGCAGAGT 3'
 - ATTB1 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA 3'
 - ATTB2 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC 3'
 - pLPCX For 5' CGTGTACGGTGGGAGGTCTA 3'
 - pLPCX Rev 5' CCTACAGGTGGGGTCTTTCA 3'
 - GAPDH For: 5'CTGCACCACCAACTGCTTA 3'
 - GAPDH Rev: 5'CATGACGGCAGGTCAGGTC 3'

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura de Células

As células utilizadas foram mantidas em meio DMEM suplementado com 5 a 10% de soro fetal bovino (SFB), 100µg/mL de estreptomicina e 25µg/mL de ampicilina, à temperatura de 37°C. As culturas foram tripsinizadas para subcultivo quando atingiam uma densidade equivalente a 80% da densidade de saturação. Os estoques celulares são mantidos em meio de cultivo contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

3.2.2. Amostras teciduais

Astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecidos cerebrais não tumorais (obtidos de cirurgias de pacientes epiléticos) foram coletados após intervenção cirúrgica (realizada na Faculdade de Medicina – USP, tendo sido fornecidas pelo Laboratório de Investigação em Neurologia, coordenado pelo Profa. Dra. Suely Marie), sendo macrodissecadas e imediatamente congeladas

em nitrogênio líquido. O termo de consentimento de doação, seguindo as normas institucionais da Faculdade de Medicina – USP, foi obtido de todos os pacientes após aprovação do Protocolo de Pesquisa nº 830/01 pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde (parecer 373/02). Pedacos de cada um dos tecidos foram pulverizados em cadinho estéril e livre de RNase, na presença de nitrogênio líquido, lisados com isotiocianato de guanidina e mantidos à -70°C até o isolamento do RNA total, conforme descrito no item 3.2.3. Os diferentes astrocitomas foram catalogados em diferentes graus, de acordo com o sistema WHO. Os dados clínicos e histopatológicos das amostras dos pacientes constam da Tabela 1:

Tabela 1. Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.

Número do Paciente	Classificação Anátomo- patológico	Sexo	Idade (anos)	Sobrevida (meses)
332	Normal	F	23	-
337	Normal	M	41	-
349	Normal	M	41	-
368	Normal	M	30	-
400	Normal	M	45	-
411	Normal	F	37	-
462	Normal	F	51	-
473	Normal	F	ND	-
579	Normal	F	ND	-
646	Normal	M	ND	-
664	Normal	F	ND	-
692	Normal	F	ND	-
693	Normal	F	ND	-
352	Pilocítico (Grau I)	M	35	ND
363	Pilocítico (Grau I)	M	13	ND
421	Pilocítico (Grau I)	F	16	ND
436	Pilocítico (Grau I)	M	18	ND
463	Pilocítico (Grau I)	F	18	ND
495	Pilocítico (Grau I)	F	8	ND
501	Pilocítico (Grau I)	M	32	ND
570	Pilocítico (Grau I)	F	8	ND
594	Pilocítico (Grau I)	M	18	ND
601	Pilocítico (Grau I)	M	21	ND
661	Pilocítico (Grau I)	M	ND	ND
453	Difuso (Grau II)	M	29	ND
101	Difuso (Grau II)	F	24	ND
250	Difuso (Grau II)	F	31	13
267	Difuso (Grau II)	M	44	ND
328	Difuso (Grau II)	M	39	ND
341	Difuso (Grau II)	M	29	13
346	Difuso (Grau II)	M	23	ND
392	Difuso (Grau II)	F	25	ND
452	Difuso (Grau II)	M	42	ND
467	Difuso (Grau II)	F	41	ND
490	Difuso (Grau II)	M	37	ND
254	Difuso (Grau II)	F	15	ND
577	Difuso (Grau II)	F	35	ND
28	Anaplásico (Grau III)	M	53	ND
34	Anaplásico (Grau III)	M	18	ND
73	Anaplásico (Grau III)	F	24	ND
106	Anaplásico (Grau III)	M	68	3
233	Anaplásico (Grau III)	F	58	1
338	Anaplásico (Grau III)	F	37	14
360	Anaplásico (Grau III)	F	32	ND
410	Anaplásico (Grau III)	M	29	ND
428	Anaplásico (Grau III)	M	22	23
451	Anaplásico (Grau III)	M	34	17
478	Anaplásico (Grau III)	M	36	20
514	Anaplásico (Grau III)	M	37	ND
356	GBM (Grau IV)	M	74	12
380	GBM (Grau IV)	M	62	ND
384	GBM (Grau IV)	M	45	5
435	GBM (Grau IV)	M	35	12
440	GBM (Grau IV)	M	76	ND
487	GBM (Grau IV)	M	69	ND
35	GBM (Grau IV)	M	53	45
74	GBM (Grau IV)	M	75	17
89	GBM (Grau IV)	F	49	38
170	GBM (Grau IV)	M	50	8
208	GBM (Grau IV)	M	63	6
256	GBM (Grau IV)	M	42	3
269	GBM (Grau IV)	F	65	0
297	GBM (Grau IV)	F	79	11
317	GBM (Grau IV)	F	72	3
370	GBM (Grau IV)	M	45	12
391	GBM (Grau IV)	F	54	13
397	GBM (Grau IV)	F	59	5
442	GBM (Grau IV)	M	69	4
450	GBM (Grau IV)	F	62	14

3.2.3. Extração e purificação de RNA total de células de mamíferos (Chirgwin et al., 1979)

As linhagens celulares foram subcultivadas e tratadas sob diferentes condições em placas P150, a uma densidade da ordem de 10^5 células/cm². Para a lise das células, a monocamada de células aderida foi lavada com PBSA e as células foram lisadas com solução de lise para RNA. Os lisados foram transferidos para tubos contendo solução de cloreto de cézio e centrifugados a $130.000\times g$, 20°C por 17h. O RNA sedimentado no fundo dos tubos foi ressuspendido em água estéril. A concentração do RNA foi determinada pela absorbância das preparações a 260nm, utilizando como valor padrão $1 A_{260} = 40 \mu\text{g/mL}$ de RNA. O grau de pureza da preparação foi avaliado pela relação A_{260}/A_{280} , que deve ser próxima de 2,0 para ácidos nucleicos.

3.2.4. Amplificação do transcrito completo de NRP/B de rato.

Uma biblioteca de cDNA proveniente de células ST1 tratadas com Hy foi utilizada como molde para a transcrição reversa para obtenção do transcrito completo de NRP/B de rato. Para a reação de PCR, utilizou-se a enzima Platinum Taq Polymerase High-Fidelity (1U, Invitrogen), 1 μ l da solução contendo a biblioteca de cDNA, PCR buffer 1X (Invitrogen), MgSO₄ 2mM, dNTPs 0,2mM), *primers* na concentração de 0,5 μ M. Baseando-se numa sequência de EST de rato (Genebank n° BF412571 e BQ210995), foi possível desenhar um *primer* na região 5', denominado NRP/B 5'; e outro denominado NRP/B 3' na região 3', respectivamente. As condições de ciclagem no termociclador foram: 95°C por 30seg, 15 ciclos de 95°C por 15seg, 57°C por 20seg e 68°C por 6min, 25 ciclos de 95°C por 15seg, 57°C por 20seg e 68°C por 6min + 10seg/ciclo e extensão final de 68°C por 10min. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo (0,5 μ g/mL) e visualizado em transiluminador Ultra Violeta (UV).

3.2.4.1. Clonagem do transcrito completo de NRP/B de rato em vetor pENTR2B (Invitrogen)

O fragmento correspondente ao transcrito completo de r-NRP/B amplificado por PCR foi purificado utilizando-se o kit GFX DNA Purification (GE Healthcare). O fragmento purificado foi submetido a uma reação de digestão com enzimas de restrição *Sal I* e *Not I*. O fragmento digerido foi novamente purificado com o kit GFX DNA Purification.

O plasmídeo pENTR2B foi submetido à digestão com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para digestão do fragmento correspondente ao transcrito completo de r-NRP/B. Posteriormente, o vetor linearizado foi desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina intestinal de vitela (3U, Fermentas) a 37°C por 30min, seguida da inativação da enzima a 70°C por 10min. Os produtos de clivagem desfosforilados foram fracionados por eletroforese em gel de agarose para serem então cortados e purificados a partir do gel utilizando-se o kit GFX DNA Purification (GE Healthcare). Todos os fragmentos foram concentrados no Speed Vac, quantificados e a pureza avaliada espectrofotometricamente, considerando-se uma relação superior a 1,8 (A260/A280nm) como aceitável.

Para subclonagem do inserto correspondente ao transcrito completo de r-NRP/B no vetor pENTR2B, foi realizada uma reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (5U, Fermentas), à 16°C por 20h, seguida da inativação enzimática a 65°C por 15min. Alíquotas da reação de ligação foram utilizadas para transformação de bactérias *E. coli* (DH5 α ou DH10B) por eletroporação.

3.2.5. Amplificação da região codificante de r-NRP/B de rato

Cerca de 1 μ g de RNA_{total} de células ST1 mantidas na presença de 0,2%SFB e tratadas com Hy por 24h foi utilizado como molde para a transcrição reversa para obtenção do transcrito completo de NRP/B de rato. As alíquotas de RNA_{total} foram tratadas previamente com DNase I (2U, Fermentas) e RNaseOut (20U, Invitrogen) por 10min a 37°C. Após o anelamento dos oligonucleotídeos (oligo-dT) por 10min a 75°C, a síntese de cDNA foi realizada por 2h, a 42°C, utilizando-se a enzima transcriptase reversa SuperScript III (200U, Invitrogen), seguida pela inativação enzimática por 5min a 95°C. As amostras foram então tratadas com RNaseH (5U, Fermentas) por 30min a

37°C, para degradação do RNA da reação, seguida da inativação enzimática por 15min a 70°C.

Para a reação de amplificação da região codificante de r-NRP/B, utilizou-se a enzima Platinum Taq Polymerase High-Fidelity (1U, Invitrogen), 1µl da solução contendo o cDNA de RNAtotal de células ST1 tratadas com Hy por 24h, PCR buffer 1X (Invitrogen), MgSO₄ 2mM, dNTPs 0,2mM) e *primers* na concentração de 0,5µM. Os *primers* utilizados nesta reação foram NRP/B RAT F e NRP/B RAT R. As condições de ciclagem no termociclador foram: 94°C por 1min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 65°C por 45s e 68°C por 1min, seguida da extensão final por 6min a 68°C. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo (0,5µg/mL) e visualizado em transiluminador Ultra Violeta (UV).

3.2.5.1. Clonagem da região codificante de r-NRP/B de rato em vetor pENTR2B (Invitrogen) e pLPCX (Clontech)

O fragmento correspondente à região codificante de r-NRP/B amplificado por PCR foi purificado utilizando-se o kit GFX DNA Purification (GE Healthcare). O fragmento purificado foi submetido a uma reação de digestão com enzimas de restrição *Sal I* e *Not I*. O fragmento digerido foi novamente purificado com o kit GFX DNA Purification.

O plasmídeo pLPCX foi submetido à digestão com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para o fragmento correspondente ao transcrito completo de r-NRP/B. Já o plasmídeo pENTR2B foi digerido com as enzimas de restrição *Not I* e *Xho I*, já que a clivagem da enzima *Xho I* origina pontas coesivas à clivagem da enzima *Sal I*. Posteriormente, os vetores linearizados foram desfosforilados com a enzima fosfatase alcalina intestinal de vitela (3U, Fermentas) a 37°C por 30min, seguida da inativação da enzima à 70°C por 10min. Os produtos de clivagem desfosforilados foram fracionados por eletroforese em gel de agarose para então serem cortados e purificados a partir do gel, utilizando-se o kit GFX DNA Purification (GE Healthcare). Todos os fragmentos foram concentrados no Speed Vac e quantificados e a pureza foi

avaliada espectrofotometricamente, considerando-se uma relação superior a 1,8 ($A_{260}/A_{280\text{nm}}$) como aceitável.

Para subclonagem do inserto correspondente à região codificante de r-NRP/B nos vetores pENTR2B e pLPCX, foram realizadas reações de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (5U, Fermentas), a 16°C por 20h, seguida da inativação enzimática a 65°C por 15min. Aliquotas da reação de ligação foram utilizadas para transformação de bactérias *E. coli* (DH5 α ou DH10B) por eletroporação.

3.2.6. Preparo de bactérias *Escherichia coli* eletrocompetentes e transformação por eletroporação com DNA plasmideal

Cerca de 10mL de cultura recém-cultivada de *E. coli*, foram inoculadas em 1L de meio LB e incubadas a 37°C, sob agitação, até $A_{500\text{nm}}$ de 0,7. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 4.000 g por 15min a 4°C e ressuspensas em 1L de água Milli-Q estéril gelada. As lavagens foram repetidas por mais 3 vezes, com 0,5L de água Milli-Q estéril gelada, 20mL de solução 10% glicerol gelada e 2mL de solução 10% glicerol gelada. As bactérias foram ressuspensas, aliquotadas e estocadas a -70°C.

A transformação das reações de ligação em bactérias foi realizada por eletroporação. Uma alíquota de 2 μ l da reação de ligação foi adicionada a 40 μ l de bactérias DH5 α ou DH10B eletrocompetentes. Esta mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (*gap* entre os eletrodos de 2mm). O eletroporador foi ajustado conforme o manual do aparelho para 2.800V e foi aplicado o pulso à cubeta. Em seguida, foi adicionado 1 ml de meio LB e a cubeta foi incubada a 37°C sob agitação de 200-250rpm por 1h. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar 1,5% contendo 100 μ g/ml de ampicilina. As placas foram, então, incubadas a 37°C até o dia seguinte (cerca de 16 h).

3.2.7. Rastreamento de clones bacterianos

3.2.7.1. PCR de colônia

Clones bacterianos isolados foram repicados para placa de 96 poços contendo 100 μ L de meio SuperBroth, suplementado com antibiótico para seleção específica dos plasmídeos utilizados na transformação bacteriana, e incubados a 37°C por 18h. Cerca de 1 μ L de da suspensão de cada bactéria recombinante foi adicionada juntamente com 14 μ L de mix de PCR composto por 1,226mL de H₂O, 150 μ L de tampão 10X, 45 μ L de MgCl₂ 50mM, 19 μ L de dNTP 10mM, 25 μ L de cada *primer* a 10 μ M e 10 μ L de Taq (50U, Biolase). As condições de ciclagem no termociclador foram: 95°C por 5min, 40 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 1min, seguida da extensão final por 5min a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo (0,5 μ g/mL) e visualizado em transiluminador Ultra Violeta (UV)

3.2.7.2. Técnica de Rinji

Após a incubação da placa de 96 poços contendo as bactérias transformadas, algumas colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio LB com ampicilina (100 μ g/ml). Após 6h de crescimento a 37°C, sob agitação, uma alíquota de 50 μ L de cada colônia foi misturada a 30 μ L de formol e 10 μ L de tampão de amostra 5X. Esta mistura foi vortexada e centrifugada por 2 min a velocidade máxima. O sobrenadante foi aplicado num gel de agarose 0,8%, corado com EtBr e visualizado em transluminador UV.

3.2.8. Preparação de DNA plasmideal em pequena e média escala

Os clones bacterianos analisados e selecionados foram inoculados em meio LB ou SuperBroth, suplementado com ampicilina (100 μ g/mL) e mantidos a 37°C, sob agitação de 200-250rpm por cerca de 16h. Inóculos de 5mL e 50mL foram utilizados, respectivamente, para preparações plasmideais pequenas ou médias. Para a preparação dos DNAs plasmideais em pequena escala, foi utilizado o Kit *Concert High Purity Plasmid Purification Systems – Plasmid Miniprep System* (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Para a preparação em média escala, foi utilizado o kit *QIAGEN Plasmid Midi* (Qiagen).

As preparações de DNA resultantes foram quantificadas por espectrofotometria a 260nm, sendo que 1 OD 260nm equivale a 50µg/mL de DNA. A pureza das preparações plasmideais foi determinada espectrofotometricamente, considerando-se uma relação superior a 1,8 (A260/A280nm) como aceitável. A identidade das preparações de DNA foi analisada através de digestão com as enzimas de restrição apropriadas, seguida de fracionamento dos produtos das digestões em gel de agarose 0,8%, corado com EtBr e visualizado em transiluminador UV.

3.2.9. Seqüenciamento do transcrito completo de NRP/B de rato

3.2.9.1. Seqüenciamento de clones originados por fragmentação randômica de NRP/B por sonicação.

O volume de 12µL de solução contendo o transcrito completo correspondente ao gene r-NRP/B foi submetido à fragmentação aleatória por sonicação (4 pulsos de 45 seg a 0°C, de amplitude de 70%, com intervalos de 15 seg). O produto da sonicação foi aplicado num gel de agarose 1%, sendo realizado, então, a seleção de fragmentos de 500pb. O pedaço de gel contendo os fragmentos do tamanho escolhido foi cortado e purificado com o Kit GFX (GE), conforme instruções do fabricante. Os fragmentos foram eluídos em 50µl de H2O Milli-Q estéril e, então, concentrados no *Speed Vac* para um volume final de 25µl. A reação de reparo e fosforilação (contendo a enzima Klenow + enzima PNK + ATP + dNTP + Tampão) foi realizada num volume final de 35µl, a 37°C por 45 min seguida de inativação das enzimas por aquecimento a 65°C por 20 min. O produto da reação foi purificado com o kit GFX para ligação nos vetores de clonagem pENTR2B, seguido de transformação bacteriana. A análise das colônias positivas foi realizada por PCR de colônia. Clones bacterianos contendo fragmentos de r-NRP/B foram submetidos ao seqüenciamento de DNA.

3.2.9.2. Seqüenciamento automatizado de DNA

Utilizou-se o Kit *DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing* (GE Healthcare), conforme protocolo do fabricante. O seqüenciador utilizado foi o ABI 3700 (Perkin Elmer).

3.2.9.3. Montagem de seqüência *Full length* de NRP/B de rato e submissão ao GenBank

A montagem do consenso foi realizada utilizando-se o programa *Phred-Phrap Consed* (Ewing & Green, 1998; Gordon et al., 1998), além do programa Cap3 (Huang & Madan, 1999), ambos disponibilizados na internet por nosso laboratório (<http://mariwork.iq.usp.br/ferramentas>). Foram utilizadas outras ferramentas de Bioinformática disponíveis na Internet no site do NCBI. O depósito da seqüência completa *Full length* de NRP/B de rato no Genbank foi realizada através do site do NCBI.

Alinhamentos múltiplos com a seqüência protéica de r-NRP/B foi realizada com o programa *ClustalW multiple alignment*, versão 1.8 (Chenna et al., 2003).

3.2.10. Superexpressão de NRP/B em células ST1

3.2.10.1. Transfecção

Células ST1 foram plaqueadas em placas P60 (2×10^6 células/placa), na presença de 10% SFB DMEM 24hs antes do procedimento da transfecção. As células ϕ nx-Ampho (linhagem celular empacotadora anfotrópica derivada da linhagem 293T de rim embrionário humano) foram plaqueadas em P60 na presença de DMEM contendo 10% SFB (HyClone) sem antibióticos. O DNA plasmideal (5-8 μ g) foi diluído em 300 μ l de DMEM sem soro e no caso das células empacotadoras, sem antibiótico. Em outro tubo eppendorf, 20 μ l do reagente de lipofecção (Lipofectamine 2000 – Invitrogen) foram diluídos em 300 μ l de meio de cultura. O conteúdo dos dois tubos foi misturado e a mistura foi incubada por 20 min à temperatura ambiente, para ser, em seguida, adicionada ao meio de cultura das células. Nos ensaios de transfecção de células ST1, foi co-transfectado o vetor pX343, que confere resistência à Higromicina.

3.2.10.2. Isolamento dos clones transfectantes estáveis de ST1 transfectados com a construção pDEST 12.2/NRP/B.

Após 48h de transfecção, as células foram tripsinizadas, diluídas e colocadas em placas P60, sendo mantidas em meio seletivo, contendo antibióticos adequados para o isolamento de clones transfectantes estáveis (500µg/ml de Geneticina + 350µg/ml de Higromicina). Após 15 dias no meio seletivo, as colônias foram isoladas pelo método de clonagem em anéis. Estas células foram transferidas para um dos poços de uma placa de 12 poços e mantidas em meio seletivo. Os clones resistentes foram expandidos e congelados para experimentos posteriores. A expressão de genes foi analisada por Northern blot.

3.2.10.3. Coleta, titulação e concentração dos sobrenadantes virais.

Após 24h da transfecção das células ϕ nx-Ampho, foi efetuada a troca do meio de cultura para início das coletas de 2ml de meio DMEM 10%SFB de 12h em 12h, até 72h após a transfecção. As amostras coletadas foram centrifugadas a 1000g por 5 min para eliminação de debris celulares, sendo então, congeladas em ultrafreezer (-70°C).

Os sobrenadantes contendo os vírus foram titulados em células 293T que estavam plaqueadas em placas de 6 poços (10^5 células/poço) em meio DMEM 10%SFB. O meio de cultura foi substituído por 1ml de diluições seriadas (a partir da diluição 1:10) dos sobrenadantes em meio DMEM 10% SFB com 8µg/ml de polibreno. Após 6h de incubação, foi adicionado 1ml de meio DME 10%SFB. Para a construção retroviral pLPCX/EGFP, após 48h de incubação, foi feita a contagem das colônias fluorescentes, observadas em microscópio de fluorescência Nikon modelo TE-300 com filtro para o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (excitação 460-510nm e emissão 515-565nm).

Alíquotas de 1ml do sobrenadante contendo as partículas virais foram descongeladas e centrifugadas a 20.000g, 4°C por 4h. O sobrenadante foi descartado e as partículas virais foram ressuspensas em volume

determinado de meio DMEM 5%SFB ou DMEM 10%SFB contendo 8µg/ml de polibreno para o protocolo de infecção.

3.2.10.4. Infecção de células ST1 com retrovírus

As células ST1 foram plaqueadas em placas de 96 poços (10^4 células/poço) e incubadas por 12h em meio DMEM 5%SFB. Para que a infecção ocorresse, o meio de cultura foi substituído pelo sobrenadante viral concentrado (título equivalente a 100 MOIs (*Multiplicity Of Infection*) em meio DMEM 5%SFB contendo 8µg/ml de polibreno. Após 24h, as células foram tripsinizadas e plaqueadas novamente em uma outra placa de 96 poços para repetição do mesmo procedimento. Após 24h da segunda infecção, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em uma placa de 24 poços. A seleção com puromicina (3µg/ml), por 3 dias, foi iniciada 12h após o plaqueamento. Após a seleção, as células foram mantidas até que atingissem um número suficiente para congelamento em nitrogênio líquido.

3.2.11. Análise funcional

3.2.11.1. Análise por Citometria de Fluxo

Em uma placa P100, foram plaqueadas 2×10^5 células em meio DMEM 5%SFB, sendo que no dia seguinte, as células foram carenciadas com DMEM 0,2%SFB. Após 24h de carenciamento, adicionou-se Hy (100ng/ml) ou 5%SFB por 24h. As células foram coletadas por centrifugação a 1.000g por 5 min e ressuspensas em 500µl de PBSA e fixadas pela adição de 4,5ml de etanol 70% por 15 min e guardadas por até um mês a 4°C. Para análise por Citometria de fluxo, as células fixadas foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 500µl de PBSA. As células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 500µl de solução iodeto de propídeo (Iodeto de propídeo 20µg/ml; Triton X100 0,1%), sendo incubadas por 15 min a 37°C para lise celular e marcação do DNA nuclear. A leitura foi realizada no Citômetro (FACSCalibur Becton-Dickinson) e os resultados foram analisados no Programa CellQuest e ModFit, sendo que este último programa permite a

delimitação e quantificação da população de células nas deferentes fases do ciclo celular.

3.2.11.2. Curva de crescimento em substrato sólido

Cerca de 5×10^4 células foram plaqueadas em meio de cultura DMEM10%SFB em placas de 24 poços, sendo o meio renovado a cada dois dias. Triplicatas das culturas de cada linhagem celular foram coletadas nos dias 1, 3, 5, 7, e 9 após o plaqueamento. A coleta das células foi realizada através de tripsinização e fixadas com formaldeído 3,7%. As células fixadas foram mantidas a 4°C até o momento da contagem. A contagem das suspensões de células foi realizada em contador eletrônico (CELM – Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos, modelo CC530), através de diluições apropriadas em solução salina (NaCl 0,9%; Azida de Sódio 0,02%), feita com auxílio de um diluidor variável (CELM, modelo DV-250).

3.2.11.3. Ensaio de formação de colônia em meio semi-sólido

O potencial tumorigênico das células ST1 foi determinado indiretamente, através de ensaios de crescimento em suspensão de agarose. Cada poço de placas de 24 poços foi preenchido com 500µl de agarose 0,6% em meio de cultura DMEM/10%SFB. Sobre esta camada semi-sólida, foram plaqueados 100µl de meio de cultura contendo células isoladas diluídas nas concentrações de 10^3 e 10^2 células/mL em meio de cultura, em duplicatas. Rapidamente, para evitar a adesão das células, foram adicionados 500µl de solução semi-sólida de agarose 0,3% em meio de cultura DMEM/10%SFB. Após 24h, foram adicionados 500µl de meio de cultura DMEM/10% SFB sendo que esta camada superior de meio de cultura líquido foi trocada a cada 3 dias. Quinze dias após o plaqueamento, as colônias foram fixadas com 100µl de formaldeído 37%, fotografadas em microscópio invertido (Nikon Diaphot, modelo Eclipse TE 300), contadas em aumento de 100x e o resultado analisado no programa de análise estatística Prisma.

3.2.11.4. Ensaio de tumorigênese

Foram utilizados camundongos *nude* (Balb/c), de 4 a 8 semanas, os quais foram mantidos com acesso a água e ração *ad libitum*, com ciclos de luz de 12h, no Biotério do Conjunto das Químicas da USP. As linhagens celulares foram previamente subcultivadas em meio de cultura DMEM completo, contendo 5% de SFB. As culturas em crescimento exponencial das linhagens de interesse foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura DMEM sem soro, e mantidas em gelo até o momento da injeção no animal. Cada animal recebeu a injeção subcutânea de 0,1mL da suspensão de células (contendo 2×10^6 células) no dorso, após assepsia do local com etanol 70%. Os animais foram mantidos até o dia do sacrifício nas condições acima, e foram observados, semanalmente, para detecção da formação de tumor e medição dos mesmos com paquímetro. No dia do término do experimento de tumorigênese (45 dias após a injeção, de acordo com a linhagem celular utilizada), os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e os tumores formados foram extraídos cirurgicamente do dorso dos animais e preparados para ensaios de imunohistoquímica.

3.2.12. Inibição de NRP/B em células ST1

3.2.12.1. Transfecção para produção de partículas virais

Células 293T foram plaqueadas em placas P35 (10^6 células/placa) na presença de DMEM contendo 10% SFB (HyClone) sem antibióticos, 24h antes da transfecção. Amostras (5µg) de DNA plasmideal foram diluídas em 250µl de DMEM (10% SBF, sem antibiótico) e, em outro tubo eppendorf, 10µl do reagente de lipofecção (Lipofectamine 2000 – Invitrogen) foi diluído em 250µl de meio de cultura. O conteúdo dos dois tubos foi misturado e, após incubação de 30 min à temperatura ambiente, a mistura foi adicionada ao meio de cultura das células.

3.2.12.2. Coleta e concentração dos sobrenadantes virais

Após 24h da transfecção das células 293T, foi efetuada a troca do meio de cultura para início das coletas de 1ml de meio DMEM 10%SFB a cada 24h, até 72h após a transfecção. As amostras coletadas foram centrifugadas a 1.000g por 5 min para eliminação de debris celulares, sendo então congeladas em ultrafreezer.

Antes da infecção, os sobrenadantes, contendo as partículas virais, foram descongelados e centrifugados a 20.000g por 4h a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as partículas virais foram ressuspensas em 450µl de meio DMEM 10%SFB contendo 8µg/ml de polibreno.

3.2.12.3. Titulação dos lentivírus

Os sobrenadantes contendo os vírus foram titulados em células 293T. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços (10^5 células/poço) e incubadas por 12h em meio DMEM10%SFB. Após este período, o meio foi substituído por 1ml de diluições seriadas (a partir da diluição 1:10) da suspensão viral em meio DMEM 10% SFB contendo 8µg/ml de polibreno. Após 24h de incubação, o meio de cultura foi trocado por DME 10%SFB. Para todas as construções de lentivírus, após 48h de incubação, foi determinada em qual diluição foi possível observar colônias fluorescentes (observadas sob microscópio de fluorescência Nikon modelo TE-300 com filtro para o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) - excitação 460-510nm e emissão 515-565nm).

3.2.12.4. Infecção das células ST1 com lentivírus

As células ST1 foram plaqueadas em placas de 12 poços (4×10^4 células/poço) e incubadas por 12h em meio DMEM 5%SFB. Para que a infecção ocorresse, o meio de cultura foi substituído pela suspensão viral concentrada. As células foram expandidas, submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido e à extração de RNA total a partir de lisado celular.

3.2.13. Análise de expressão gênica (RNA e Proteína)

3.2.13.1. Ensaio de Northern Blot

RNA total foi extraído através de lise celular com solução de isotiocianato de guanidina e purificado por centrifugação em solução de CsCl (Chirgwin et al., 1979). Alíquotas (20µg) de RNA_{total} de cada amostra foram fracionadas por eletroforese em gel 1,2% agarose-formaldeído. Após a eletroforese, o gel foi analisado em transiluminador UV para se determinar a altura das bandas dos RNAs ribossomais e o RNA fracionado foi transferido para membranas de nylon, as quais foram hibridizadas, sob condições de estringência adequada, com sondas desnaturadas de cDNAs. Utilizou-se cerca de 30ng de cada sonda que eram produtos de PCR purificados de NRP/B e 36B4, um controle positivo que corresponde a uma proteína ribossomal. As sondas foram marcadas com [α -³²P] dCTP e *Ready-to-Go DNA Random Labeling kit* (GE Healthcare) e purificadas com *kit Microspin colum S300* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. A quantificação das sondas foi realizada no cintilador, medindo-se a CPM de 1µl de cada sonda. Em seguida, as membranas foram lavadas sob condições de estringência: uma lavagem com 2X SSC, 0,1% w/v SDS, 25°C por 20min e 3 lavagens com 0,1X SSC, 0,1% w/v SDS, 65°C por 15min. O sinal foi detectado utilizando o *Storm Phospho Imager Analyzer* (Molecular Dynamics) e quantificado usando o programa *Image Quant Software*.

3.2.13.2. PCR em tempo Real

3.2.13.2.1. Síntese de cDNA

Cerca de 1µg de RNA_{total} de linhagens celulares e de 0,7µg proveniente das amostras teciduais foram utilizados como molde para a transcrição reversa. As alíquotas de RNA_{total} foram tratadas previamente com DNase I (2U, Fermentas) e RNaseOut (20U, Invitrogen) por 10min a 37°C. Após o anelamento dos oligonucleotídeos (oligo-dT e *primer* específico para NRP/B R), por 10min a 75°C, a síntese de cDNA foi realizada por 2h, a 42°C, utilizando a enzima transcriptase reversa SuperScript III (200U, Invitrogen), seguida pela inativação

enzimática por 5min a 95°C. As amostras foram então tratadas com RNaseH (5U, Fermentas) por 30min a 37°C, para degradação do RNA da reação, seguida da inativação enzimática por 15min a 70°C. Para a quantificação da expressão gênica através de PCR em tempo real, as amostras foram diluídas 30 vezes com água livre de nucleases. Para confirmar a qualidade do cDNA sintetizado, foram realizadas reações de PCR utilizando-se um par de *primers* específicos para o gene de expressão constitutiva gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH For e Rev) e, como molde, os cDNAs sintetizados. Cada reação foi montada de forma que apresentasse uma concentração final de 1x para o tampão de reação da enzima Taq (Fermentas), 1,5mM de MgCl₂ (Fermentas), 0,2mM de dNTP (10mM, Invitrogen), 0,2μM de cada um dos *primers* F e R, enzima Taq DNA Polimerase (0,5U, Fermentas) e cDNA molde. A ciclagem utilizada nas reações foi de 94°C por 2min, 35 ciclos de 94°C por 30seg, 56°C por 30seg e 72°C por 45seg e, após os ciclos, 72°C por 6min. As reações foram posteriormente analisadas em gel 1% agarose contendo brometo de etídeo.

3.2.13.2.2. Desenho de *primers*

Os *primers* foram desenhados no programa *Primer Express* versão 2.0 (Applied Biosystems) e sintetizados pela Bioneer. *Primers* correspondentes aos genes *housekeeping* (de expressão constitutiva) GAPDH e HPRT foram usados como controles internos. As principais características dos *primers* desenhados pelo programa são: amplificar fragmentos cujo tamanho varie entre 50-150bp, apresentar quantidade de CG entre 30 e 80%, não possuir a capacidade de formação de dímeros ou de estrutura secundária e apresentar temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C de acordo com o algoritmo *nearest neighbor* (Breslauer et al., 1986). Além disso, a fim de evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico contaminante, a maior parte dos pares de *primers* foram desenhados em exons diferentes.

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de Real Time PCR.

As sequências estão representadas na direção 5'→ 3'. Os amplicons gerados apresentam um tamanho médio de 100pb. For:Forward; Rev: Reverse.

Gene	Sequências dos <i>Primers</i>
r-NRP/B	For: GTGGCAATGGAAGAACTCATCAC Rev: GACCACGCCGTCATTCTGTA
m- e r-GAPDH	For: CATGGCCTTCCGTGTTCTTA Rev: CCTGCTTCACCACCTTCTTGA
h-NRP/B	For: CTCAGCAACTTCCAAACCATCA Rev: TCCTCTGTCTCCAGCTCTTCACT
EST2	For: GCA ACG AGA CGG AGT TCC A Rev: ACA CGA AAA ATC CAT AGA TCC ACA CT
EST3	For: CCATCGTGCACTCTTATGTCATC Rev: AGGGCTAGTGGTCGTCATGGT
EST5	For: TCT ACT TTG GCA CCA GGG ACT T Rev: CCT GAT GAT TTG AGG TGG AAC AG
EST6	For: CCTCCGACAAGGACAGATTCC Rev: AATCTCTTGGAGTAGAATAAACTGCATTC
EST8	For: TCT GGA AGC GCA GCA ACA G Rev: CTG GAA GGT GCT GAC CCT CTT
EST 10	For: TTA GGT ATA GAT GTA ATT GGA CCG AAA G Rev: CTC GAG GCC GCC TCT GA
EST13	For: CCC GCT GTG CGT GTA GAA A Rev: GAA GCA TGT CAC ACC ACT GCT T
1.FLJ23588	For: GAGCTGACCCATCTGCTAAACAGT Rev: AGCTCCTGTTGACTTGCTGTTCTC
2.SULT4A1	For: CCGCATGGACTCGAACGT Rev: GGACACCCCCAGGAATCTG
3.PNPLA3	For: TCTGCACAGGGAACCTCTACCT Rev: GAATGCATCCAAATATCCTCGAA
4.SAMM50	For: TCCTCAGGCTTGGAACATC Rev: CAACTGGACGCCATCACAT
5.PARVG	For: AGTCAGAGAAGTTGGTGGAACAGC Rev: CTCCGGAGCCAGCTTAAATAATTC
6.PRR5	For: CGTCCGGCAGCTGTTGA Rev: TTGTCCCGAAGGATCACCAT
7.NUP50	For: CATGAGGTTCTTGCTCTACTTCCAGT Rev: TGTAACAGGACAAGCTCACCTCTCT
8.FAM118A	For: AGCTGAACAGAGCAGATGGAACT Rev: CTGCCGAAGTTCCAGGATGT
9.RIBC2	For: GGCAGTTTGTGCATCTGTGAA Rev: CCAAGTTGTCTCTTGTCTTGCT
10.FBLN1	For: GTGGGCTTCCGGCTCTCT Rev: GCCGTAGACGTTGGCACACT
11.ATNX10	For: GCAAGCACCTTTGTGGATCA Rev: GGACGTGAGAAAGCCTAATTGT
12.FLJ27365	For: CATCGTGGGCTAGGGAAGATC Rev: TGGACACAGTCCCTTGAGCTT
13.PKDREJ	For: TTGTGTCTCAGCTTCCAGAACAC Rev: GTTGATCAAGACGCAGATCATCAC
14.PPARA	For: GTGCCTTTCTGTCCGGATGT Rev: TCACAGGTAAGAATTTCTGCTTTCA
15.FLJ20699	For: CTCTCCACCACAAGCAACGAA Rev: CCTCGATGCCACCGAGACT
16.TRMU	For: CTGTGTGCTGACCCTCAATCA Rev: CCCCTTGTAGAACACAGCAAACCT
17.GTSE1	For: GCCCCTAGTGAGGCTCTTCTTGTA

	Rev: AAGTCGATGAGAGGAAGGTCAATG
18.CELSR1	For: CTCTTCCTCTCTCAGCTGGTGTTT Rev: TCATGTAGATGTAGTGGAGGAGGATG
19.DIP	For: CCGCAGGTAACTGAAAATATGAGA Rev: GACGGAGTACCAGTCGGATAAGG
20.CERK	For: TCCGGAAATGCTCCAGGTT Rev: TTGACGCGATAAACTTCAACAAA
21.TBC1D22A	For: AGCACCCCCCTTTGATC Rev: CTGGAAGGTGCTGACCCTCTT
1'. HMOX1	For: GGCCAGCAACAAAGTGCAA Rev: AGTGTAAGGACCCATCGGAGAAG
2'. SDF2L1	For: AACCTGCACACGCACCACT Rev: CACTGTCCATAGGTCCAGGTCGT
3'. NF2	For: TGTACGGTGTGAACTACTTTGCAAT Rev: GATTTTATTCCACGGGAAGGA
4'. TOB2	For: AGGCCACCCTGGAGGGAGAAG Rev: TCCTAGGCAGAGAATCAGCACAG
5'. GAB4	For: GAGGAGCACTGGTAACATCCACTAC Rev: CCTGGACATAGTCCACCTTCTTG
7'. YWHAH	For: GACATGGCCTCCGCTATGAAG Rev: TGGCACCAACCACATTCTTGTAAG
8'. PIM3	For: ACACGGTCTACACCGACTTCGAC Rev: GTCCCCACACACCATATCGTAGA
9'. TOM1	For: ATCCCTCAGATCGCCAATGA Rev: TTGGTGGTCTGGCCTGTTC
14'. NPTX	For: AGCCTCATGGGATCCTTATCTTG Rev: CAGGTAAACTGGGCAATGTCA
16'. SYNGR	For: AAGGACAACCCACTGAACGAAG Rev: CTGGAAGGCCAGCACAGC
19'. TCF20 Isoforma A	For: ACTTCTCGGTGAGGTGCCCTAAG Rev: CTCTGTGCTGAGGCTGCCTTTC
19'. TCF20 Isoforma B	For: GGTGCCCTAAGCACAAGGTGA Rev: GCACGGTAGGACGATTTCCAT
21'. TIMP3	For: CCCCATGTGCAGTACATCCA Rev: GCACAGCCCCGTGTACATCT
22'. SOX10	For: GTACCCGCACCTGCACAAC Rev: GGTCTTTCTTGTGCTGCATACG
h-HPRT	For: GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A Rev: TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT

3.2.13.2.3. Reações de PCR quantitativo em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o reagente *SYBR Green*, uma substância que possui maior afinidade pela região denominada *minor groove* da dupla fita de DNA e que emite fluorescência no comprimento de onda de 520nm, permitindo a detecção do produto da reação de PCR em tempo real. Foram feitas duplicatas de cada amostra utilizando-se o *Master Mix PCR* (Applied Biosystems) em um volume final de 12 μ L, contendo os *primers forward/reverse* (600nM) e 3 μ L de cDNA. Todas as amplificações foram realizadas no aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (PE Applied Biosystems), com a seguinte ciclagem: denaturação à 95°C por 10min, 40 ciclos de 15 seg a 95°C (denaturação) e 60s a 60°C (anelamento dos *primers* e alongação). Foram realizados, também, controles de amplificação na ausência de molde (cDNA), denominados NTC (*Non template Control*).

Foi definido um *threshold* (de 0,03) na fase exponencial de amplificação do gene no programa GeneAmp 5700. Assim que foi estabelecido o *threshold*, a partir da intersecção deste com a curva de amplificação, obteve-se o Ct da amostra (*Threshold cycle*, ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do *background*).

Em experimentos de *Real-Time PCR*, deve-se considerar a possibilidade da variação da concentração inicial de cDNA na análise dos dados provenientes de duas ou mais amostras. Desta forma, para que os dados possam ser comparados, é necessário que estes sejam previamente normalizados, ou seja, a expressão do gene alvo foi determinada em função da expressão do gene controle. A quantificação das amostras foi realizada usando GAPDH e HPRT como controles.

3.2.13.2.4. Determinação da eficiência dos *primers*

Reações de PCR quantitativo, contendo 600nM de *primers*, foram realizadas utilizando-se como *template* uma mistura de cDNAs provenientes de diferentes linhagens humanas de cérebro diluídas em série. A análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logarítmico da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (**a**, em $y=ax+b$) que foi utilizado

para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, na seguinte fórmula:

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

3.2.13.2.5. Confirmação da expressão diferencial

De posse dos valores de Cts das duplicatas de cada amostra, calculou-se a média dos Cts das duplicatas. Dado que a expressão do gene é analisada em relação a uma amostra que é tomada como referência, calculou-se, então, a diferença entre a Média dos Cts da amostra referência ($M_{amostra\ ref}$) e a Média dos Cts da amostra estudada ($M_{amostra}$). Esta diferença foi definida como ΔCp . O cálculo do ΔCp foi realizado para os dados do gene alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final (Pfaffl, 2001) para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência (Ef) de amplificação dos *primers* utilizados não é de 100%, é dada por:

$$ratio = \frac{Ef_{gene\ alvo}^{\Delta Cp_{gene\ alvo}}}{Ef_{controle\ endógeno}^{\Delta Cp_{controle\ endógeno}}}$$

3.2.13.3. Western blot

3.2.13.3.1. Obtenção de extratos protéicos

- Extração de proteínas celulares totais

As células foram plaqueadas em placas de 100mm de diâmetro (P100). Após atingirem a subconfluência, o meio de cultura foi removido e as culturas foram lavadas com PBSA a 4°C. O tampão RIPA+ foi adicionado para lise celular. Após 15min no gelo e passagem por seringa com agulha de 22G, o lisado foi centrifugado a 10.000g, durante 10min, a 4°C, para retirada de *debris* celulares. A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o Kit da

Bio-Rad (Método de Bradford, 1976) e uma curva padrão de BSA (albumina sérica bovina).

- Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares

Cerca de 3×10^6 células ST1 foram plaqueadas em placas de 150mm de diâmetro (P150). Após atingirem a subconfluência ou após o esquema de tratamento, o meio de cultura foi removido e as culturas foram lavadas com PBSA, a 4°C. Com o auxílio de um policial, as células foram raspadas das placas na solução de PBSA e centrifugadas a 1.500rpm, por 5min, 4°C. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 500µL de tampão hipotônico, seguido de centrifugação a 16.000g por 15seg. O sobrenadante foi novamente descartado, e as células foram incubadas por 10min a 4°C em 400µL de tampão hipotônico, seguida da adição de 40µL de 1%NP-40. As células foram agitadas (vortex) por 30seg, e centrifugadas a 16.000g por 30seg, obtendo-se assim, a fração citoplasmática (sobrenadante). O *pellet* foi lavado com tampão hipotônico e ressuspendido em 100µL do tampão de extração nuclear, seguido de uma incubação a 4°C por 30min. A fração nuclear foi obtida após centrifugação a 20.000g por 30min, 4°C. As alíquotas de cada lisado foram submetidas à quantificação de proteínas pelo método de Bradford (kit *Bio-Rad Protein Assay*) e estocadas a -70°C.

- Fracionamento de proteínas celulares (Fey et al, 1984)

Cerca de 3×10^6 células ST1 foram plaqueadas em placas de 150mm de diâmetro (P150). Após atingirem a subconfluência ou após o esquema de tratamento, o meio de cultura foi removido e as culturas foram lavadas com PBSA, a 4°C. Com o auxílio de um policial, as células foram raspadas das placas na solução de PBSA e centrifugadas a 1.500rpm por 5min a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em tampão CSK sem Triton e novamente centrifugadas. O *pellet* celular foi incubado com tampão CSK por 10min a 4°C, e as células foram centrifugadas em seguida por 15min, a 3.300g, 4°C, obtendo-se a fração citoplasmática solúvel (sobrenadante). O sedimento foi incubado com 100µL do tampão RSB-Majic

por 15min a 4°C e a mistura foi centrifugada a 20.000g por 5min a 4°C, obtendo-se a fração enriquecida com proteínas nucleares (sobrenadante). O sedimento foi ressuspenso e incubado em 50µL no tampão de digestão, a 20°C por 20min. As proteínas associadas à cromatina foram extraídas com 0,25M de sulfato de amônio após centrifugação por 10min a 20°C e 20.000g. As proteínas de matriz nuclear (sedimento) foram extraídas com a solução de ressolubilização por 30min a TA (temperatura ambiente). Todas as frações, com exceção da fração contendo matriz nuclear (20°C), foram centrifugadas a 20.000g por 30min a 4°C e aliqüotadas à -70°C. Cada lisado foi quantificado pelo método de Bradford (kit *Bio-Rad Protein Assay*).

3.2.13.3.2. Western blot

Para o fracionamento das proteínas presentes nos extratos protéicos, alíquotas de igual massa (50µg) foram incubadas por 5 min a 100°C em tampão de amostra para proteínas e aplicadas no gel 6 a 12% SDS-PAGE. Após a corrida em cuba de eletroforese vertical, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, via semi-seca ou úmida em tampão de transferência. A membrana foi então corada com Ponceau 5% para avaliar a eficiência da transferência e, em seguida, descorada com água destilada.

Os sítios inespecíficos da membrana foram bloqueados com solução TBST com 5% m/v de leite desnatado por 16h, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada com TBST por 6 vezes, por 5 min cada, a temperatura ambiente e incubada com TBST 5% de leite contendo anticorpos primários anti-Enc1 (NRP/B) na diluição 1:250, anti- α tubulina, na diluição 1:1.000. A membrana foi novamente lavada (6 vezes) com TBST por 5 min cada e, então, incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (anti- α tubulina) e anti-IgG de camundongo (anti-Enc1) na diluição 1:1.000 em TBST 5% leite por 1h a temperatura ambiente e sob agitação. Após 6 lavagens com TBST por 5 min cada, a membrana foi revelada com o sistema quimioluminescente (Kit ECL Plus – GE). Um filme de raio X foi exposto à membrana até obtenção do sinal

adequado ou através do sistema analisador de imagens *Storm* (Molecular Dynamics –GE Healthcare).

3.2.13.4. Imunofluorescência

Foram plaqueadas em lâminas circulares na densidade de 10^4 células, em DMEM 5% SFB. As células foram fixadas por 10 min a -20°C com metanol e bloqueadas com solução de bloqueio (2% BSA), seguido da incubação com anticorpo primário contra Enc-1 (BD Biosciences) diluído 1:100, por 1h a 37°C e com o anticorpo secundário α -mouse conjugado com FITC (diluição 1:1.000) por 45 min a 37°C . As lâminas foram lavadas e secas para serem fixadas com Vectarshild (Vector) em lâminas de vidro para visualização em microscópio de fluorescência. O controle negativo foi obtido, omitindo a marcação com o anticorpo primário.

3.2.13.5. Imunohistoquímica

Foi realizada em colaboração com o Prof Fábio Nunes da Faculdade de Odontologia da USP. Secções ($4\mu\text{m}$ de espessura) de tumores fixados em formaldeído e embebidos em parafina foram preparados previamente. A seguir, as amostras foram hidratadas em álcool e água. As secções foram autoclavadas por 3min. em tampão citrato 10mM – pH 9 para a exposição de antígenos e incubadas com H_2O_2 (3%, 10min.). O anticorpo monoclonal anti-Enc1 (diluição 1:100) foi utilizado para marcação primária, seguido pelo anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A imunoreatividade foi visualizada com 3-3'diaminobenzidina (DAB). O controle negativo foi obtido, omitindo-se a marcação com o anticorpo primário.

3.2.14. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prisma (versão 4.0, da GraphPad Software Inc.). Os dados foram analisados como teste paramétrico teste-t de Student, uma vez que os grupos de dados apresentaram distribuição normal. Para análises considerando mais do que

duas populações de dados, os mesmos foram avaliados por análises de variância ANOVA seguida por Turkey t-test. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.2.15. Estratégias adotadas para identificação de genes putativamente relacionados com gliomas humanos.

3.2.15.1. Utilizando-se os dados obtidos no Projeto TFI (*Transcript Finishing Initiative*)

Primeiramente, alguns parâmetros foram selecionados para a escolha de uma região cromossômica deletada em gliomas humanos.

3.2.15.1.1. Levantamento bibliográfico correlacionando gliomas com deleções cromossômicas.

A taxa de deleção cromossômica foi analisada através do levantamento bibliográfico das deleções que ocorrem nos vários graus de malignidade dos gliomas humanos. Existem diversas tecnologias que permitem a análise de deleções cromossômicas, como o LOH (*loss of heterozygosity*), FISH (*fluorescent in situ hybridization*) e CGC (*comparative genome hybridization*). Devido a maior sensibilidade e a detecção de regiões cromossômicas menores, o LOH foi selecionado para ser a base de comparação dos artigos científicos.

3.2.15.1.2. Análise das regiões descritas contendo LOH.

As regiões contendo LOH associadas a gliomas foram analisadas conforme a incidência nos cromossomos locis relacionados e número de genes supressores de tumor já descritos na região. As análises destes dados permitiram confrontar diversos trabalhos científicos para a escolha de uma região de LOH. Um outro fator considerado na análise foi a quantidade de amostras analisadas e marcadores utilizados em cada estudo, minimizando a probabilidade da deleção ser ao acaso e não um fator crucial para a formação ou desenvolvimento da neoplasia.

3.2.15.1.3. Minimização do tamanho da região escolhida.

O tamanho da região escolhida deve ser o menor possível, para facilitar o rastreamento dos candidatos a GST (Genes Supressores de Tumor). Após a seleção da macro-região de interesse, seus marcadores moleculares foram mapeados para confrontação dos trabalhos científicos para delimitação da região mínima de deleção. O mapeamento dos marcadores foi realizado com o programa *Map View*, disponível no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A qualidade do seqüenciamento da região escolhida também foi analisada.

3.2.15.1.4. Análise da região cromossômica selecionada

Primeiramente, foi realizada a identificação dos *contigs* e dos clones genômicos presentes na região selecionada no programa Map View. Os *contigs* são compostos por clones genômicos que se sobrepõem, formando uma região contínua. Os clones genômicos foram então analisados para a presença de *clusters* de EST ou de mRNA completo (*full length*) no banco de dados do transcriptoma humano, desenvolvido para o Projeto TFI, em colaboração com a Dra. Anamaria Aranha Camargo do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. O banco de dados, desenvolvido pela Rede de Bioinformática para o projeto TFI, era composto pela seqüência genômica do banco de dados EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), versão 66 e por seqüências transcritas obtidas de diversas fontes: seqüências de mRNA e ESTs humano presentes no EMBL versão 66, seqüências ORESTES provenientes do Projeto HCGP - Genoma Humano do Câncer LICR/FAPESP (Camargo et al., 2001; Dias Neto et al., 2000) e seqüências de mRNA humano do banco de dados RefSeq, disponibilizado pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/refseq.html>) (Sogayar et al., 2004). O banco de dados utiliza a linguagem MySQL, um banco de dados relacional, que possui duas características fundamentais: facilidade de uso, com comandos fáceis e existência de várias ESTs disponíveis nos bancos públicos, além de todas as ORESTES obtidas no Projeto HCGP. Todos os dados armazenados no banco de dados relacional foram utilizados para a criação de *clusters* de

seqüências transcritas baseadas nas posições de cada um dentro dos clones genômicos individuais, ou seja, se coordenadas de pelo menos um exon fossem comuns a dois transcritos, então os mesmos eram considerados parte de um mesmo *cluster*. Os números de acesso do GenBank dos clones genômicos localizados na região 22q foram utilizados para iniciar as buscas de clones completos de mRNA (*Full length*) e de transcritos parciais de transcritos (ESTs) no banco de dados.

O critério de escolha de ESTs baseou-se na presença de *splicing*, uma vez que esta estrutura é uma evidência de seqüência expressa, afastando a possibilidade de ocorrência de contaminação com DNA genômico. O passo seguinte foi a remoção dos *clusters* redundantes (*clusters* com *overlapping*).

A inspeção manual foi realizada, uma vez que a lista de ESTs e mRNAs completos (*Full length*) foi gerada automaticamente a partir do banco de dados do transcriptoma. Primeiramente, foram realizadas verificações do real mapeamento das seqüências de ESTs e mRNAs completos no cromossomo 22, utilizando-se o programa BLAST, do NCBI e a confirmação da existência de *splicing* nas ESTs através da interface gráfica do Projeto TFI ou pelos programas BLAST ou BLAT.

Com a finalização desta etapa de inspeção manual, foi possível selecionar algumas seqüências candidatas para desenho de *primers* e avaliação de sua expressão em amostras de tumores cerebrais através de ensaios de PCR em tempo real, já descrito anteriormente.

3.2.15.2. Utilizando-se os dados de expressão diferencial entre as linhagens ST1 e P7

A partir da lista de genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 de rato (ambas tratadas por 24h com hormônio glicocorticóide hidrocortisona (Hy) em meio de cultura DMEM suplementado com 5% SFB) obtidas no trabalho do doutorando Christian Colin (Colin, 2006), foi realizada uma análise para a obtenção da localização cromossômica dos genes de rato no genoma humano com o intuito de avaliar se há genes localizados na região cromossômica previamente determinada (cromossomo 22) e se tais genes estariam associados com tumores cerebrais humanos.

A partir de 1.293 genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 (dados obtidos a partir da hibridização de microarrays Affymetrix® contendo 24 mil sondas referentes a transcritos de mRNA e clusters de ESTs do banco de dados do Unigene – Build 34), foi possível determinar automaticamente, através de busca de cada número de acesso dos genes diferencialmente expressos nos *arrays* da Affymetrix e localização dos mesmos no Cytoband de rato (NCBI), obtendo-se o nome do gene. Através do nome do gene, foi realizada uma busca no *GeneEntrez* do NCBI, possibilitando identificar a localização cromossômica do gene no genoma humano. A localização cromossômica dos genes no genoma humano foi obtida para somente 493 deles (aproximadamente 38% de eficiência). Isto ocorreu devido ao seqüenciamento do genoma do rato ainda se apresentar incompleto, assim como o transcriptoma do mesmo.

Foi realizada, então, uma análise manual, utilizando-se ferramentas de Bioinformática disponíveis no site do NCBI e na interface gráfica de genomas da UCSC (genome.ucsc.edu). Cada gene ou EST de rato foi localizado no genoma de rato e a existência de um ortólogo humano investigada, sendo sua localização cromossômica anotada. Deste modo, foi possível identificar 23 genes localizados no cromossomo 22 humano.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e Identificação do cDNA correspondente ao transcrito completo de NPRB de rato e descrição da sua estrutura genômica.

4.1.1. Amplificação e clonagem do cDNA correspondente ao transcrito completo de NRP/B de rato.

A amplificação do transcrito completo de NRP/B de rato foi obtida pela metodologia de long distance PCR, conforme descrito no item 3.2.4 de Métodos, utilizando-se os *primers* específicos, NRP/B 5' e NRP/B 3', os quais foram desenhados baseados em seqüências de EST de rato (Genebank n° BF412571, BQ210995, respectivamente). Como a região 3' final do gene possuía uma baixa quantidade de GC, foi adicionado um sítio de *Not I* na extremidade 5' do *primer* para facilitar a posterior clonagem em vetores de expressão e aumentar a quantidade de bases GC pareadas na seqüência. O produto amplificado de 4,5 kb na reação de *long distance PCR* foi fracionado em gel de agarose 0,8%, em tampão TAE 0,5X (Figura 1). O tamanho do produto amplificado corresponde ao tamanho do transcrito de rato predito, baseado na homologia com seqüências humana e de camundongo, já descritas na literatura.

Figura 1: Amplificação do cDNA completo de NRP/B de rato.

Eletróforese em gel de agarose 0,8%. Amplificação do cDNA correspondente ao transcrito completo de NRP/B de rato (~4,5Kpb), sintetizado a partir de uma biblioteca de cDNAs de ST1. PM: Padrão de peso molecular 1Kb (kilopares de bases, Fermentas).

O fragmento obtido nesta amplificação foi purificado utilizando-se o *Kit GFX*, e digerido com as enzimas de restrição *Sal I* e *Not I* para posterior clonagem no vetor pENTR2B, como descrito em Métodos (item 3.2.4.1). Após a ligação e transformação de bactérias eletrocompetentes, seis clones foram analisados, por digestão, com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para clonagem (Figura 2). Observa-se o resultado da digestão dos clones, liberando o fragmento de 4,5kp correspondente ao transcrito completo de NRP/B de rato e o fragmento de 2,7kp, correspondente ao vetor vazio pENTR2B.

Figura 2: Confirmação da clonagem de r-NRP/B no vetor pENTR2B por digestão com enzimas de restrição.

Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Análise por restrição (enzimas *Sal I* e *Not I*) de 6 clones positivos para a ligação entre o vetor pENTR 2B e NRP/B de rato. PM: Padrão de peso molecular 1kb (kilopares de bases, Fermentas).

4.1.2. Seqüenciamento completo de r-NRP/B.

Parte do produto de PCR contendo o cDNA correspondente ao transcrito completo de NRP/B de rato foi submetido à sonicação para fragmentação randômica por ultrassom, conforme descrito em Métodos (item 3.2.1). O produto sonicado foi fracionado em gel de agarose 1% para isolamento dos fragmentos que apresentavam tamanho de aproximadamente 500bp. Os fragmentos purificados foram clonados em pENTR2B e 96 clones foram escolhidos, aleatoriamente, para crescimento em meio LB, seguido de reação de PCR de colônia com os *primers* ATTB1 e ATTB2 do vetor pENTR2B (Figura 3). Nesta figura, observa-se a amplificação de 37 insertos de tamanhos aleatórios correspondentes a fragmentos da seqüência de cDNA correspondente ao transcrito completo de NRP/B de rato.

Figura 3: PCR de colônia dos fragmentos de NRP/B sonicados.

Elektroforese em gel de agarose 0,8%. PM: Padrão de peso Molecular *Mix Ladder* (Fermentas). PCR de colônia (48 clones) da ligação dos fragmentos sonicados de ~500pb de NRP/B de rato no vetor pENTR2B para posterior reação de sequenciamento.

Os produtos da reação de PCR de colônia foram submetidos à reação de sequenciamento, conforme descrito em Métodos (Item 3.2.9.2). A montagem do transcrito de NRP/B de rato foi realizada utilizando-se o pacote de programas *Phred-Phrap/Consed* e *Cap3*, disponíveis na internet por nosso laboratório (Métodos item 3.2.9.3). Na Figura 4, observa-se o alinhamento dos 4 *contigs* que foram montados no Programa *Phred-Phrap/Consed* que alinham com NRP/B, ou seja, o sequenciamento de 96 clones aleatórios não foi suficiente para abranger toda a sequência de NRP/B de rato. Para a finalização da montagem da sequência de NRP/B, foram desenhados 4 *primers* específicos (NRP/Bcontig2, NRP/Bcontig4, NRP/Bcontig5 e NRP/Bcontig6), nas extremidades dos contigs com a finalidade de unificar todas as sequências em apenas uma sequência contígua.

Figura 4: Alinhamento dos 4 *contigs* (Contigs 3, 4, 5 e 6) originados da montagem da sequência do cDNA correspondente ao transcrito completo de NRP/B de rato na sequência do genoma de rato pelo Programa BLAT (<http://genome.ucsc.edu>).

As caixas largas representam os exons e as linhas finas representam os introns. Sequências obtidas através de diversos programas de predição gênica e ESTs de rato também estão representados. *Primers* adicionais foram desenhados para finalização da sequencia completa e estão indicados em vermelho. (A: NRP/Bcontig6 For; B: NRP/Bcontig2; C: NRP/Bcontig4 Rev e D: NRP/Bcontig5 Rev).

A partir de preparações plasmideais da construção pENTR2B-NRP/B, foram realizadas reações de seqüenciamento com os *primers* descritos acima. As seqüências originadas destas reações foram somadas às seqüências obtidas no seqüenciamento de fragmentos aleatórios e a montagem foi realizada com o auxílio do programa *Phred-Phrap/Consed*, originando a montagem completa da seqüência do cDNA de NRP/B de rato.

4.1.3. Análise da estrutura genômica de NPR/B de rato

Como o resultado do seqüenciamento e a montagem da seqüência consenso foi possível identificar um *contig* de 4.545 nucleotídeos (Figura 5) compatível com o tamanho estimado de NPR/B em ensaios de Northern blot. Quando a seqüência foi analisada no Programa *ORF Finder* do NCBI para a identificação de possíveis fases abertas de leitura de NRP/B, foi encontrada uma *ORF* (*open reading frame*) de 1.770pb na *frame* +2 que codifica uma proteína de 589 aminoácidos (Figura 6),

> NRP/B de rato

```
AATTTGGNGGGGCGAGCAAACCAACCTATTTCAGTCGACGCGAGGCTCACTCTCCCCTGGCTAGGCGAGCGCCCGCAGACGCTTGGCCCG
GCCGGGGCGCCAGGTCCGTAGCTGCTGATCGGGAGACCGAGATCAGCTGCCTGCCGGAGCCGCGCTGAGAGCCACTACCCGGGACGCC
ATCGCTTCCCTCCCGCGCTCTTTCTCCCGCGGATCGCCACCGCTTCTGGAACAGAGACGCTTTCTTCGGCTTCCCTGCGGGTG
ACCGAGGCAAGAACCCAGCGGTTGTGTGCGGAGGCCAGTCCGCACTACTGAGTTGAAACAAAATGTCCGTCAGCGTGCATGAGAAC
CGCAAGTCCAGGGCCAGCAGCGGCTCCATCAACATCTACCTGTTTCATAAGTCTTCTCTATGCCGACAGTGTCTCACTCACTTGAACC
TTCTGCGTCAGCAGAGGCTCTTTACAGAGCTCCTCCTTATGCGGGAAACAGGACCTTCCCTTGCACCGGGCAGTGTGTGGTGCCTG
CAGCGCTACTTTCGAAGCCATGTTTCAGTGGTGGCCTGAAAGAGAGCCAGGACAGTGAAGTGAACCTCGACAATTCATCCACCCAGAA
GTCCTTAGAGCTGCTTCTGGACTACGCATACTCCTCCCGGGTCATCATCAATGAAGAAAATGCTGAGTCCCTCCTGGAGGCTGGTGACA
TGCTGGAGTTTCAGGACATCAGGGATGCATGTGCAGAATTCCTGGAGAAGAACCTGCATCCCACTCACTGCTTAGGGATGCTGCTGCT
GCTGACGCCCCACAGTGCACCAAGCTGTACGAATCTCCTGGAGAATGTGTCTGAGCACTTCCAAACCATCCGGAAGAATGAAGAT
TTTCTCCAGTTGCCCGAGGACATGGTGGTGCAGCTCCTGTCCAGCGAAGAACTGGAGACAGAAAGACGAAAGGCTGGTGATGAGTCTG
CAATGAATGGATTAGCTATGACCTGAAGAAACGCTACTGTTACCTCCAGAACTGTTGCAGACAGTGAAGGCTGGCCCTTCTTCTGCTG
CATCTATCTCATGGAGAAGCTGGCAATGGAAGAACTCATCACAAGCAGAGAAAGAGTAAGGAGATTGTGGAAGAGGCCATCCGGTGC
AACTAAAAATCTTACAGAAATGACGGCGTGGTCACCAAGTCTCTGTCTCGCCCTCGGAAAACCTGGCCACGCGCTGTCTCCTGGGAG
GGCAGACTTTCATGTGTGACAAACTGTACTTGGTAGACAGCAAGGCTAAAGAAATCATTCCTCAAGGCTGACATCCACCCGAGGAA
AGAGTTCAAGTGTGCGATTGGTGTGCAAGTGTATATTACTGGGGGCGGGGATCAGAGAACGGAGTCTCAAAGATGTCTGGGTT
TATGATACCTGCATGAGGAATGGTCCAAAGGCTGCCCCATGCTGGTGGCCAGGTTGGCCATGGATCAGCCGAACCTGAAGCACTGCC
TGTATGTGGTGGGCGGACACAGCTGCAACTGGCTGCCTCCAGCCTCTCCTTCACTCTCTTAAAGCAAGTAGAACAATATGACCC
CACAAACCAAAATGGTCCCGAGGACCTCGAGAGAGGCTGTCAGCAATGCTGCTGAGTGAGCGCCAGCTCAAGCTGTTCGCT
TTCGGAGGTACCAGCGTAAGCCACGACAAGCTTCTTAAGGTTCAAGTGTATGACCAAGTGTGAAAACAGATGGACAGTTCAGCCACCT
GTCCCCAGCCTGGCGTTACACAGCCGACGCTGTGCTGGGGAACAGATTTCATCATGGGTGGGGATACAGAATTCCTCAGCCTGCTC
TGCTTACAAGTTCAACAGTGAACCTTACCAGTGGACCAAGGTAGGAGACGTGACAGCCAAGCGCATGAGCTGCCATGCCGTGGCCTCC
GGGAACAGCTTTTACGTGGTTGGAGGATCTTCGGCATTGAGCGCTGCAAGACGTTGGACTGTTACGATCCGACTTTCAGTGTGGA
ACAGCATAACACGGTTCCTTACTCTCTGATCCCTACCGCGTTCGTCAGCACCTGGAAACACCTGCCTTCTCAATGCAGAGCAAACCA
AGGAGAGCAGAGTGTGACTCACTCTGACACACACGAGATGTGCTTCTGCTCTGAAGAAGGCAAGTTTAATGAAGAGAAAGAAAAAA
AACAGGAGCAGTGTCTATAAATCTCCTCGAATACCATTTGGCTGCACCTTGTGAACACTCTTAAAGTGGACATGAAGGAAGGGGTGGGG
GAGGGGCGGGTTTTTTTTTTTCCCAATGTAAGTAGAGGCTTAAATATGAATGACTGAACCTGTGATCTAGTCTAGTCTTGTCTG
GTAATGTGGATTAATGTGACGCTTAATCAGCCCCCAAGGGAGAGAGAAGCTGGGCTTTTCCCTTGTGTGACCTCATTACGCTTCT
GATTTCCACGGCCCCACCATTTATGTGCAAGATTTGAAATGGTTGTCAGCTTCTCTGAGGACTGAGCTTGAAGCCTCTCTTCCAGCT
GCTGTTAGAGATGCAGAGCCGAGCAAGGGTCAGGAGGGAAGCTGACCTGGCTGACTGAATAAGGGGGAACCCAGGACTCTCCACTCA
TCTCCAAGACTTGTGGTCCCGAGGACGCTCGGAAACAATGGGGACATTGTTGGTGGCTGTTTGGTAGATCTATTATAGTGACT
TTAAACCTTCTCTTGGCTGTAAAGAAATGTGTTCTAGATTAGCTATTTATTGTTTGGCGCTGCATGCTGAAACAGTGCTTACGTTG
TTGCTCCACGTGTATGGGCTGTGGAGACGGTCGTATGTTTGCACATTTCGTAGCTGTTGGTGTGCTTTGCCGTGTGCGTGACACGC
AGACACACAAAAAGAAAACCTTTGGGACTATAATTTGGAGGATAAGTAAAGGGTGGGTGGGGAAGGGTGCATTTTGAAGTGTCCGGA
CAGAGACAGATTCTGAGATGGAAACTTAAATTTACATCCAGAGGCGAGGAAACTATGAAGTCAACCTTCCCTAGACCACCCCTTACTGA
GGTTCCACGGTCACACTGACGGCAGGACCCACAAGGGCAGGGTATTGGTCTGCCCTCCTTTCTCCTGTCTGTCTGACTTACCTAAGT
TGGTCTCGGCTGCTGACACTTGGAAAGGACCAAATTAATTGATAGTATTTCCCGCTGTTTGTGTAATAGCCTGAAACCTTGGAGAGGT
TCCAGAATACTTCTGTATATAGGGCACAGGTGAAGACATTGTCCAAGCTTATTTATTTATCTATTTATTTACCCTGGCTGAGTAACC
ACACCAGTAGGGGGGAAAACCTAAATGTGTTGAGTGTAAACAAAGTCAACAGCCTGGCTAGAAAATTCCTCCCTGGAAAACATCCATTTTG
ATACAATGTAAACGTTAGTGTTCACCCCTAGATACATGTTGAAAGAGAGCTTTGGTACGCGGAAGTGGCATCTTTGGTCACACACCAT
GCCAAAGTGAAGAGGTGGCCAGTGGAGGTCTCCCGTCTGTGCGGATCATTTGTGAATACATTCTTTGCCCTCTTAAGTACTTGT
TACTAAACATGTGCAAGTGGTAGGTATTAGTGTAGATCAGAGTGGGCACTTCCCTGGGGATCTGGGGAAGACCAGAGCTTGCAACTCT
GCCTGTTTTGATCCCTATTCTTCTCAGTGTGATTTAAAAAAAATAGGATTAAAGACAGATAACCACTTTACATTGTGAGTGTGTTT
GCCTGTCTAACGACAGATAATTCCTTAACATTTCTTTTACCTTAGTACTTTAGGCTAATTATACAGCTGTGTCTATGCCATGAGTA
AGTGGACTGTAGTCCGACCAAAAAGAAAACAAATGAGCCGTTGGACATTTGTGCAAGTCAAGTCTTCTGGTCTTAGATGTATCCTAAGCA
GTAAGTGTCTGATTGTACCTGGTGGTATGATCAGTTGTCTGCTGAGTGTCTCAGCTCCACAGTTTACAATGCAAAATCTGTCTCAAGA
TCTTCAAGTCACTGTCTGTGAGAGCAGGGAGAATCTCTGAGCTGTTTCAAGTTGTGGCCCGGCTTGAATCCTCTGTTAATTACT
GTGTGAGCCAGAGGGAGCTGCCAGCAAGGGTGGGCCCCAGCCGCGAGGGGAACCTTTAGACTCCCGCTCATTCATTGATCTAG
GCATTCGGGCTGTACTTGTACCATCTCTGCCCTGTGAAATGTCCACACTTTGAAGCAATACAAATTCACAGCACAGTACACACAAA
AACCTTGGCATAAGACAGGGGAGGTTCTTCTTATTTTGTGAGCCGTTGCCCTGGAAACGGGATACAAAGGGCAGCCTTCCACTTCTG
GCATAATGTGGAGGCTCTTTTCTCAGGCTTGACACCTGTCTGAAATAAGAGTGATTAGAGCCGATATAATCCCTCTCTTGGCTATTG
AATATGTGGTTACATACCAAAACCTGTAGAAGTTAGAAGACGGTGCAGGCGGCTCA
```

Figura 5: Seqüência do transcrito completo de NRP/B de rato.

```

329 atgtccgtcagcgtgcatgagaacgcgaagtcacgggcccagcagc
M S V S V H E N R K S R A S S
374 ggctccatcaacatctacctgtttcataagtcttctatgcgac
G S I N I Y L F H K S S Y A D
419 agtgtttctactcacttgaaaccttctgcgtcagcagagctcttt
S V L T H L N L L R Q Q R L F
464 acagaagtcctcctcatgcgggaaacaggaccttcccttgccac
T D V L L H A G N R T F P C H
509 cgggcagtggttgctgcgcgcgtacttcgaagccatgttc
R A V L A A C S R Y F E A M F
554 agtgggtgacctgaaagagagccaggacagtgaggtgaacttcgac
S G G L K E S Q D S E V N F D
599 aattccatccaccagaagtccttagagctgcttctggactaogca
N S I H P E V L E L L L D Y A
644 tactcctccgggttcctcatcaatgaagaaatgctgagtcctc
Y S S R V I I N E E N A E S L
689 ctggaggctgggtgacatgtggagtttcaggacatcaggatgca
L E A G D M L E F Q D I R D A
734 tgtgcagaatttccggagagaacctgcctcccaactgctta
C A E F L E K N L H P T N C L
779 gggatgctgctgctgacgcccacagtgccacagctgtac
G M L L L S D A H Q C T K L Y
824 gaactctcctggagaatgtgctgagcaactccaaacctccgg
E L S W R M C L S N F Q T I R
869 aagaatgaagattttctccagttgccccaggacatgggtgcag
K N E D F L Q L P Q D M V V Q
914 ctctgtccaggaagaactggagacagaagcgaaggctggg
L L S S E E L E T E D E R L V
959 tatgagctgcaatgaactggatagctatgacctgaagaaacgc
Y E S A M N W I S Y D L K K R
1004 tactgttacctccagaactgttgacagacagtgaggtggccctt
Y C Y L P E L L Q T V R L A L
1049 ctctcctccatctatctcattggagaacgtggcaatggagaactc
L P A I Y L M E N V A M E E L
1094 atcaccagcagagaagaagagtaggagattgtggaagagccatc
I T K Q R K S K E I V E E A I
1139 cgggtgcaaaactaaaatcttacagaatgaaggcgtggtccagc
R C K L K I L Q N D G V V T S
1184 ctctgtgctcgcctcggaaactggccacgcctgttctcctg
L C A R P R K T G H A L F L L
1229 ggaggccagactttctatgtgacaaactgtacttggttagaccag
G G Q T F M C D K L Y L V D Q
1274 aaggctaaagaaatcattcccaaggctgacattccagcccagg
K A K E I I P K A D I P S P R
1319 aaagagtccagtgctgctgcatggctgcgaagtgatattact
K E F S A C A I G C K V Y I T
1364 ggggggggggagcagagaacggagctctcaaaagatgtctgggtt
G G R G S E N G V S K D V W V
1409 tatgataccctgcagatggaatgggtccaaggctgccccatgctg
Y D T L H E E W S K A A P M L
1454 gtggccagggttgccatggatcagccgaactgaagcactgcctg
V A R F G H G S A E L K H C L
1499 tatgtggtcggtgggacacagctgcaactggctgctccagcc
Y V V G G H T A A T G C L P A
1544 tctcctcagctctctctaaagcaagtgaacaatatgacccaca
S P S V S L K Q V E Q Y D P T
1589 accaaacaaatggaccatgttagccccactccgagaagggtgacgc
T N K W T M V A P L R E G V S
1634 aatgctgctgtagtgagcgcgaagctcaagctgttgcctttcgga
N A A V V S A K L K L F A F G
1679 ggtaccagcgtgaagccacagacaagcttccctaaaggttcagtgat
G T S V S H D K L P K V Q C Y
1724 gaccagtgtaaaacagatggacagttccagccacctgtccccag
D Q C E N R W T V P A T C P Q
1769 ccctggcgttacacagccgcagctgtgctggggaaacagatttt
P W R Y T A A A V L G N Q I F
1814 atcatgggtgggatacagaattctcagcctgctgcttacaag
I M G G D T E F S A C S A Y K
1859 ttcaacagtgaaacttaccagtggaaccaaggttaggagacgtgaca
F N S E T Y Q W T K V G D V T
1904 gccaaagcctgagctgcatgcgtggcctccgggaacaaagctt
A K R M S C H A V A S G N K L
1949 taactggttgaggatacttcggcattcagcgtgcaagacgttg
Y V V G G Y F G I Q R C K T L
1994 gactgttacagatccgaatttagatgtgtggaacagcataaccag
D C Y D P T L D V W N S I T T
2039 gtccctactctctgacccctacgcgttctgacagccctggaaa
V P Y S L I P T A F V S T W K
2084 cactgccttctaa 2098
H L P S *

```

Figura 6: Determinação da fase aberta de leitura de NRP/B de rato através do Programa ORF Finder do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orf>).

A sequência de 4545pb codificante para NRP/B de rato foi analisada neste programa, sendo encontrada uma ORF (*Open Reading Frame*) na fase de leitura +2, de 1.767pb. As outras ORFs encontradas nas 6 fases de leitura pode ser observada no quadro acima (caixas verdes). A sequência de nucleotídeos da maior fase de leitura está descrita ao lado, com a sequência de proteína correspondente a 589 aminoácidos.

Na figura 7 observa-se a estrutura do cDNA de NRP/B de rato, a localização da fase aberta de leitura e dos 3 exons da sequência (dos seguintes tamanhos: 277pb, 1.813pb e 2.950pb), que se estende por mais de 12kbp do genoma.

Figura 7: Identificação do gene NRP/B de rato.

(A) Estrutura do cDNA de NRP/B de rato. A ORF está indicada como o retângulo preto. À direita, o número de acesso da sequência de cDNA depositada. (B) Diagrama da estrutura do gene de NRP/B. Os retângulos representam os exons; a região completa se expande por mais de 12kbp de DNA genômico. Os 3 exons e 2 introns estão numerados e seus respectivos tamanhos em pares de base, indicados abaixo.

O alinhamento da sequência de NRP/B de rato com seus ortólogos (Figura 8) mostra uma grande identidade da sequência de rato com as sequências dos outros organismos, confirmando a conservação do gene durante a evolução. A proteína NRP/B de rato apresenta identidade de quase 100% com os ortólogos humano e murino já descritos (99,6% e 99,8%, respectivamente).

A análise de domínios no programa *Hits* (Pagni et al., 2001) mostrou a existência dos domínios já descritos nas sequência correspondentes de humano e camundongo: motivo *Kelch*, domínio *BTB/POZ* e motivo *Back*. O domínio *BTB/POZ* está envolvido em dimerização homomérica e heteromérica; sua estrutura é de um *cluster* de α -hélices flanqueados por pequenas β -sheets. O motivo *kelch* está relacionado com interações proteína-proteína e com citoesqueleto. Já o motivo *Back*, recentemente descrito (Stogios & Prive, 2004), apresenta um papel estrutural e funcional na degradação protéica mediada por Culina-3. Na Figura 8, observa-se o alinhamento da sequência de NPR/B de rato com seus ortólogos e a localização dos motivos *BTB/POZ*, *Back* e *Kelch*.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment
Bos -----MS 2
Canis MPAMPDARAVAGPQAGSRARAGSPECPQVTQKPPRCWGTGSPCPVSSADAGEVRGNTMS 60
Homo -----MS 2
Rattus -----MS 2
Mus -----MS 2
Xenopus -----MS 2
*****
Bos VSVHENRKSRRSSGSINIYLFHKSSYADSVLTHLNLLRQRLFTDVLHAGNRTFPCHRA 62
Canis VSVHENRKSRRSSGSINIYLFHKSSYADSVLTHLNLLRQRLFTDVLHAGNRTFPCHRA 120
Homo VSVHENRKSRRSSGSINIYLFHKSSYADSVLTHLNLLRQRLFTDVLHAGNRTFPCHRA 62
Rattus VSVHENRKSRRSSGSINIYLFHKSSYADSVLTHLNLLRQRLFTDVLHAGNRTFPCHRA 62
Mus VSVHENRKSRRSSGSINIYLFHKSSYADSVLTHLNLLRQRLFTDVLHAGNRTFPCHRA 62
Xenopus VGIHENRKSRASTGSMNIYLFHKSSYADSVLTHLNLLRKQCLFTDVLHAGNRSFPCHRA 62
*:*****:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Bos VLAACSRYPFAMFSGGLKESQDSEVNFDNSIHPEVLELLLDYAYSSRVIINEENAESLLE 122
Canis VLAACSRYPFAMFSGGLKESQDSEVNFDNSIHPEVLELLLDYAYSSRVIINEENAESLLE 180
Homo VLAACSRYPFAMFSGGLKESQDSEVNFDNSIHPEVLELLLDYAYSSRVIINEENAESLLE 122
Rattus VLAACSRYPFAMFSGGLKESQDSEVNFDNSIHPEVLELLLDYAYSSRVIINEENAESLLE 122
Mus VLAACSRYPFAMFSGGLKESQDSEVNFDNSIHPEVLELLLDYAYSSRVIINEENAESLLE 122
Xenopus VLAACSRYPFAMFSGGLKESQANEVNFDNSIAVHPEVLELLLDYAYSSRVIINEENAESLLE 122
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Bos AGDMLFQDIRDACAFLKLNHPTNCLGMLLLSDAHQCTKLYELSWRMCLSNFQTIKRN 182
Canis AGDMLFQDIRDACAFLKLNHPTNCLGMLLLSDAHQCTKLYELSWRMCLSNFQTIKRN 240
Homo AGDMLFQDIRDACAFLKLNHPTNCLGMLLLSDAHQCTKLYELSWRMCLSNFQTIKRN 182
Rattus AGDMLFQDIRDACAFLKLNHPTNCLGMLLLSDAHQCTKLYELSWRMCLSNFQTIKRN 182
Mus AGDMLFQDIRDACAFLKLNHPTNCLGMLLLSDAHQCTKLYELSWRMCLSNFQTIKRN 182
Xenopus AGDMLFQDIRDACAFLKLNHPTNCLGMLLLSDAHQCTKLNELSWKMLNLFQTIKCT 182
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Bos EDFLQLPQDMVVQLLSSELETERLIVYESAINWISYDLKKRYCYLPELLQTVRLALLP 242
Canis EDFLQLPQDMVVQLLSSELETERLIVYESAINWISYDLKKRYCYLPELLQTVRLALLP 300
Homo EDFLQLPQDMVVQLLSSELETERLIVYESAINWISYDLKKRYCYLPELLQTVRLALLP 242
Rattus EDFLQLPQDMVVQLLSSELETERLIVYESAMNWIYDLKKRYCYLPELLQTVRLALLP 242
Mus EDFLQLPQDMVVQLLSSELETERLIVYESAMNWIYDLKKRYCYLPELLQTVRLALLP 242
Xenopus EDFLQLPKDLVVQLLSNELETERMVIYESAMNWIHYDLNKRHCYLSSELLQTVRLALLP 242
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Bos AIYLMENVAMEELITKQRKSKEIVEEAIKCKLKILQNDGVVTSLCARPKTGHALFLLGG 302
Canis AIYLMENVAMEELITKQRKSKEIVEEAIKCKLKILQNDGVVTSLCARPKTGHALFLLGG 360
Homo AIYLMENVAMEELITKQRKSKEIVEEAIKCKLKILQNDGVVTSLCARPKTGHALFLLGG 30
Rattus AIYLMENVAMEELITKQRKSKEIVEEAIKCKLKILQNDGVVTSLCARPKTGHALFLLGG 302
Mus AIYLMENVAMEELITKQRKSKEIVEEAIKCKLKILQNDGVVTSLCARPKTGHALFLLGG 302
Xenopus AIYLMENVAMEELIKQKSKSELVEEAIKCKLKILQNDGVVTSLCARPKTGHALFLLGG 302
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Figura 8: Alinhamento da sequência de NRP/B de rato (gi50347091) com seus ortólogos no Programa Clustal W (1.85).
Os organismos e números de acesso correspondentes para esta análise foram: *Homo sapiens* (gi4505461); *Bos taurus* (gi76652957); *Canis familiaris* (gi73950299); *Mus musculus* (gi40254359) e *Gallus gallus* (gi50787132). Os números mostram a posição dos resíduos na proteína em relação à primeira metionina da sequência de NRP/B. Resíduos de aminoácidos com “*” são idênticos, resíduos conservados são representados com “.” e resíduos com substituições semi-conservativas estão representados com “-”. O traço único sobre a sequência denota o domínio BTB/POZ; o traço duplo indica o domínio BACK; e os pequenos traços denotam o motivo de dupla-glicina encontrada em todos os domínios Kelch.

A sequência obtida foi, então, depositada no Banco de Dados do *GenBank* do NCBI, no início de julho de 2004, sendo aceita no dia 21 de julho e recebendo o N° de Acesso AY669396 para a sequência de nucleotídeos (Figura 9A) e AAT75221 (Figura 9B) para a sequência de proteína. A Figura 9C mostra a página do BLAT, sendo que a sequência depositada (indicada com a seta verde) está alinhada no cromossomo 2q12 do genoma de rato.

Figura 9: Depósito do gene completo de NRP/B de rato no Genbak (NCBI).

(A) Página do GenBank, mostrando o depósito do gene NRP/B de rato de 4.545pb aceito em 21 de julho de 2004 (Número de acesso AY669396) (B) e a sequência protéica (Número de acesso AAT75221). (C) Interface do BLAT, mostrando alinhamento do gene depositado no Genoma de Rato (indicado pela seta), no cromossomo 2q12. ESTs de rato com *splicing* e mRNAs de outros organismos já descritos também estão respresentados. As caixas pretas indicam os exons e a linha pontilhada os introns do gene.

4.2. Expressão de NRP/B em células ST1 e em outros tecidos de rato

Para a análise funcional de NRP/B na reversão fenotípica das células ST1 sob tratamento com o hormônio Hidrocortisona, inicialmente, foi analisado o seu perfil de expressão tanto ao nível de mRNA quanto de proteína (Figura 10).

Para o ensaio de Northern blot (Figura 10A), foram utilizados 15µg de RNAtotal de células ST1, mantidas em meio de careciamento contendo 0,2%SFB, não tratadas ou tratadas com Hy (100ng/mL) por diferentes períodos de tempo (1, 3, 5, 10 e 24h). Como controle interno para normalização da expressão do mRNA de NRP/B foram utilizados os níveis de expressão da fosforriboproteína 36B4. Como controle da qualidade do RNA aplicado para fracionamento em gel desnaturante, observou-se a intensidade das bandas das subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal coradas com brometo de etídeo (EtBr), os quais encontravam-se íntegros, sem sinal de degradação, e com quantidades comparáveis condizentes com os cálculos da quantificação espectrofotométrica. O gráfico (Figura 10B) representa a quantificação relativa dos níveis de NRP/B em relação aos níveis do controle interno 36B4, observando-se a baixa (quase inexistente) expressão de NRP/B nas células carenciadas sem tratamento e uma indução do nível de expressão de NRP/B durante o tratamento com Hy, atingindo um aumento de 7 vezes após 5h de tratamento em relação ao basal não tratado com hormônio (como já descrito em (Vedoy & Sogayar, 2002)) e o acúmulo do transcrito durante o tratamento prolongado (até 24h).

Figura 10: Ensaios de Northern e Western blot para análise da expressão de NRP/B em células ST1 sob tratamento com hormônio glicocorticóide Hidrocortisona (Hy).

(A) Membrana contendo 15mg de RNA total de células ST1 carenciadas por 24h com 0,2%SFB (0h) e tratadas com Hy (1h, 3h, 5h, 10h e 24h) foi hibridizada com sondas radioativas correspondentes aos mRNAs de NRP/B e o controle interno 36B4. Abaixo estão representadas as bandas correspondentes às subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal. (B) Gráfico representando a quantificação relativa dos níveis do transcrito do gene NRP/B em relação ao nível de expressão do controle interno 36B4. (C) Membrana contendo 50mg de extrato total de células ST1 sob o mesmo tratamento com Hy foi utilizada para avaliar a expressão de NRP/B ao nível proteico. Os níveis da proteína α -tubulina foram utilizados como controle dos níveis de proteína em cada canal. (D,E) Gráficos representando a quantificação relativa da banda superior e da banda inferior de NRP/B em relação ao nível de expressão de α -tubulina. Experimentos representativos de 3 réplicas independentes.

Para analisar, ao nível protéico, a modulação da expressão de NRP/B por hidrocortisona nas células ST1 (Figura 10C), foram utilizados, para o ensaio, 50µg de extrato protéico total de células ST1 mantidas em meio carenciado para soro (0,2%SFB) por 24h, não tratadas ou tratadas com Hy (100ng/mL) por diferentes períodos de tempo (1h, 3h, 5h, 10h e 24h). Como controle interno para normalização da expressão de NRP/B, foram utilizados os níveis de expressão de α -tubulina. A banda correspondente à NRP/B é dupla, referente às duas isoformas já descritas de 57 e 67 kD. As duas isoformas foram encontradas por ensaios de imunoprecipitação de lisados totais de neurônios primários e das linhagens SH-SY5Y (células de neuroblastoma humano) e PC-12 (células de pheochromocitoma de rato), enquanto que em extratos nucleares de neurônios primários, somente a isoforma de 67 kD foi encontrada (Kim et al., 1998). Os gráficos (Figura 10D e 10E) representam a quantificação relativa das bandas de 67kD e 57kD de NRP/B frente aos níveis de α -tubulina. Observa-se um aumento de cerca de 2 vezes dos níveis protéicos de NRP/B em relação à amostra controle das duas isoformas. Estes dados indicam que, aparentemente, há um discreto aumento dos níveis protéicos de NRP/B somente após 5h de tratamento, refletido em ambas isoformas. Não se observa uma indução da expressão após tratamento com hidrocortisona, como se observa ao nível de mRNA. Este ensaio demonstra também que a proteína está expressa nas células carenciadas para soro e sem tratamento com hormônio, condição onde os níveis de mRNA era baixo e representado por um fraco sinal de NRP/B em ensaios de Northern blot.

Na tentativa de se elucidar a regulação da expressão da proteína NRP/B durante o tratamento com Hy, foram utilizados extratos enriquecidos para proteínas citoplasmáticas e nucleares das células ST1 mantidas em meio carenciado contendo 0,2%SFB, não tratadas ou tratadas com Hy (100ng/mL) por diferentes períodos de tempo (1h, 3h, 5h, 10h e 24h). O ensaio de Western blot (Figura 11A) foi realizado com 30µg de cada extrato e, como controle interno para normalização da expressão de NRP/B, foram utilizados os níveis de expressão de α -tubulina. Nota-se que as bandas referentes às isoformas da proteína NRP/B estão presentes tanto nos extratos enriquecidos para proteínas

citoplasmáticas como nucleares, e, visualmente, a modulação da expressão de NRP/B por hidroclortisona é semelhante para ambas isoformas.

Figura 11: Ensaio de Western blot para análise da expressão de NRP/B em extratos citoplasmáticos e nucleares de células ST1 sob tratamento com o hormônio glicocorticóide hidroclortisona (Hy).

(A) Membrana contendo 30mg de extratos citoplasmático e nuclear de células ST1 carenciadas para soro por 24h e tratadas com Hy por períodos diferentes de tempo (indicado na figura) foi utilizada para avaliar a expressão de NRP/B. Os níveis da proteína α -tubulina foram utilizados como controle dos níveis de proteína em cada canaleta. (B,C) Gráficos representando a quantificação relativa das isoformas de 67kD (B) e 57kD (C) de NRP/B em relação ao nível de expressão de α -tubulina nos extratos citoplasmáticos. (D,E) Gráficos representando a quantificação relativa das isoformas de 67kD (D) e 57kD (E) de NRP/B em relação ao nível de expressão de α -tubulina nos extratos nucleares.

Os gráficos das Figuras 11B e 11C representam a quantificação relativa da banda superior de 67kD e da inferior de 57kD, respectivamente, nos extratos enriquecidos para proteínas citoplasmáticas. Verifica-se que após 5h de tratamento, ocorre uma diminuição no nível de ambas isoformas, seguido de um aumento da intensidade das bandas no final do tratamento com o hormônio. Já em relação aos níveis das duas isoformas de NRP/B nos extratos nucleares (Figura 11D e 11E, isoformas de 67kDa e 57kDa, respectivamente), observa-se um aumento de 2 vezes dos níveis das bandas referentes à NRP/B após 3h de tratamento, uma queda após 5h de tratamento seguido de uma nova indução até o final do tratamento.

Para melhor avaliar a localização da expressão de NRP/B nas células ST1, foram realizados ensaios de Western blot, utilizando-se extratos protéicos fracionados para diferentes compartimentos celulares conforme descrito em Métodos (item 3.2.12.3). A Figura 12 representa o resultado do experimento, onde foram utilizados 15µg de extratos enriquecidos para proteínas da fração solúvel do citoplasma (CSK), para proteínas da fração nuclear solúvel e do citoesqueleto (RSB), para proteínas associadas à cromatina (CRO) e da matriz nuclear (MN) de células ST1 crescendo em meio contendo 0,2%SFB por 24h e de células ST1 carenciadas e tratadas com Hy por 24h. Como controle do protocolo de extração de proteínas, foi analisado o enriquecimento para histonas no extrato correspondente às proteínas associadas à cromatina. As histonas estão associadas ao DNA, fazendo parte do nucleossomo. Os extratos foram, então, fracionados em gel de acrilamida 15% e o gel corado com Coomassie Blue. Na Figura 12, observam-se as bandas correspondentes às histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4 no extrato de proteínas associada à cromatina. As duas isoformas de NRP/B foram encontradas de forma mais abundante nas frações citoplasmáticas (CSK), de proteínas do citoesqueleto e nucleares (RSB) e da matriz nuclear (MN) e com menor abundância na fração de proteínas associadas à cromatina (CRO). Já foi descrito anteriormente que NRP/B está localizado principalmente no citoplasma, co-localizado com actina (Hernandez 1997) e no núcleo, como parte da matriz nuclear (Kim 1998), dados consistentes com os resultados obtidos nas Figuras 11 e 12. Os níveis de NRP/B após tratamento com hidrocortisona na fração de proteínas

citoplasmáticas aparentemente se apresentam um pouco mais elevados quando comparados com os níveis das células sem tratamento com Hy, considerando-se a quantidade de proteínas aplicadas no gel corado com Coomassie Blue.

Figura 12: Localização sub-celular de NRP/B.

15mg de extratos de proteínas citoplasmáticas (CSK-A), proteínas nucleares do citoesqueleto (RSB), proteínas associadas à cromatina (CRO) e proteínas de matriz nuclear (NM) de células ST1 carencidas para soro por 24h e tratadas com Hy por 24h foram fracionados em gel SDS-PAGE 15% e corado com Coomassie Blue. As posições das histonas localizadas na fração de proteínas associadas à cromatina estão indicadas na figura. O nível de expressão de NRP/B foi avaliado por ensaio de Western blot nos mesmos extratos enriquecidos para proteínas de diferentes compartimentos celulares.

O padrão de expressão de NRP/B foi avaliado, também, por reação de PCR em um painel contendo cDNAs de oito diferentes tecidos de rato (coração, cérebro, baço, pulmão, fígado, músculo esquelético, rim e testículo), denominado *rat MTC panel* (Clontech, Palo Alto, CA). Para amplificação de NRP/B foram utilizados *primers* NRP/B ORF For e NRP/B Rat Rev, que amplificou uma região de 1,1kb. *Primers* para amplificação de GAPDH foram utilizados conforme recomendações do kit, para a normalização da expressão de NRP/B. Na Figura 13, observa-se a expressão de NRP/B somente no tecido cerebral, demonstrando a expressão específica no cérebro. A expressão de GAPDH é sabidamente maior em músculo esquelético e menor em testículo (informações adquiridas no manual do kit).

Figura 13: Padrão de expressão de NRP/B em diferentes tecidos de rato.

Amostras de cDNA de 8 diferentes tecidos de rato foram utilizados para avaliar a expressão de NRP/B com *primers* específicos e de GAPDH, como controle interno. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo. Cada número corresponde a diferentes tecidos: 1: coração; 2: encéfalo; 3: baço; 4: pulmão; 5: fígado; 6: músculo esquelético; 7: rim e 8: testículo. PM: Padrão de peso molecular 1Kb (kilopares de bases, Fermentas)

4.3. Análise Funcional de NRP/B em células ST1 – Superexpressão de NRP/B de rato em células ST1.

4.3.1. Amplificação e clonagem da região codificante de NRP/B de rato.

Para realizar a análise funcional do gene NRP/B durante o processo de reversão fenotípica tumoral-normal induzida por Hy nas células ST1, foi proposto avaliar a superexpressão de NRP/B através de uma construção, contendo o cDNA correspondente em vetor de expressão para células de mamíferos contendo a sua região codificadora. A amplificação da porção codificante de NRP/B foi realizada através de RT-PCR (Figura 14), utilizando-se os *primers* NRP/B RAT F e R, conforme descrito em Métodos (item 3.2.5), a partir de cDNA de células ST1 tratadas com Hy por 24h.

Figura 14: Amplificação da região codificante de r-NRP/B e vetores utilizados para clonagem.

Fracionamento em gel de agarose 0,8% do produtos de amplificação da região codificante de NRP/B (1,7kb). PM: Padrão de peso molecular 1Kb (kilopares de bases, Fermentas)

O produto de amplificação foi purificado para clonagem em vetor pLPCX de expressão em células de mamífero e no vetor de entrada do sistema Gateway pENTR2B (Invitrogen, para recombinação para outros vetores de expressão), como descrito em Métodos (item 3.2.5.1). Na Figura 15, observa-se o inserto e vetores purificados para a reação de ligação (15A) e o rastreamento de clones bacterianos positivos para a construção pela

metodologia Rinj (Figura 15B, análise de 12 clones aleatórios) e PCR de colônia (Figura 15C, análise de 4 clones) (descritos no item 3.2.7 de Métodos).

Figura 15: Clonagem e confirmação de clonagem da região codificante de NRP/B em vetor pLPCX de expressão em células de mamífero e no vetor de entrada do Sistema Gateway pENTR2B.

(A) Fracionamento em gel de agarose 0,8% dos vetores pENTR 2B (2,7 kb) e pLPCX (6,3 kb) após digestão com enzimas de restrição e reação de desfosforilação, e dos produtos de PCR para NRP/B (1,7 kb) digerido com enzimas de restrição para clonagem direcional nos vetores. (B) Fracionamento em gel de agarose 0,8% do *Screening* por RINJ de clones positivos para as construções pENTR2B/NRP/B (3,9kb) e pLPCX/NRP/B (8,0kb). Os 4 primeiros clones de cada construção foram escolhidos para preparação de DNA plasmideal. (C) Fracionamento em gel de agarose dos clones digeridos com enzimas de restrição para confirmação da clonagem. Clones de 1 a 4 contendo a construção pENTR2B/NRP/B (canaletas 1 a 4), digeridos com *Sal I* e *Not I*, liberando o vetor (2,7kb) e o inserto (1,7kb); Clones de 1 a 4 contendo a construção pLPCX/NRP/B (canaletas 5 a 8), digeridos com *Bgl II* e *Not I*, liberando o vetor (6,3kb) e o inserto (1,7kb) (OBS: A digestão do clone 3 foi realizada com uma amostra de DNA plasmideal pouco concentrada, porém pôde-se confirmar a clonagem pelo aparecimento de bandas fracas, as quais não aparecem na canaleta 6). PM: Padrão de peso Molecular Mix Ladder (Fermentas).

Para confirmar a identidade dos fragmentos amplificados e clonados, foi realizado o seqüenciamento dos mesmos, a partir da preparação plasmideal, utilizando *primers* ATTB1 e ATTB2 do vetor pENTR2B e *primers* pLPCX F e pLPCX R do vetor pLPCX, os quais flanqueiam a região de clonagem do inserto. As seqüências resultantes foram alinhadas contra o banco de seqüências não redundantes do NCBI, utilizando-se para tanto, o programa BLAST, confirmando-se a ausência de mutações na seqüência obtida. A transferência da região codificante de NRP/B do vetor de entrada (pENTR2B) foi realizada através de uma reação de transposição *in vitro*, catalisada pela enzima *LR clonase* (Sistema Gateway, Invitrogen), para o vetor de expressão pDEST12.2 em células de mamífero. A partir de um dos clones positivos para a construção, foi preparado o DNA plasmideal em média escala para posteriores ensaios de transfecção celular.

4.3.2. Transfecção estável de células ST1

Com a finalidade de se promover a superexpressão de NRP/B em células ST1, primeiramente foi realizada a co-transfecção com a construção pDEST12.2-NRP/B, assim como com o respectivo vetor vazio, que possuem um cassete de resistência à geneticina, juntamente com o vetor pX343, que confere resistência à higromicina, como descrito em Métodos (item 3.2.10.1). Após a transfecção, as células estavelmente transfectadas foram selecionadas com 350µg/mL de Higromicina e 500µg/mL de Geneticina. Na experiência anterior do laboratório, a linhagem ST1 apresenta sub-populações de células naturalmente resistentes a antibióticos. Por esta razão, para a seleção dos transfectantes estáveis, foram utilizados dois antibióticos com concentrações um pouco mais elevadas.

Após várias tentativas, foi possível isolar apenas um clone transfectante estável para a construção pDEST12.2-NRP/B e um clone transfectante estável para o vetor vazio pDEST12.2.

4.3.3. Transdução das células ST1 com as construções virais

Devido à dificuldade de isolamento de clones transfectantes estáveis com vetor plasmideal e com o intuito de se obter outros clones de células ST1 que superexpresssem o gene em estudo, foi proposto utilizar o sistema de vetor retroviral. Para a padronização das condições de produção viral e transdução das células ST1, foi utilizada a construção cedida pelo Dr. Marcos Demasi (pós-doutorando do nosso laboratório), onde a proteína EGFP foi clonada no vetor retroviral pLPCX. O protocolo descrito em Métodos descreve a metodologia otimizada para produção de partículas virais na linhagem empacotadora ϕ nx-Ampho, concentração das partículas virais por centrifugação e regime duplo de transdução em células ST1 utilizando MOI (*multiplicity of infection*) de 100. Tal protocolo permite a transdução de ~80% das células, sendo que após seleção com puromicina (3 μ g/mL) por 3 dias, a eficiência de transdução era próxima de 100%. Na Figura 16, observa-se a transdução das células ST1 com a construção pLPCX-EGFP em microscópio de contraste de fase fluorescente, sendo que a mesma região da cultura foi fotografada com luz branca e fluorescência, antes (Figura 16A e A') e após (Figura 16B e B') o tratamento com o agente seletivo. Este resultado com a construção contendo o gene EGFP, que possibilita acompanhar o processo de infecção de forma direta, demonstra que foi possível obter uma porcentagem alta, estimada entre 95-100%, de células transduzidas com o vetor de interesse, no caso de pLPCX-EGFP.

Figura 16: Células ST1 transduzidas com retrovírus contendo a construção pLPCX-EGFP em microscópio de contraste de fase invertido fluorescente.

(A) Células transfectadas com pLPCX-EGFP emitem fluorescência, quando iluminadas com lâmpada de mercúrio, usando filtro de excitação de 450-500nm. (aumento de 100X) (B) Células transfectadas com a mesma construção, sob tratamento durante 3 dias com Puromicina (3mg/ml) (aumento de 200X). (A' e B') Mesmo campo representativo, sob luz branca.

O mesmo protocolo foi utilizado para geração das populações de células ST1 transduzidas com o vetor vazio pLPCX e a construção pLPCX-NRP/B. A morfologia celular das populações de células ST1 infectadas com retrovírus pode ser observada na Figura 17, onde nenhuma alteração morfológica significativa pode ser observada, com referência à linhagem parental ST1. A população de células ST1 transduzidas com a construção pLPCX-NRP/B foi denominada ST1-NRP/B; a população de células ST1 transduzidas com a construção pLPCX-EGFP foi denominada ST1-EGFP e a população de células ST1 transduzidas com o vetor vazio, foi denominada ST1-pLPCX.

Figura 17: Morfologia celular das populações de células ST1 infectadas com retrovírus contendo as construções: pLPCX, pLPCX-NRP/B e pLPCX-EGFP.
Fotos de microscópio invertido, sob luz branca (aumento de 200X).

4.3.4. Caracterização dos transfectantes estáveis de células ST1 com vetor plasmideal e das populações transduzidas com vetor retroviral quanto à expressão de NRP/B.

Para avaliar a superexpressão de NRP/B nas células ST1, tanto com o vetor plasmideal quanto o retroviral, foi realizado um ensaio de Northern blot. As células foram expandidas para extração de RNA total pela metodologia citada no item 3.2.3. Cerca de 15µg de RNA de cada amostra foi aplicada no gel desnaturante, transferidas para nitrocelulose e sondadas com a região codificante de NRP/B e de GAPDH. Na Figura 18 observa-se a indução do transcrito de NRP/B nas células parentais ST1 tratadas com Hy (condição 1) por 3h e 5h (canaleta 1.B e 1.C, respectivamente), em relação às células não tratadas com o hormônio (canaleta 1.A) e em crescimento exponencial em 5%SFB (condição 2 – canaleta 2.A). Para o clone transfectante estável de células ST1 (condição 3) contendo o vetor plasmideal pDEST12.2-NRPP/B, há um sinal bastante fraco de indução do transcrito (canaleta 3.B), e nenhum sinal do transcrito no transfectante estável com o vetor vazio pDEST12.2 (canaleta

3.A). Observa-se para as populações de células ST1 transduzidas com retrovírus pLPCX-NRP/B, uma nítida diferença de expressão de NRP/B com uma única transdução (condição 4) e com a dupla transdução (condição 5), pois observa-se um sinal forte do transcrito de NRP/B na população de células ST1 duplamente transduzidas com retrovírus contendo a construção pLPCX-NRP/B (5.A) e um sinal mais fraco na população transduzida uma única vez (4.A). As células transduzidas com o retrovírus contendo vetor vazio pLPCX (4.B e 5.B) ou com a construção pLPCX-EGFP (5.C), não apresentaram sinal do transcrito de NRP/B.

Figura 18: Ensaio de Northern blot para confirmação da superexpressão de NRP/B em células ST1.

Membrana sondada com a região codificante de NRP/B e GAPDH, contendo RNA total de células ST1 nas seguintes condições: **1.** Sob tratamento com Hy. **1.A:** Células parentais ST1 carenciadas com 0,2%SFB **1.B:** tratadas com Hy por 3h e **1.C:** tratadas com Hy por 5h; **2.** Células parentais ST1 em crescimento exponencial em 5%SFB (**2.A**); **3.** Células ST1 transfectadas com vetor plasmideal pDEST12.2. **3.A:** transfectadas com vetor vazio. **3.B:** transfectadas com a construção pDEST12.2-NRP/B; **4.** Células ST1 transduzidas uma vez com o vetor retroviral pLPCX. **4.A:** transduzidas com a construção pLPCX-NRP/B. **4.B:** transduzidas com o vetor vazio **5.** Células ST1 transduzidas duas vezes com a o vetor retroviral pLPCX. **5.A:** dupla transdução com a construção pLPCX-NRP/B , **5.B:** dupla transdução com o vetor vazio pLPCX, **5.C:** dupla transdução com a construção pLPCX-EGFP. Condições 3, 4 e 5 em crescimento exponencial em 5%SFB.

A superexpressão de NRP/B nas células ST1 contendo o vetor retroviral pLPCX também foi confirmada por ensaio de PCR quantitativo, como pode ser observado na Figura 19. O transcrito de GAPDH foi utilizado como controle interno e o nível de expressão relativa de células ST1 carenciadas por 24h com 0,2%SFB (ST1c) foi utilizado como amostra calibradora. Observa-se um aumento da expressão relativa de NRP/B sendo induzida pelo tratamento das células parentais ST1 com Hy (3h e 5h). A expressão de NRP/B em células ST1 em fase exponencial de crescimento em meio contendo 5%SFB é

semelhante ao nível de expressão em células controle (ST1 carenciadas por 24h com 0,2%SFB). As células em crescimento exponencial que foram transduzidas uma única vez com o retrovírus contendo a construção pLPCX-NRP/B mostram uma expressão baixa de NRP/B, semelhante ao nível de indução das células ST1 tratadas com Hy por 3h, de aproximadamente 6 vezes. Já as células em crescimento exponencial, transduzidas duplamente com a construção pLPCX-NRP/B mostraram uma expressão muito elevada de NRP/B, cerca de 110 vezes maior que a expressão de NRP/B em células ST1 carenciadas para soro (ST1c). As populações de células ST1 transduzidas com vetor vazio (ST1 pLPCX) e com a construção contendo EGFP (ST1 EGFP) não apresentaram alteração na expressão de NRP/B, comparando-se com o controle (ST1c).

Figura 19: Ensaio de Q-PCR para confirmação da superexpressão de NRP/B em células ST1.

O transcrito de GAPDH foi utilizado como controle interno e o nível de expressão relativa de células ST1 carenciadas por 24h com 0,2%SFB (ST1c) foi utilizado como amostra calibradora. As barras indicam a expressão relativa do gene NRP/B em células ST1 nas seguintes condições: 1. Sob tratamento com Hy. 1.A: Células parentais ST1 carenciadas com 0,2%SFB 1.B: tratadas com Hy por 3h e 1.C: tratadas com Hy por 5h; 2. Células parentais ST1 em crescimento exponencial em 5%SFB (2.A); 4. Células ST1 transduzidas uma vez com o vetor retroviral pLPCX. 4.A: transduzidas com a construção pLPCX-NRP/B. 4.B: transduzidas com o vetor vazio 5. Células ST1 transduzidas duas vezes com a o vetor retroviral pLPCX. 5.A: dupla transdução com a construção pLPCX-NRP/B, 5.B: dupla transdução com o vetor vazio pLPCX, 5.C: dupla transdução com a construção pLPCX-EGFP. Condições 3, 4 e 5 em crescimento exponencial em 5%SFB.

Com os resultados destes ensaios, foi possível concluir que a transdução de NRP/B mediada por retrovírus foi mais eficiente comparando-se com a mediada por DNA plasmideal. Foi possível avaliar, também, a real necessidade da transdução dupla com os retrovírus nas células ST1. Dados

anteriores do laboratório mostraram a dificuldade de isolamento de transfectantes estáveis de células ST1 com vetores plasmideais, devido à presença de resistência a antibióticos na população de células parentais, além de alteração na morfologia, na proliferação celular e na resposta ao tratamento com hormônio Hy nos transfectantes estáveis com vetor vazio. Devido a estes fatos e à baixa expressão do transcrito de NPR/B detectado no ensaio de Northern blot no único transfectante estável isolado com a construção pDEST12.2-NRP/B, foi decidido utilizar somente a população de células ST1 transduzidas com retrovírus para a análise funcional do gene de estudo.

A expressão de NRP/B foi avaliada, também, por Western blot para a população de células ST1 infectada com retrovírus contendo a construção pLPCX-NRP/B (Figura 20). Foram utilizados extratos de proteínas totais das populações de células ST1 transduzidas com o vetor vazio pLPCX e com as construção pLPCX-NRP/B, mantidas em 5% SFB e confluentes no momento da lise. Como controle da quantidade de proteína aplicada em cada canaleta, foram utilizados os níveis de α -tubulina. Comparando-se os níveis protéicos de NRP/B entre as populações, verifica-se que há um nível de expressão evidentemente maior de ambas isoformas (67 e 57kD) de NRP/B nas células que estão transduzindo NRP/B exógeno.

Figura 20: Ensaio de Western blot para confirmação da superexpressão de NRP/B em células ST1.

Ensaio de Western blot para confirmação da superexpressão de NRP/B na população de células ST1 infectadas com retrovírus pLPCX-NRP/B (2) em relação à população de células ST1 infectadas com vetor vazio pLPCX (1).

Foi realizado, também, um ensaio de imunofluorescência nas células ST1-NRP/B para avaliar a superexpressão de NRP/B *in situ*. As células, fixadas

em lamínulas, foram tratadas como descrito em Métodos (item 3.2.4.12). Como pode ser observado na figura 21, a expressão de NRP/B é mais intensa na população das células transduzidas com a construção pLPCX-NRP/B, comparando-se com as células ST1 parentais.

Figura 21: Ensaio de imunofluorescência para confirmação da superexpressão de NRP/B em células ST1.

Expressão de NRP/B avaliada por imunofluorescência em células ST1 e na população de células ST1 infectadas com o retrovírus contendo a construção pLPCX-NRP/B. Aumento de 400X.

As populações transduzidas com vetor vazio pLPCX e com a construção pLPCX-EGFP já mostraram a manutenção na morfologia celular (Figura 17), porém também foram avaliadas quanto à resposta ao tratamento com Hy por ensaios de citometria de fluxo. As células foram coletadas após carenciamento com 0,2%SFB e após tratamento por 24h com Hy em meio 0,2%SFB. Nestas condições, as células ST1 parentais e as demais populações transduzidas com retrovírus apresentaram um acúmulo de células na fase G0/G1 do ciclo celular (80-90%), com uma concomitante redução no número de células na fase S (0,5-2,5%), ou seja, as células transduzidas com retrovírus não tiveram sua resposta frente ao hormônio Hy alterada (Figura 20).

Figura 22: Gráfico do ensaio de citometria de fluxo para avaliação do padrão de distribuição no ciclo celular das células ST1 parentais e transduzidas com retrovirus contendo vetor vazio ou a construção pLPCX-EGFP.

As células foram carenciadas por 24h a 0,2% SFB (células indicadas com 0,2%) e tratadas por Hy por 24h (células indicadas com 0,2% Hy). Análise de 10.000 células/amostra em duplicata.

4.3.5. Análise do efeito da superexpressão de NPR/B em células ST1

4.3.5.1. Curva de crescimento em substrato sólido

Curvas de crescimento das populações de células ST1 transuzidas com o retrovírus foram utilizadas para avaliar se a superexpressão de NPR/B provoca algum tipo de alteração na taxa proliferativa das células ST1, tanto na ausência como na presença de Hy. O tratamento de células ST1 com Hy provoca uma inibição da proliferação celular, com aumento no tempo de dobramento e diminuição da densidade de saturação (Armelin et al., 1983). Pode-se observar na Figura 23(A) que o perfil de crescimento das populações que superexpressam NPR/B, tanto na ausência como na presença de Hy, permanece semelhante àqueles da linhagem parental (ST1) e das populações infectadas com vetor vazio (pLPCX) e com a construção contendo EGFP (pLPCX-EGFP). A partir da curva de crescimento exponencial (Figura 23B), foi possível calcular o tempo de dobramento de cada população de células, sem tratamento com Hy e observar que uma leve tendência para um maior tempo de dobramento das células ST1-NRP/B em crescimento exponencial quando comparada com a linhagem parental ST1 (Figura 23C). O aumento do tempo do dobramento após o tratamento com Hy foi observado em todas as populações de células, não havendo diferença significativa entre elas. Foi possível calcular, também, a densidade de saturação de cada população no 9º dia da curva de crescimento (Figura 23D). Sob tratamento com Hy, todas as populações de células ST1 apresentaram uma diminuição semelhante àquela apresentada pelas células ST1 parentais. Na ausência do tratamento hormonal, também não foram observadas diferenças entre as populações celulares.

Através deste experimento de curva de crescimento, não foi possível detectar diferenças significativas na proliferação celular em substrato sólido de células transduzidas com a construção de expressão de NPR/B ou com o respectivo vetor vazio ou a construção contendo EGFP.

Figura 23: Curvas de Crescimento das células ST1 e das populações ST1-pLPCX, ST1-EGFP e ST1-NRP/B.

(A) Curva de crescimento das populações de células ST1 infectadas com retrovírus pLPCX, pLPCX-NRP/B e pLPCX-EGFP e da linhagem ST1 parental, na ausência e na presença de hormônio glicocorticóide Hy. Foram plaqueadas 5×10^4 células em duplicatas e mantidas em meio DMEM5%SFB. As células tratadas com Hy foram carenciadas com 0,2%SFB por 24h e tratadas por 24h com Hy. As coletas foram feitas nos tempos indicados no gráfico. As curvas representam a média de 2 experimentos independentes. (B) Curva de crescimento exponencial para cálculo (C) do tempo de dobramento celular das populações celulares (entre os dias 3 a 7). (D) A densidade de saturação foi calculada no último dia da curva de crescimento (dia 9).

4.3.5.2. Crescimento em suspensão de agarose

Para avaliar se a superexpressão de NRP/B provoca alteração no potencial tumorigênico das células ST1, o ensaio de crescimento em suspensão de agarose foi realizado de acordo com o protocolo descrito em Métodos (item 3.2.11.3). As colônias que se desenvolveram no ensaio de crescimento em substrato sólido, foram classificadas de acordo com o tamanho em: Grandes (de 300 a 600 μm); Médias (de 150 a 300 μm); Pequenas (de 0 a 150 μm). Após contagem e classificação das colônias, verificou-se uma diminuição do número de colônias pequenas e médias na população infectada com retrovírus contendo o gene de estudo NRP/B, sendo que não se observa diferença para as colônias grandes (Figura 24).

Figura 24: Crescimento em suspensão de agarose das células ST1 e das populações ST1-pLPCX e ST1-NRP/B.

Gráficos referentes ao número de colônias pequenas (0 a 150 μm), médias (150 a 300 μm) e grandes (300 a 600 μm), de células ST1, ST1 pLPCX e ST1 NRP/B plaqueadas numa densidade de 10^3 células. Fotos obtidas em microscópio invertido sob luz branca, do resultado do ensaio de células plaqueadas em densidades diferentes (10^3 e 10^4 células/poço). Aumento de 200X.

Estes resultados podem ser observados também, visualmente, nas fotos (Figura 24) do ensaio de crescimento em suspensão de agarose realizado diferentes densidades no plaqueamento das células (10^3 e 10^4 células/poço). Somando-se todas as colônias de todos os tamanhos de cada população celular analisada, observa-se, no gráfico da Figura 25, uma diminuição significativa ($p < 0,05$ – teste Tukey), nos dois ensaios independentes que foram realizados em duplicata (densidade celular plaqueada de 10^3 células / poço), entre o número de colônias formados na população que superexpressa NRP/B, em relação à linhagem celular parenta ST1 e à população contendo apenas o vetor vazio pLPCX.

Este ensaio foi realizado, também, após tratamento das mesmas células com hormônio glicorticóide Hy. Não houve formação de colônias para as condições estudadas (dados não mostrados).

Figura 25: Gráfico de Crescimento em suspensão de agarose das células ST1, ST1 pLPCX e ST1 NRP/B.

Os gráficos referem-se ao número total de colônias obtidas em dois experimentos independentes, com células plaqueadas na densidade de 10^3 células/poço. (*) Significância estatística (análise de variância com pós-teste de Tukey) do número de colônias obtidas da população de células ST1 que superexpressa NRP/B comparada com o número de colônias obtidas a partir da linhagem parental ST1 ($p < 0,05$).

4.3.5.3. Tumorigênese *in vivo*

Para avaliar o efeito *in vivo* da superexpressão do gene NRP/B nas células ST1, as populações celulares resultantes da infecção com retrovírus (pLPCX vazio, pLPCX-EGFP e pLPCX-NRP/B) foram injetadas no dorso de camundongos *nudes* (via subcutânea, conforme descrito em Métodos) e o crescimento da massa tumoral foi acompanhado semanalmente e medido com paquímetro. A Tabela 3 resume o resultado do experimento:

Tabela 3: Crescimento tumoral de células ST1 em camundongos *nude* (via subcutânea) após 6 semanas de injeção de 2×10^6 células no dorso dos animais.

Células	Incidência
ST1	6/6
ST1 EGFP	3/3
ST1 pLPCX	8/8
ST1 NRP/B	1/8

Primeiramente, observa-se que apenas um dos oito animais injetados com as células ST1 que superexpressam o gene NRP/B desenvolveu tumor. Os diâmetros dos tumores foram colocados num gráfico (Figura 26) onde observa-se que o crescimento deste tumor foi mais lento, quando comparado à linhagem parental e às populações de células infectadas com vetor vazio pLPCX e com EGFP. As fotos se referem aos camundongos na sexta semana após a injeção subcutânea das células.

Curva de crescimento da linhagem celular tumoral ST1 em camundongos *nude* (injeção subcutânea)

Figura 26: Ensaio de tumorigênese *in vivo*.

Curvas de crescimento dos tumores provenientes de células ST1 infectadas com retrovírus contendo vetor vazio pLPCX, EGFP e o gene de interesse NRP/B injetadas em camundongos nudes. As células tumorais (2×10^6 células/inoculação) foram injetadas no dorso do animal via subcutânea e o seu crescimento medido por 6 semanas. As fotos dos animais foram obtidas na sexta semana após a injeção subcutânea.

4.3.5.4. Ensaio de imunohistoquímica

Para avaliar se o efeito de diminuição do crescimento do tumor observado em camundongos *nude* deve-se realmente ao efeito da superexpressão do gene NRP/B nas células ST1, os tumores resultantes do ensaio de tumorigênese *in vivo* provenientes das populações celulares resultantes da infecção com retrovírus (pLPCX vazio e pLPCX-NRP/B) foram parafinados para serem submetidos a cortes histológicos e ensaio de imunohistoquímica. Os tumores foram dissecados e parafinados em colaboração com o laboratório da Pro^a Dr^a Suely Marie da Faculdade de Medicina da USP. Os cortes histológicos e o ensaio de imunohistoquímica foram realizados em colaboração com o laboratório de patologia bucal do Prof. Fabio Nunes na Faculdade de Odontologia da USP.

Na figura 27 observa-se o resultado do ensaio de imunohistoquímica nos cortes do tumor de células ST1 infectadas com o vetor vazio pLPCX e do tumor de células ST1 que superexpressam NPR/B. Há uma nítida marcação no citoplasma das células do tumor proveniente de células ST1-NRP/B, quando comparada com a ausência de marcação nas células ST1-pLPCX.

ST1 pLPCX

ST1 NRP/B

Figura 27: Ensaio de imunohistoquímica nos tumores formados no subcutâneo de camundongos nude.

Cortes de tumores formados no subcutâneo de camundongos nude a partir de injeção de células ST1 infectadas com retrovírus contendo vetor vazio pLPCX e o gene de estudo NRP/B, submetidos a ensaio de imunohistoquímica com o anticorpo específico NRP/B/Enc-1 (Pharmigen). A marcação pode ser observada em marrom nas células ST1/NRP/B.

4.4. Análise Funcional de NRP/B em células ST1 – Silenciamento de NRP/B de rato em células ST1.

Para o silenciamento do gene NRP/B, foi utilizada a metodologia de RNA de interferência (RNAi). Esta tecnologia baseia-se no fenômeno de RNAs dupla-fita poderem atuar como silenciadores de genes ao nível pós-transcricional. Observado inicialmente em *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998), o mecanismo baseia-se no princípio de que quando um dsRNA (RNA dupla fita) é introduzido em uma célula, este RNA é processado em pedaços menores (20-25 nucleotídeos) por uma RNase denominada *Dicer*, dando origem aos siRNAs (*small interfering RNAs*). Em seguida, as duas fitas dos siRNAs são separadas pela atividade da nuclease *RISC* (*RNA-induced silencing complex*), que guia uma das simples fitas resultantes para se anelar com a sequência de mRNA complementar. Após o pareamento, a *Dicer* cliva o mRNA com o qual houve o pareamento, silenciando, assim, sua atividade (Hannon, 2002; Hannon & Rossi, 2004; Sharp, 2001).

Os vetores lentivirais e as construções foram gerados em colaboração com o Dr. Ricardo G. Corrêa do grupo do Dr. Inder Verma do *Salk Institute for Biological Studies* em San Diego. Os vetores lentivirais pertencem a um tipo de retrovírus que possuem a capacidade de infectar células que estão ou não em divisão celular, devido ao complexo de pré-integração que atravessa a membrana nuclear intacta das células alvo. As únicas células às quais os lentivírus não têm acesso são as células quiescentes (fase G0 do ciclo celular) devido ao bloqueio da transcrição reversa (Amado & Chen, 1999). Recentemente, vários grupos descreveram a utilização de RNAi para silenciamento gênico em sistema de células de mamíferos (Brummelkamp et al., 2002; McCaffrey et al., 2002), mas o sistema de vetor lentiviral se mostrou eficiente para expressar RNAs em linhagens celulares e culturas primárias (Tiscornia et al., 2003). O sistema de expressão de vetores lentivirais compreende três plasmídeos: pVSVG (*G glycoproteins of vesicular stomatitis virus*) codifica o envelope viral heterólogo, sendo capaz de infectar vários tipos celulares; pMDL, que codifica as proteínas gag e pol e pREV, que codifica a proteína Rev, que regula a expressão lentiviral ao nível pós-transcricional. Três construções de RNAi para o gene NRP/B (271, 761 e 956) foram clonadas no

vetor lentiviral que codifica a proteína EGFP, possibilitando a fácil confirmação da transfecção e infecção celular sob microscopia de fluorescência. Os números das construções de RNAi para o gene NRP/B correspondem à posição em que a seqüência de dsRNA foi desenhada, baseada na seqüência de rato descrita neste trabalho.

4.4.1. Transdução das células ST1 com as construções lentivirais

Como descrito em Métodos (item 3.2.12), as construções pMDL, pRev, pVSVG, juntamente ou com os vetores pEGFP ou com uma das três construções de RNAiNRP/B, foram co-transfectadas (transfecção mediada por lipossomos) nas células empacotadoras 293T. Como controle da eficiência de transfecção, foi utilizada a construção contendo EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*). A eficiência de transfecção obtida foi diferente para cada construção utilizada, como pode ser observada na Figura 28. Observa-se que, visivelmente, as células 293T foram transfectadas com aproximadamente 80% de eficiência para pEGFP, 50% para RNAi 271 e 956 (foto não mostrada) e <5% de eficiência para RNAi 761.

A titulação viral foi realizada infectando-se células 293T com diluições seriadas dos sobrenadantes de cada construção. O título obtido do lentivírus de EGFP foi de aproximadamente 10^7 PFU/mL, cerca de 10^6 PFU/mL para RNAi 271 e $\sim 10^6$ PFU/mL para RNAi 956. Na Figura 29 observa-se a existência de algumas células fluorescentes indicando a infecção viral nas maiores diluições utilizadas para cada construção, indicadas na figura.

Figura 28: Produção de lentivírus em células empacotadoras 293T.

Imagem de células 293T transfectadas com lentivírus contendo as construções pEGFP, RNAi NRP/B 271 e RNAi NRP/B 761 em microscópio de contraste de fase invertida fluorescente. A eficiência de transfecção foi de aproximadamente 80%, 50% e 5%, respectivamente. Ao lado direito, mesmo campo representativo, sob luz branca (aumento de 100X).

Figura 29: Titulação dos lentivírus em células 293T.

Imagem de um campo de células 293T infectadas com diluições específicas de lentivírus (indicadas na figura, à direita) contendo as construções pEGFP, RNAi NRP/B 271 e RNAi NRP/B 956 em microscópio de contraste de fase invertida fluorescente. Ao lado direito estão indicados as maiores diluições virais utilizadas, onde ainda era possível observar células verdes positivas. À direita, mesmo campo representativo, sob luz branca (aumento de 100X).

A partir destes sobrenadantes virais, foi realizado o protocolo de infecção, para gerar populações de células ST1 expressando somente a proteína EGFP (Moi=1000) ou expressando a proteína EGFP presente no vetor lentiviral com as 3 construções de RNAi para NRP/B: 271 (Moi=100), 956 (Moi=100). A construção de RNAi de NRP/B761 foi utilizada também, sabendo-se que a produção de lentivírus em células 293T não havia sido eficiente. A infecção ocorreu com uma eficiência de aproximadamente 100% para todas as condições (Figura 30). Como esperado, somente não foi possível obter células ST1 infectadas com o RNAi para NRP/B 761. A morfologia celular das populações de ST1 infectadas com lentivírus não sofreu alteração morfológica significativa. As células foram denominadas ST1 siNRP/B271, ST1 siNRP/B761 e ST1 siNRP/B956 e expandidas para congelamento em nitrogênio líquido e para extração de RNA total para caracterização da possível inibição da expressão do gene NRP/B.

Figura 30: Células ST1 transduzidas com lentivírus.

Campos representativos de células ST1 infectadas com lentivírus contendo as construções pEGFP, RNAi NRP/B 271 e RNAi NRP/B 956 observadas em microscópio invertido de contraste de fase com fluorescência. Cerca de 100% das células foram infectadas pelo lentivírus nas três condições. À direita, mesmo campo representativo, sob luz branca (aumento

de 100X). **Caracterização das populações transduzidas com vetor lentiviral quanto à expressão de NRP/B.**

A avaliação da expressão de NRP/B nas células ST1 transduzidas com siNRP/B, pelo sistema lentiviral foi realizada por ensaio de PCR quantitativo (Q-PCR). O transcrito de GAPDH foi utilizado como controle interno e o nível de expressão relativa de células ST1 parental foi utilizado como amostra calibradora. Na Figura 31 observa-se a expressão relativa de NRP/B em células em crescimento exponencial (DMEM-5%SFB). Houve uma pequena diminuição nos níveis de expressão de NRP/B nas populações de células ST1 infectadas com lentivírus contendo siNRP/B 271 e siRNA 956. Já as células infectadas com lentivírus contendo siNRP/B 761 e o vetor contendo somente o gene EGFP apresentam uma expressão relativa de NRP/B maior (cerca de 2,5 vezes) que as células parentais (ST1).

Figura 31: Quantificação da expressão relativa de NRP/B por PCR quantitativo.

cDNAs de células em crescimento exponencial (DMEM-5%SFB), infectadas com lentivírus contendo construções diferentes de RNAi para NRP/B: siRNA NRP/B 271, siRNA NRP/B 761, siRNA NRP/B 956 e com uma construção contendo apenas o gene EGFP foram utilizados nas reações de Q-PCR para avaliar a expressão de NRP/B. O transcrito de GAPDH foi utilizado como controle interno e a expressão relativa da célula parental ST1 como amostra calibradora.

A expressão relativa de NRP/B também foi avaliada nas mesmas células sob tratamento com hormônio hidrocortisona (Figura 32). O transcrito de GAPDH foi utilizado como controle interno e o nível de expressão de cada população celular carenciada foi utilizado como amostra calibradora. Nota-se que a mesma indução do gene NRP/B promovida por Hy nas células parentais ST1 é observada somente nas células infectadas com EGFP, enquanto que a indução nas três populações infectadas com RNAi para NRP/B (217, 761 e 956) é bastante reduzida.

Figura 32: Quantificação da expressão relativa de NRP/B nas células carenciadas para soro por 24h e tratadas com hormônio hidrocortisona (Hy) por diferentes períodos. A expressão relativa de NRP/B foi avaliada nas células parentais ST1 e nas populações de células infectadas com lentivírus contendo construções diferentes de RNAi para NRP/B: RNAi NRP/B 271, RNAi NRP/B 761, RNAi NRP/B 956 e com uma construção contendo apenas o gene EGFP. O transcrito de GAPDH foi utilizado como controle interno e a expressão relativa das células carenciadas por 24h para soro como amostra calibradora.

A distribuição das células no ciclo celular foi avaliada nestas células para certificar a resposta das mesmas sob tratamento com hormônio hidrocortisona, uma vez que as populações transduzidas com as construções contendo RNAs de NRP/B apresentaram menor indução da expressão de NRP/B durante o tratamento. Na Figura 33 nota-se que há um acúmulo de células na fase G0-G1 durante o tratamento com hidrocortisona como observado nas células parentais ST1, ou seja, as populações de células transduzidas com o lentivírus continuam respondendo ao tratamento com hormônio hidrocortisona.

Figura 33: Gráficos de ensaio de citometria de fluxo para avaliação do padrão de distribuição no ciclo celular (fases G0-G1/ G2-M/ S) das células ST1 parentais e transduzidas com lentivirus contendo siNRP/B (271, 761 e 956). As células foram carenciadas por 24h a 0,2%SFB (c) e tratadas por diferentes períodos de tempo com hidrocortisona (1h Hy, 5h Hy, 10h Hy e 24h Hy).

Como as três construções de RNAi para NRP/B não se mostraram eficientes para o silenciamento do gene nas células ST1, foi realizada uma

última tentativa, infectando uma população de células ST1 com os três lentivírus contendo os três diferentes siNRP/B, simultaneamente. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, misturando-se o sobrenadante contendo os diferentes lentivírus recombinantes com RNAi para NRP/B sobre as células ST1. Duas culturas de células ST1 foram infectadas, simultaneamente, com os três RNAs para NRP/B, tendo sido denominadas ST1 siNRP/B A e ST1 siNRP/B B. Ambas populações foram comparadas quanto à expressão relativa de NRP/B, em relação às células parentais ST1 carenciadas para soro por 24h, tratadas com hormônio hidrocortisona por 3h e 5h e em crescimento exponencial (Figura 34). Somente a segunda infecção tripla de RNAs para NRP/B (ST1 RNAi NRP/B B) apresentou uma diminuição expressiva no nível de expressão relativa de NRP/B.

Figura 34: Quantificação da expressão relativa de NRP/B por PCR quantitativo.

A expressão de NRP/B foi avaliada nas células ST1 parentais, carenciadas para soro por 24h (ST1c), sob tratamento com hidrocortisona (Hy) por 3h (ST1 Hy3h) e 5h (ST1 Hy5h) e em crescimento exponencial (ST1 5%SFB) e em duas populações de células ST1 siNRP/B triplo A e B, em crescimento exponencial (DMEM-5%SFB), co-infectadas com lentivírus contendo construções diferentes de RNAi para NRP/B: siNRP/B 271, siNRP/B 761, siNRP/B 956 (ST1 RNAiNRP/B triplo). O transcrito de GAPDH foi utilizado como controle interno e a expressão relativa da célula parental ST1carenciada (ST1c) como amostra calibradora.

4.5. Avaliação do papel de NRP/B na progressão do ciclo celular – resultados preliminares

4.5.1. Análise da expressão do gene NRP/B durante a progressão do ciclo celular

Para analisar o envolvimento do gene NRP/B na progressão do ciclo celular, RNA total de células de fibroblastos 3T3 de camundongo (NIH3T3) foram extraídos após carenciamento das células para soro (0,2%SFB) por 24h, seguido do estímulo com soro (10%SFB) por diversos períodos de tempo. Ensaios de PCR quantitativo foram realizados com os cDNAs sintetizados a partir de RNA total para avaliar a expressão relativa de NRP/B, utilizando-se, como controle interno, o transcrito de GAPDH e como amostra calibradora a expressão relativa das células NIH carenciadas para soro (NIH 0h). Os níveis de expressão relativa de NRP/B apresentam um aumento nas primeiras horas de indução por soro, seguido de um declínio após 9h de estímulo com soro, demonstrando que o gene é regulado durante a progressão do ciclo celular (Figura 35). Os níveis de expressão relativa de NRP/B aparenta ser um gene induzido mais tardiamente por soro, durante a progressão do ciclo celular.

Figura 35: Análise da expressão de NRP/B durante a progressão no ciclo celular.

Análise dos níveis de expressão por PCR quantitativo de NRP/B. A expressão relativa foi obtida em relação aos níveis de expressão de GAPDH (controle interno) e aos níveis de expressão das células NIH3T3 carenciadas (NIH 0h). As células NIH3T3 foram carenciadas para soro por 24h e estimuladas com 10%SFB por diferentes períodos de tempos (0,5h, 3h, 6h, 9h e 21h). Há uma indução da expressão do transcrito de NRP/B, durante a progressão no ciclo celular.

4.5.2. Análise do efeito do silenciamento de NRP/B na progressão do ciclo celular

Para analisar se o silenciamento de NRP/B poderia afetar a transição G0/G1-S do ciclo celular, as células ST1 parental e ST1 siNRP/B triploB foram carenciadas para soro por 24h e estimuladas com soro (5%SFB) por diferentes períodos de tempo e analisadas através de ensaios de citometria de fluxo, de modo a obter a distribuição das mesmas nas diferentes fases do ciclo celular. A Figura 36 indica a porcentagem de células na fase S do ciclo celular da população celular ST1 siNRP/B triploB em comparação com a linhagem parental ST1. Observa-se que a porcentagem de células na fase S foi aumentada após 24h de estímulo, ou seja, a progressão do ciclo foi adiantada na linhagem ST1 siNRP/B triploB em relação à linhagem parental ST1, mostrando que NRP/B afeta a transição G0-G1/S na progressão do ciclo celular.

Figura 36: Análise por citometria de fluxo do padrão de distribuição no ciclo celular das células parentais ST1 e da população transduzida com as construções de RNAi de NRP/B denominada ST1-siRNANRP/B triploB.

As barras representam a porcentagem da população celular em cada estágio do ciclo celular. A ausência de expressão de NRP/B interfere na transição G0/G1-S do ciclo celular, pois uma maior porcentagem de células encontra-se na fase S após 24h (seta).

4.6. Avaliação da expressão de NPR/B em tecidos humanos

Com o objetivo de avaliar a expressão de NRP/B em tecidos humanos, várias linhagens disponíveis no laboratório foram utilizadas sendo seis

linhagens derivadas de tumores cerebrais (A172, T98G, U87, Hog, U343 e U373), três linhagens de próstata (NL, PC3, DU145), quatro linhagens de útero (C33A, Siha, Hela, Caski), quatro linhagens de pulmão (IMR90, NCIH23, H1155, A549) e cinco linhagens de mama (MCF7, ZR751, MB231, MB435, HS5778T). A expressão do transcrito de NRP/B foi analisada nestas linhagens pela metodologia de PCR quantitativo. A Figura 37A representa os níveis de expressão de NRP/B. Observa-se elevada expressão do transcrito nas linhagens de tecidos cerebrais e mamários e menor expressão nas linhagens de útero, pulmão e próstata. Nas linhagens de útero não é possível observar diferenças de expressão entre as linhagens, devido às barras de desvio padrão se sobreporem uma à outra. Nas linhagens de próstata observa-se uma maior expressão de NRP/B na linhagem PC3 e menor nas outras duas (LN e DU145). Nas linhagens de pulmão, não foi detectada expressão de NRP/B na linhagem IMR90, porém uma baixa expressão foi detectada na linhagem A549 e uma maior expressão nas linhagens NCIH23 e H155. Uma elevada expressão de NRP/B foi detectada nas linhagens de mama ZR751, MB231 e HS578T, e menor expressão nas linhagens MCF7 e MB435. A expressão elevada de NRP/B também foi detectada nas linhagens de cérebro A172 e U373, uma menor expressão nas linhagens T98G, HOG e U343 e uma expressão mediana na linhagem U87. A expressão nas linhagens cerebrais e mamárias não se apresentou homogênea, padrão este que pode ser devido a diferenças nos potenciais metastáticos e invasivos entre as linhagens.

A expressão de NRP/B em tecidos cerebrais é bem evidente, primeiramente na análise de expressão no painel de cDNAs de diferentes tecidos de rato da Clontech, onde verificou-se uma expressão específica em cérebro, e novamente, nas linhagens de tumores cerebrais humanos. Desta forma, a expressão de NRP/B também foi avaliada em amostras clínicas de glioma, obtidas em colaboração com o Laboratório de Investigação Médica – 15 (LIM-15) da Faculdade de Medicina da USP, liderado pela Profa. Dra. Suely Marie. Foram utilizadas 13 amostras de cérebro humano não tumoral, obtidas a partir de cirurgias terapêuticas para epilepsia, 12 amostras de astrocitoma pilocítico (OMS grau I), 11 amostras de astrocitoma difuso (OMS grau II), 13 amostras de astrocitoma anaplásico (OMS grau III) e 20 amostras de glioblastoma multiforme (OMS grau IV), num total de 69 amostras (Tabela 1). A classificação

histopatológica de todas as amostras foi avaliada por patologistas antes da extração de RNA total das mesmas, descrita no item 3.2.3.

Na Figura 37B, observa-se a expressão relativa de NRP/B nas amostras clínicas que foram divididas de acordo com o grau do respectivo tumor. O valor médio de expressão relativa dos controles não-tumorais ou consideradas como normais foi utilizado como amostra calibradora. Os níveis de expressão do transcrito de HPRT foram utilizados como controle interno. A partir dos dados de expressão relativa, foi possível fazer uma análise estatística utilizando-se o teste paramétrico Teste-t, uma vez que os grupos de dados apresentaram distribuição normal. A significância estatística indicada nas figuras, refere-se à comparação dos níveis de expressão relativa em cada um dos diferentes graus de malignidade do tumor em relação às respectivas amostras normais. Os níveis de expressão de NRP/B se apresentaram significativamente superiores nas amostras de gliomas de grau elevado de malignidade (grau II, grau III e grau IV) em relação às amostras de tecido normal. Observou-se, também, uma diminuição no nível de expressão de NRP/B nas amostras de glioma de baixo grau (grau I) em relação às amostras de tecido não-tumoral, com significância estatística.

Figura 37 : Avaliação da expressão de mRNA de NRP/B em tecidos humanos através de PCR quantitativo.

(A) Expressão de NRP/B em células de linhagens de cérebro, útero, próstata, pulmão e mama analisadas por PCR quantitativo. A expressão relativa foi obtida em relação aos níveis de expressão de HPRT e de NPP/B nas células MCF-7. Gráfico representativo de dois experimentos realizados em duplicata. (B) Expressão de NRP/B em diferentes amostras de astrocitomas (Grau I: Astrocitoma pilocítico; Grau II: Astrocitoma de baixo grau; Grau III: Astrocitoma anaplásico, GBM: Glioblastoma) e em tecido de cérebro normal. A expressão relativa foi obtida em relação aos níveis de expressão de HPRT e de NRP/B nas amostras de tecido cerebral normal. (*) Significância estatística Tteste-t dos níveis de expressão relativos quantificados nas amostras tumorais comparados com as amostras normais (* $p < 0,05$).

4.7. Identificação de putativos genes associados com tumores do sistema nervoso central.

4.7.1. Estratégias adotadas para identificação de genes que possam estar associados com gliomas

Foram utilizadas duas estratégias para identificação de genes associados com gliomas humanos: a primeira utilizando-se o Banco de Dados do Transcriptoma Humano baseado no alinhamento entre a sequência genômica e de cDNAs e ESTs disponíveis nos bancos de dados públicos; a segunda estratégia utilizando-se os dados de genes localizados no cromossomo 22 diferencialmente expressos em microarrays entre as linhagens ST1 e P7.

Sobre a primeira estratégia adotada, inicialmente, concentramos nossa atenção no cromossomo 10 que apresentava diversos trabalhos da literatura correlacionando LOH e gliomas, baseando-se nos parâmetros descritos em Métodos (item 3.2.14.1.). Diversos genes presentes neste cromossomo já foram isolados como sendo genes supressores de tumor, como por exemplo, DMBT (*deleted in malignant brain tumors*), MMAC/PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), WDR11 (*bromodomain and WD repeat domain containing 2*) (Chernova et al., 2001; Mollenhauer et al., 1997; Steck et al., 1997). Além disso, já existem construções de BAC específicas para a região 10p15, região amplamente estudada em estudos de LOH em gliomas, para possível localização de outro gene supressor de tumor relacionado com desenvolvimento de gliomas (Harada et al., 2000). Entretanto, pelo fato deste cromossomo ser muito estudado com o intuito de descobrir genes supressores de tumor relacionados a gliomas e, ainda, pelo fato deste cromossomo não se encontrar muito bem seqüenciado na época do início deste projeto de doutorado, concluímos que não teríamos muitos resultados além daqueles já publicados.

Por outro lado, o cromossomo 22, além de apresentar um seqüenciamento bom e confiável, não é uma região muito estudada. No início deste projeto, haviam poucas referências bibliográficas relacionando LOH neste cromossomo. A perda de um supressor de tumor no 22q13 estava associada com a formação do astrocitoma (WHO II), concomitantemente com

inativação do gene supressor de tumor TP53 e ativação de PDGF (Louis & Gusella, 1995) (Figura 38). Dados recentes sugerem que outras regiões no cromossomo 22 podem conter genes envolvidos na tumorigênese de gliomas, pois, embora pacientes com Neurofibromatose tipo 2 (NF2) possuam maior probabilidade de desenvolver gliomas, já está estabelecido que o gene NF2 (localizado em 22q12.2) não está mutado nestes tumores (De Vitis et al., 1996; Hoang-Xuan et al., 1995; Watkins et al., 1996). Uma descrição mais detalhada do cromossomo 22 encontra-se na Introdução.

Figura 38: Vias genéticas para desenvolvimento de glioblastoma multiforme.

Três vias genéticas independentes para o desenvolvimento de um glioblastoma multiforme (GBM) e as alterações mais frequentes que ocorrem em cada etapa. (Modificado de (Behin et al., 2003)

A região 22q13 foi definida como uma região associada com a progressão do astrocitoma, devido ao aumento de frequência de LOH nesta região em glioblastomas (Ino, 1999; Oskam et al., 2000). Segmentos proximais e distais do gene NF2 são freqüentemente descritos como estando deletados em outros tipos de tumores, como, por exemplo, câncer de mama, de ovário, oral, coloretal e meningioma (Akagi et al., 1995; Allione et al., 1998; Miyakawa et al., 1998; Yana et al., 1995). Uma região distal do braço longo do cromossomo 22 foi, então, definida entre os marcadores D22S282 e D22S1169, conforme descrito em Métodos (item 3.2.15.1). Utilizando o link *Map View* do site do NCBI, foi possível determinar o tamanho real desta região, como sendo de aproximadamente 5,5Mb (Figura 37).

Figura 39: Região cromossômica no cromossomo 22 associada com progressão tumoral de astrocitomas.

Visualização do cromossomo 22 na ferramenta *Map View* do NCBI. As setas indicam a localização no cromossomo 22 (região 22q13.31 e 22q13.32) dos marcadores (D22S282 e D22S1169) escolhidos para definirem a "região mínima" de 5,5 Mbp. No interior do quadro encontram-se os *Contigs* que originaram a lista de clones genômicos.

Pelo programa MapViewer (NCBI), foi possível identificar 7 contigs que mapeavam na região 22q13: NT_011520.8, NT_011521.1, NT_011522.3, NT_011523.8, NT_030872.1 e NT_011525.4. A partir destes contigs, foi possível listar os clones genômicos delimitados pelos marcadores D22S282 e D22S1169 (Tabela 4).

Tabela 4: Contigs e seus respectivos clones genômicos localizados na região entre os marcadores D22S282 e D22S1169 no cromossomo 22.

Contigs	Clones Genômicos
NT_011520.8	AL096759, AL049708
NT_011521.1	AL118498, AL031843, Z82201, AL023801, Z97055, AL023654, AL035398, Z82178, Z82174, AL033543, AL031595, AL022339
NT_011522.3	Z85994, Z81308, AL023973, Z75407, AL022317, AL022333, Z98743, Z93244, Z83938, AL079301, AL049760, Z82243, AL008718, AL021391, Z98047, Z95331, Z93784, Z84478, AL049811
NT_011523.8	AL 049853, Z94161, AL049856, AL078611, AL031034, Z93024, AL031844, AL031588, AL031587, AL021392, AL096766, AL118516, AL078642, Z97351, Z82187, U51561, AL023576, Z80896, Z79999, AL023733, Z81000, AL096755, U51559, AL096756, Z82183, Z83836, Z82186, AL035069, Z84496, AL021306, Z80999, Z73416, AL033544, AL049568, Z80901, AC000034, Z83854, AL117329, AL121580, AL110122, Z73963, AL110121, Z70688, Z81002, Z80772, AL118553, Z78421, AL118554, AL050314, AL008720, Z72006, Z82249, AL078640, Z84468, AL096853
NT_030872.1	AL096843, Z83837, Z83855, AL078607
NT_011525.4	AL078613, AL078622

Com o auxílio do banco de dados do transcriptoma desenvolvido para a construção da interface gráfica do projeto TFI, num trabalho em colaboração com a Profa. Dra. Anamaria Aranha Camargo, foi possível analisar a região escolhida de 5,5 Mbp, localizada na região 22q13 do cromossomo 22. O banco de dados relacional MySQL, desenvolvido pela equipe de Bioinformática coordenado pelo Prof. Sandro de Souza, utiliza a linguagem, possui duas características fundamentais: facilidade de uso, com comandos fáceis de se utilizar e a existência de várias ESTs disponíveis nos bancos públicos, além de todas as ORESTES obtidas do Projeto HCGP.

A inspeção manual foi necessária, uma vez que as listas foram geradas automaticamente a partir do Banco de Dados do Transcriptoma. Com este intuito, foram feitas análises no programa BLAST do NCBI contra o banco de

seqüências não redundantes, para verificação do real mapeamento das seqüências FL (*full length*) e ESTs (*expressed sequence tags*) no cromossomo 22 e entre os marcadores D22S282 e D22S1169. A confirmação da existência real de estrutura de *splicing* das seqüências de ESTs através da interface do Projeto TFI (*Transcript Initiative Initiative* – <http://200.210.65.182/transcript>) e pelos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>), foi realizada, também, manualmente. Para se restringir a quantidade de seqüências a serem analisadas quanto à expressão, foram selecionadas apenas as seqüências com descrição em tecidos cerebrais, consultando a descrição das ESTs e da seqüências FL no GenBank ou na interface gráfica do Projeto TFI.

Toda esta validação manual foi importante para demonstrar a eficiência do programa e a confiabilidade das seqüências inseridas no banco do transcriptoma. Das 198 ESTs selecionadas automaticamente, após remoção das seqüências redundantes, a maior parte (193, correspondendo a 97%) realmente se localizavam no cromossomo 22 e das 128 selecionadas por possuírem estrutura de *splicing*, 97 (75%) realmente a possuíam. Esta porcentagem de 25% de estrutura de *splicing* inexistente se deve ao fato do programa MySQL considerar como *splicing*, qualquer despareamento de bases (desde um par de bases) entre as seqüências analisadas e a seqüência genômica. Para a seleção manual das seqüências, considerou-se como um *splicing* real, o despareamento de, pelo menos, 50 pares de bases.

Para a seleção dentre as 97 ESTs, foram adotados alguns critérios, como, por exemplo, expressão em tecido cerebral, presença de estrutura de *splicing* e ausência de pareamento com seqüências RefSeq ou mRNA (análise realizada no programa BLAT), ou seja, de seqüências de mRNA já descritas e depositadas no banco de dados. A Tabela 5 relaciona as 13 ESTs selecionadas para desenho de *primers* para análise do perfil de expressão, por PCR quantitativo, em linhagens de tumores cerebrais humanos e em amostras de gliomas humanos.

Tabela 5: ESTs mapeadas na região 22q13.31 a 22q13.33 através do Banco de Dados do Transcriptoma Humano.

Padrão de expressão em tecido cerebral e existência de estrutura de *splicing* das ESTs candidatas.

EST	Número de acesso	Tecidos	Splicing
1	BE048032	Tumor cerebral	SIM
2	H16408 AA127927 AA126735 AA115339 AL047019 BE880751 AW069525 AA115299	Cérebro normal Útero normal Útero normal Útero normal Útero normal Tumor pulmão Osso Útero normal	Não Não Não SIM Não SIM Não Não
3	AI337659 BE783410 BE256338 AA709467	Tumor de cérebro Retinoblastoma Retinoblastoma Cérebro	SIM SIM SIM SIM
4	AW090556	Tumor Cerebral	SIM
5	BE144655	Cabeça e Pescoço normal	SIM
6	AL110323	Cérebro normal	Não
7	BF347850	Oligodendrogliomas anaplásico com perda em 1p e 19q	SIM
8	BE382471 BF347994	Neuroblastoma Oligodendrogliomas anaplásico com perda em 1p e 19q	SIM SIM
9	BF836415 BE147957	Cabeça e Pescoço normal Cabeça e Pescoço normal	SIM SIM
10	BE706167 H55360	Cabeça e Pescoço normal	Não SIM
11	BF950595 BF946929 638952 608265	Tecido nervoso Tecido nervoso - -	SIM SIM
12	BE147957	Cabeça e Pescoço normal	SIM
13	N98939 BF307883 H17223 AI830892 R17513	Lesões de esclerose múltipla Tumor de músculo Cérebro normal Tumor de pulmão Cérebro normal	SIM SIM SIM SIM SIM

A EST1 (BE048032) foi selecionada pela expressão em tecido cerebral tumoral e pareamento completo de sua sequência na região estudada do cromossomo 22 humano. Porém, há pareamentos não completos da sequência de EST1 em outros cromossomos, indicando a presença de uma região repetitiva, impossibilitando o desenho de *primers* específicos para avaliação de sua expressão em linhagens e amostras clínicas de tumores cerebrais.

As sequências que representam a EST2 localizam-se numa mesma região cromossômica, sobrepondo-se umas às outras. Apesar da seleção automática identificar algumas destas ESTs com estrutura de *splicing*, a

validação manual mostrou a inexistência delas. Foi, então, realizado um alinhamento com a sequência genômica humana no programa BLAT para avaliar o contexto da região onde as ESTs se localizavam, observando-se que as ESTs faziam parte de um exon de um mRNA AB05143 (correspondente à uma proteína KIAA1644 – identificada num projeto de seqüenciamento em larga escala de mRNAs) que possui uma estrutura de *splicing*, indicando a existência de um transcrito. O par de *primers* foi desenhado em exons diferentes deste mRNA.

As seqüências que representam a EST3 possuem estrutura de *splicing* e apresentam expressão em tecido cerebral, sendo possível desenhar um par de *primers* específicos para avaliação de sua expressão em linhagens e amostras clínicas de tumores cerebrais. Já a EST 4 (AW090556) possui estrutura de *splicing*, porém é a única EST mapeada na região, possuindo uma região repetitiva, o que dificultou o desenho de *primers* específicos para amplificação da mesma. A EST5 (BE144655), possui as mesmas características da EST4, porém foi possível desenhar um par de *primers* para ensaios de PCR quantitativo. Esta EST5 localiza-se no íntron do gene ATX10, e não parece ser indicativo de um *splicing* alternativo devido à ausência de outras seqüências de ESTs na mesma região, e por se anelar na outra fita do DNA genômico.

A EST6 (AL110323) não possui estrutura de *splicing*, porém observou-se a existência de outras ESTs com estrutura de *splicing* na mesma região. Seqüências de mRNA, inexistentes na época da utilização do Banco de Dados do Transcriptoma, foram depositadas e correspondem à uma proteína hipotética denominada LOC150383, com função desconhecida. A EST7 (BF347850) possui estrutura de *splicing*, porém é a única EST mapeada na região. Apesar dos *primers* desenhados serem específicos, não houve amplificação com os cDNA utilizados. Uma proteína hipotética LOC 150384 também foi depositada após a listagem dos candidatos e não possui função conhecida. O mesmo ocorreu com a EST9, que corresponde à mesma proteína hipotética.

As duas seqüências que representam a EST8 possuem estrutura de *splicing* e apresentam expressão em tecidos cerebrais. Há um clone de mRNA (AK055591), sem função conhecida, que corresponde à esta EST8.

Das seqüências que representam a EST10, somente uma apresenta a estrutura de *splicing* e ambas se localizam em uma região do DNA genômico onde não há mRNAs ou RefSeqs descritas. As duas seqüências que representam a EST11 apresentam estrutura de *splicing* e também não correspondem a nenhum clone de mRNA, porém, ao contrário da EST10, os *primers* desenhados não amplificaram a seqüência com os cDNA utilizados. A EST12 (BE147957) poderia corresponder a uma variante com *splicing* alternativo e um mRNA (AK093107) depositado após a listagem dos candidatos, porém nada foi amplificado nas amostras analisadas.

A EST13, representada por várias ESTs com estrutura de *splicing*, corresponde a um mRNA de depósito recente que originou uma RefSeq MN015381, denominada FAM19A5 (family with sequence similatritu 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A5). É um gene membro da família TAFA, que é composto por 5 genes que codificam proteínas pequenas secretadas. Tais proteínas contêm domínio conservado de resíduos de cisteína em posições fixas, que estão relacionados com MIP-1alpha, um membro da família CC-chemokine. As proteínas TAFAs são predominantemente expressas em regiões específicas do cérebro, sendo postuladas como quimioquinas ou neuroquinas específicas de cérebro, que agem como reguladores de células do sistema imune e nervosas (Tom Tang et al., 2004).

Das 170 seqüências *full length*, foram removidas 56 seqüências redundantes. Do total de 114 seqüências *full length*, 103 localizavam-se realmente no cromossomo 22. Várias seqüências correspondiam ao mesmo gene, ou seja, havia uma sobreposição entre elas, o que diminuiu drasticamente o número de seqüências para 21 genes, os quais estão listados na Tabela 6. Para todos os genes foram desenhados *primers* específicos para análise do perfil de expressão, por PCR quantitativo, em linhagens de tumores cerebrais humanos e em amostras clínicas de gliomas.

Tabela 6: Seqüências full length de mRNAs completos mapeados na região 22q13.31 a 22q13.33 através do Banco de Dados do Transcriptoma Humano.

Símbolo, nome, número de acesso e localização das seqüências mapeadas na região de estudo.

	Símbolo no GeneEntrez	Nome do gene	Número de acesso	Localização no genoma humano
1	FLJ23588	CAP-binding protein complex interacting protein 1 (FLJ23588)	NM_022785	22q13.1-q13.33
2	SULT4A1	Sulfotransferase family 4A, member 1 (SULT4A1)	NM_014351	22q13.2-q13.31
3	PNPLA3	patatin-like phospholipase domain containing 3	NM_025225	22q13.31
4	SAMM50	sorting and assembly machinery component 50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	NM_015380	22q13.31
5	PARVG	parvin, gamma	NM_022141	22q13.2-q13
6	PRR5	proline rich 5 (renal)	NM_001017528	22q13.31
7	NUP50	nucleoporin 50kDa	NM_007172	22q13.31
8	FAM118A	family with sequence similarity 118, member A	NM_017911	22q13
9	RIBC2	RIB43A domain with coiled-coils 2	NM_015653	22q13.31
10	FBLN1	fibulin 1	NM_001996	22q13.31
11	ATXN10	ataxin 10	NM_013236	22q13.31
12	FLJ27365	FLJ27365 protein	NM_207477	22q13.31
13	PKDREJ	polycystic kidney disease (polycystin) and REJ (sperm receptor for egg jelly homolog, sea urchin)-like	NM_006071	22q13.31
14	PPARA	peroxisome proliferative activated receptor, alpha	NM_001001928	22q12-q13.1; 22q13.31
15	FLJ20699	hypothetical protein FLJ20699	NM_017931	22q13
16	TRMU	tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase	NM_001008568	22q13
17	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	NM_016426	22q13.2-q13.3
18	CELSR1	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, <i>Drosophila</i>)	NM_014246	22q13.3
19	DIP	death-inducing-protein	NM_015124	22q13.31
20	CERK	ceramide kinase	NM_022766	22q13.31
21	TBC1D22A	TBC1 domain family, member 22A	NM_014346	22q13.3

Os genes foram analisados segundo a classificação do Gene Ontology (GO) (Ashburner et al., 2000) no programa FatiGo (Al-Shahrour et al., 2004; Al-Shahrour et al., 2005). O Gene Ontology classifica os produtos gênicos em termos de suas associações com processos biológicos, componentes celulares e função molecular. De um modo geral, a maior parte das seqüências *full length* estão relacionadas a processos fisiológicos celulares (regulação e transdução de sinais) e ao metabolismo (regulação, metabolismo primário e celular) (Figura 39).

Figura 40: Classificação no Gene Ontology das 21 seqüências *Full length* localizadas no cromossomo 22 humano.

A partir da ferramenta de bioinformática FatiGo (<http://fatego.bioinfo.cipf.es/>) as seqüências *full length* localizadas no cromossomo 22 humano foram classificadas segundo o Gene Ontology de acordo com associações com processos biológicos, componentes celulares e função molecular.

Informações a respeito dos 21 transcritos foram obtidas pelo número de acesso do GenBank dos mesmos, no Banco de Dados EntrezGene e UniGene, disponíveis no site do NCBI. Todas as seqüências *full length* selecionadas no Banco de Dados do Transcriptoma estão expressos em cérebro, de acordo com os dados de expressão do Unigene, com exceção do gene PKDREJ. Os genes serão referidos com o número referente da Tabela 5 entre parênteses, seguido do nome do gene.

A (1)FLJ23588 é uma proteína conhecida também como DJBP (*DJ-1-Binding Protein*), que é expressa em testículo e espermatozoides e reprime a atividade de transativação do receptor de andrógenos dependente de testosterona por recrutar o complexo de histonas desacetilases, sendo que DJ-1 possui função antagonista, pois restaura a atividade de transativação (Niki et al., 2003).

(2)SULT4A1 é um gene que codifica um membro da família de sulfotransferase, a sulfotransferase-4A1. Trata-se de uma sulfotransferase específica de cérebro que está envolvida no metabolismo de neurotransmissores (xenobióticos e substratos endógenos como catecolaminas e esteróides) (Liyou et al., 2003). Polimorfismos deste gene podem estar associados com susceptibilidade à esquizofrenia (Brennan & Condra, 2005).

(3)PNPLA3 (*patatin-like phospholipase domain containing 3*) é uma proteína ligada à membrana denominada lipase triacilglicerol que medeia a hidrólise de triacilglicerol em adipócitos e que pode estar envolvida no balanço de energia nestas células (Baulande et al., 2001; Liu et al., 2004).

A proteína (4)SAMM50: faz parte do complexo TOB (*topogenesis of mitochondrial outer-membrane beta-barrel proteins*) ou SAM (*sorting and assembly of mitochondria*), que está presente na membrana externa da mitocôndria de leveduras (Kozjak et al., 2003). Não há estudos funcionais para os ortólogos humanos.

A proteína (5)PARVG (*parvina-γ*) é membro da família Parvina, proteínas que se ligam à actina associada com contato focal e complexos moleculares dinâmicos reunidos na membrana onde integrinas interagem com a matriz extracelular. Possuem dois domínios homólogos à calponina in tandem com alto grau de conservação, o que implica no seu papel de adesão célula-matriz, mediada por integrina. Já foi sugerido que parvinas estejam envolvidas no desenvolvimento e progressão de tumores, atuando como gene supressor de tumor, sendo descrita uma redução da expressão de PARVG em algumas linhagens celulares tumorais (Korenbaum et al., 2001). Polimorfismos neste gene foram encontrados em câncer colorretal e de mama (Castellvi-Bel et al., 2003), assim como em oligodendrogliomas (Alonso et al., 2005).

O gene (6)PRR5 codifica uma proteína com domínio rico em prolina. Está localizado na região do cromossomo 22 descrita como tendo um gene supressor de tumor que pode estar envolvido na tumorigênese de câncer de

mama. Além disso, este gene se apresenta superexpresso em câncer colorretal (Johnstone et al., 2005).

(7)NUP50 é membro de nucleoporinas, que são componentes do complexo de poros nucleares em células eucarióticas, estando relacionado com importação de proteínas nucleares mediada por importina α e β .(Lindsay et al., 2002)

O gene (8)FAM118A (*family with sequence similarity 118, member A*) corresponde a uma fase aberta de leitura encontrada no cromossomo 22, sem nenhuma descrição funcional alguma do gene (Collins et al., 2004).

O gene (9)RIBC2 (*RIBC43A domain with coiled-coils 2*) também não possui descrição funcional, sendo que a única informação deste gene foi obtida pela existência do domínio RIB43A, que aparenta ter papel estrutural na replicação centriolar de células em divisão (Norlander et al., 2000).

A proteína (10)FBLN1, denominada Fibulina1, corresponde à uma glicoproteína secretada que se liga ao receptor de fibronectina, um regulador chave da adesão celular (Argaves et al., 2003). Um papel de gene supressor de tumor foi sugerido para este gene, já que sua superexpressão em células derivadas de fibrosarcoma reduz o crescimento dependente de ancoragem *in vitro* e provoca atraso na formação de tumor *in vivo* (Qing et al., 1997), porém há descrições de expressão elevada de FBLN1 em câncer de mama e de ovário (Greene et al., 2003; Roger et al., 1998). Esta aparente dicotomia de papéis pode ser explicada pela produção de variantes de *splicing* (Gallagher et al., 2005).

O gene (11)ATX10 (*ataxina 10*) é altamente expresso no cérebro e está relacionado com a doença autossômica dominante de ataxia cerebelar (ADCA) (Marz et al., 2004) As funções biológicas de ataxina 10 permanecem desconhecidas (Waragai et al., 2006), mas podem estar relacionadas com a manutenção do nível de glicosilação intracelular e homeostase cerebral (Marz et al., 2006).

(12)FLJ27365 corresponde a uma proteína predita, com função desconhecida (Ota et al., 2004).

O gene (13)PKDREJ (*polycystic kidney disease (polycystin) and REJ (sperm receptor for egg homolog, sea urchin)-like*) codifica um membro da

família de proteínas de membrana policistina. Tem papel na reprodução humana, com elevada expressão em testículo (Stayner & Zhou, 2001).

O gene (14)PPARA (*peroxisome proliferative activated receptor, alpha*) codifica um fator de transcrição nuclear. A ação de proliferadores de peroxisomos (organelas subcelulares encontradas em plantas e animais que contêm a enzima relacionada ao metabolismo de colesterol e lipídios) ocorre via receptores específicos, chamados PPARAs, que afetam a expressão de genes alvos envolvidos em proliferação celular, diferenciação celular e respostas imune e de inflamação (Tugwood et al., 1992). Estudos com agonistas de (14)PPARA indicaram diminuição da viabilidade de linhagens celulares de GBM (Strakova et al., 2005), e diminuição da resposta inflamatória de astrócitos (Xu et al., 2006).

O gene (15)FLJ20699 codifica uma proteína hipotética sem função conhecida (Strausberg et al., 2002). Possui o domínio TPR que possui função de promover interação proteína-proteína (Blatch & Lassle, 1999).

O gene (16)TRMU (*tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase*) é membro da família de TRMU, que codifica uma enzima modificadora de tRNA, específica de mitocôndria (Yan et al., 2006).

A proteína (17)GSTE1 (*G-2 and S-phase expressed 1*) é expressa somente nas fases S e G2 do ciclo celular, onde se co-localizam com microtúbulos e tubulina citoplasmática (Monte et al., 2000). Em resposta a dano ao DNA, a proteína codificada acumula no núcleo e se liga à proteína supressora de tumor p53, retirando-a do núcleo, reprimindo sua habilidade de induzir apoptose (Monte et al., 2003).

A proteína (18)CELSR1 (*cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1*) é membro da superfamília da Caderina. São receptores envolvidos na comunicação mediada por contato, com domínios de caderinas e de EGF-like, estando envolvidos em adesão celular e interações ligante-receptor. Este membro em particular, é regulado no desenvolvimento, sendo específico de tecido neural e tendo papel inespecífico na embriogênese (Formestone, 2001), mas não com esquizofrenia (Georgieva, 2003).

O gene (19)DIP (*death inducing protein*) codifica uma proteína localizada na mitocôndria, que se apresenta superexpressa após indução de E2F1. DIP induz apoptose pela via de E2F1 independente de p53 (Stanelle et al., 2005).

A proteína (20)CERK (*ceramide kinase*) e seu produto (ceramida-1-fosfato) estão relacionados com função regulatória na produção dos mediadores de eicosanóides de inflamação (Sugiura et al., 2002). Potenciais inibidores de CERK podem oferecer nova geração de terapias anti-inflamatória e anti-câncer (Lamour & Chalfant, 2005; Pettus et al., 2003).

O gene (21)TBC1D22A (*TBC1 domain family, member 22A*) não possui função conhecida (Collins et al., 2004). O domínio TBC presente nesta proteína tem atividade ativadora de GTP em Rab-like GTPases e tem papel presumido em regulação de crescimento celular e diferenciação.

Paralelamente, uma outra estratégia foi adotada para seleção de potenciais genes relacionados com o desenvolvimento de câncer cerebral. Com os resultados obtidos recentemente no trabalho de doutorado do aluno Christian Colin, foi iniciada uma análise dos genes diferencialmente expressos em células ST1 e P7, sob o tratamento com Hy por 24h na presença de DMEM contendo 5%SFB. Com os dados obtidos da hibridização de microarrays Affymetrix® (contendo 24 mil sondas referentes a transcritos de mRNA e clusters de ESTs do banco de dados do Unegene – Build 34), foram identificados 1.293 genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7. Inicialmente, foi necessário realizar uma análise dos genes e verificar a sua localização correspondente ao genoma humano, uma vez que se trata de dados do genoma de rato. Automaticamente, com o auxílio dos técnicos de Bioinformática do laboratório, foi possível identificar a localização cromossômica do ortólogo humano. Devido ao seqüenciamento do genoma do rato estar incompleto e seu transcriptoma ser apenas parcialmente conhecido, foi possível determinar, automaticamente, a localização cromossômica de apenas 493 genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7, com uma eficiência de 38%. Foi realizada, então, uma análise manual, utilizando-se ferramentas de Bioinformática disponíveis no site do NCBI e na interface gráfica de genomas da UCSC (genome.ucsc.edu). Deste modo, dos 1.293 genes/ESTs analisados, 33 genes localizavam-se no cromossomo 22 humano. Como várias ESTs correspondiam ao mesmo gene, o número foi reduzido para 23 genes/ESTs (Tabela 6). As seqüências de 1 a 11 foram encontradas como sendo mais expressas nas células ST1 e de 12 a 23 nas células P7. Destes 23

genes/ESTs selecionados, nenhum se localiza na região compreendida entre os marcadores D22S282 e D22S1169, previamente delimitada como região de estudo. Somente em uma das duas regiões associadas com gliomas descritas recentemente por (Hartmann, 2004), compreendida entre os marcadores D22S530 e D22S417, foram localizados 2 genes: (4')TOB2 e (19')TCF20. Outros quatro genes, (1')HMOX-1 (Nishie et al., 1999), (7')YWHAH (Seng et al., 2005a), (21')TIMP3 (Nakamura et al., 2005) e (3')NF2 (Watkins et al., 1996), já foram descritos como sendo relacionados com a progressão de GBM humanos, confirmando que a utilização das informações de genes diferencialmente expressos nos arrays entre as linhagens ST1 e P7 de rato é válida para encontrar genes relacionados com desenvolvimento e/ou progressão de tumor cerebral. Estes genes foram utilizados para posterior análise de expressão em linhagens e amostras clínicas de gliomas humanos para se confirmar os resultados da literatura nas nossas amostras. A expressão de (22')SOX10 (16')SYNGR1 e (14')NPTX foi estudada em células cerebrais, mas não estão diretamente relacionados a câncer cerebral. Os genes selecionados para análise de expressão em linhagens e amostras clínicas de tumores cerebrais foram aqueles já citados acima, quatro outros genes que foram isolados por apresentar maior expressão nas células ST1 ((2')SDF2L1, (4')TOB2, (7')PIM3 e (9')TOM11), já que nosso objetivo é busca de possíveis genes supressores de tumor em gliomas e um outro gene isolado como apresentando maior expressão em células P7 (TCF20). Os genes selecionados para avaliação do perfil de expressão, por PCR quantitativo, em linhagens de tumores cerebrais humanos e em amostras clínicas de gliomas estão representados com "*" na Tabela 7.

Tabela 7: Genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano.

Localização dos genes no genoma de rato e no genoma humano. (*) Genes selecionados para avaliação de sua expressão em linhagens de tecido cerebral humano e em amostras clínicas de tumores.

	Número de acesso das ESTs de rato	Localização no genoma de Rato	Localização no genoma Humano	Símbolo no EntrezGene
1*	J02722	19p11	22q13.1	HMOX1
2*	AA945591	11q23	22q11.21	SDF2L1
3*	AI237525	14q21	22q12.2	NF2
4*	AI175349 ; AI070270 ; AI029530	7q34	22q13.2-q13.31	TOB2
5	AA943202	1q32	22q11.21	GAB4
6	AI172103	6q	22q11.21	ESTs
7*	D17445	14q21	22q12.3	YWHAH
8*	AF086624	7q34	22q13.33	PIM3
9*	AA944401	19p11	22q12.3	TOM1
10	J05122	7q34	22q13.31	BZRP
11	S61868	3q33	22q12.2	ESTs
12	AI235644 ; AI237137	11q23	22q11.22	PPM1F
13	AI137351	14q21	22q12.2	ZNF278
14*	AI228113	7q34	22q13.1	NPTXR
15	AI008919	14q21	22q12.2	SEC14L2
16*	AA799879	7q34	22q13.1	SYNGR1
17	X56228	7q34	22q13.1	TST
18	AI145916	7q34	22q13.1	RABL4
19*	AI069936	7q34	22q13.3	TCF20
20	AI072389	7q34	22q13.1	C22orf23
21*	AI102741; A924107; AA965161; AI009159; AA924107; AI176815; AA858903; A924006	7q13	22q12.3	TIMP3
22*	AJ001029	7q34	22q13.1	SOX10
23	AI030156	14p11	22q11.23	ESTs

Destes 23 genes, 19 foram analisados no programa FatiGo e classificados pelo *Gene Ontology* (GO) no programa *Fatigo* (Al-Shahrour et al., 2004; Al-Shahrour et al., 2005). De um modo geral, a maior parte das seqüências analisadas estão relacionadas a processos biológicos celulares, regulação de processos celulares (transdução de sinal, transporte), metabolismo (celular e primário) e regulação de processos fisiológicos (incluindo processos neurofisiológicos). (Figura 41).

Figura 41: Classificação no *Gene Ontology* dos genes diferencialmente expressos entre a linhagem ST1 e P7, localizados no cromossomo 22 humano.

A partir da ferramenta de bioinformática Fatigo (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es/>), as seqüências dos genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano foram classificadas segundo o *Gene Ontology* de acordo com associações com processos biológicos, componentes celulares e função molecular.

Informações a respeito dos genes selecionados foram obtidas pelo número de acesso do GenBank dos mesmos, no EntrezGene e no UniGene, sendo descritas a seguir:

A proteína (1')Hmx1 ou Heme oxigenase é uma enzima essencial para o catabolismo do heme (cliva heme para formar biliverdina, que é subsequente convertida à bilirrubina pela biliverbina redutase e monóxido de carbono, um neurotransmissor putativo). A atividade de Hmx é induzida pelo substrato heme e por várias outras substâncias não-heme. Hmx ocorre como 2 isozimas: Hmx-1 induzível e Hmx-2, constitutiva. Está correlacionado com angiogênese em gliomas humanos (Nishie et al., 1999).

(2')SDF2L1 (*stromal cell-derived factor 2-like 1*) é uma proteína da família Pmt/rt e Sdf2l1, sendo um gene induzido por stresse de retículo endoplasmático (Fukuda et al., 2001).

O gene (3')NF2 (*neurofibromin 2*) é um gene supressor de tumor que codifica uma proteína similar à alguns membros da família ERM (*erzin, radixin, moesin*) de proteínas que estão ligadas a componentes do citoesqueleto com proteínas de membrana celular (Trofatter et al., 1993). Mutações neste gene estão associadas com neurofibromatose tipo I, que é caracterizada por anormalidades oculares, tumores no sistema nervoso e pele (Evans et al., 2000). Vários estudos para localização de mutações neste gene foram realizados, porém nenhuma modificação foi encontrada em amostras de gliomas humanos (De Vitis et al., 1996; Hoang-Xuan et al., 1995; Ng et al., 1995; Rubio et al., 1994; Watkins et al., 1996).

O gene (4')TOB2 (*transducer of ERBB2, 2*) codifica uma proteína que pertence à família TOB de proteínas antiproliferativas, que estão envolvidas na regulação do progresso do ciclo celular (Ikematsu et al., 1999). Em células transformadas por ErbB2, a exportação nuclear de Tob é facilitado por mecanismos mediado por NES (*nuclear exported signal*), resultando na diminuição da sua atividade anti-proliferativa, sendo que os mesmos resultados foram observados em outras linhagens transformadas por ras ou src (Kawamura-Tsuzuku et al., 2004).

A proteína (7')YWHAH (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide*) pertence à família de proteínas 14-3-3 que estão associadas com proteínas-chave de sinalização celular e reguladores do ciclo celular (Aitken, 1995), sendo que distúrbios nestas associações podem favorecer o aparecimento de câncer (Namkoong et al., 2006). Esta proteína também interage com o receptor de glicocorticóide (GR) ativo (o que pode explicar a sua superexpressão em células ST1 quando tratadas com hormônio glicocorticóide hidrocortisona), tendo um papel nas vias de sinalização mediada por GR (Wakui et al., 1997). Num estudo mais recente, deleções homozigóticas em glioblastomas foram identificadas, sendo que o gene YWHAH foi identificado neste região (Seng et al., 2005b).

O proto-oncogene (8')PIM-3 apresenta atividade quinase serina/treonina e expressão aberrante no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular humano (Fujii et al., 2005) e de câncer pancreático (Li et al., 2006).

A proteína (9')TOM1 (*target of myb1*) ainda não possui função conhecida, porém está envolvida na translocação de complexos de receptores de fatores

de crescimento para a degradação no lisossomo. A superexpressão de endofina recruta TOM1 para os endossomos (Seet et al., 2004)

O gene (14')NPTXR (*neuronal pentraxin receptor*) codifica uma proteína similar ao receptor neuronal pentraxin de rato. A proteína pentraxin de rato possui funções semelhantes a neurônios de remoção de material sináptico assim como de formação e remodelamento de sinapses (Dodds et al., 1997).

A proteína codificada pelo gene (16')SYNGR1 (*synaptogyrin 1*) é uma proteína integral de membrana associada com vesículas pré-sinápticas em células neuronais (Kedra et al., 1998). A exata função desta proteína não é conhecida.

A proteína codificada por este gene (19')TCF20 (*transcription factor 20*) liga-se ao elemento responsivo do fator de crescimento derivado de plaquetas no promotor de metaloproteinases de matrix 3 (*stromelysin 1*) (Kirstein et al., 1996). A proteína se localiza no núcleo e tem atividade de transativação e ligação ao DNA. É um co-ativador transcrricional, aumentando a atividade de fatores de transcrição com Jun e Sp1 (Rekdal et al., 2000). A análise deste gene na interface gráfica do BLAT mostrou a existência de 2 isoformas, e ambas foram avaliadas quanto à expressão nas linhagens e amostras clínicas de tumores cerebrais.

O gene (21')TIMP3 (*tissue inhibitor of metalloproteinases-3*) pertence à família dos genes TIMP, que codificam glicoproteínas que inibem a atividade de metaloproteinases de matriz, sendo um grupo de peptidases envolvidas na degradação de matriz extracelular (ECM) (Apte et al., 1994). Timp-3 tem papel de gene supressor de tumor em melanomas, câncer de colo, mama (Anand-Apte et al., 1996) e seu promotor se apresenta metilado em amostras de glioblastomas multiforme secundário (Nakamura et al., 2005).

O gene (22')SOX10 (*SRY (sex determining region Y) box 10*) codifica um membro da família SOX (*SRY-related HMG-box*) de fatores de transcrição envolvidos na regulação de processos de desenvolvimento como determinação sexual e hematopoiese (Wegner, 1999). Esta proteína é importante para desenvolvimento da crista neural e do sistema nervoso periférico (Kuhlbrodt et al., 1998).

4.7.2. Quantificação de expressão gênica relativa por Q-PCR.

4.7.2.1. Análise de expressão gênica em linhagens celulares de glioma humano.

Nestas análises foram utilizadas amostras de cDNA sintetizadas a partir de RNA total extraído de culturas em crescimento exponencial de linhagens de glioma humano (T98G, A172, U87, Hog, U343 e U373), sem qualquer tipo de tratamento. A expressão relativa dos genes foi normalizada pelo nível de expressão do transcrito de HPRT. A linhagem A172 foi adotada como amostra calibradora já que é uma linhagem com menor potencial metastático, e não é tumorigênica quando injetadas no dorso de camundongos nude. A linhagem Hog é derivada de oligodendroglioma, as linhagens U87 e U343 são derivadas de astrocitoma, sendo todas as restantes derivadas de glioblastoma multiforme (informações obtidas na ATCC)

Em relação às ESTs isoladas do cromossomo 22, houve amplificação somente de 6 (entre 13) delas (ESTs 2, 5, 6, 8, 10 e 13). Os perfis de expressão das ESTs nas linhagens de gliomas humano se mostraram semelhantes entre as ESTs analisadas, com uma maior expressão nas linhagens A172 e T98G e menor expressão no restante das linhagens (Figura 42). A partir dos resultados de expressão gênica, foi possível avaliar a existência de correlação entre os níveis de expressão das ESTs obtidos para cada linhagem. Utilizou-se o teste estatístico de Correlação de Pearson entre os níveis de expressão relativa de todos os genes, aos pares (Tabela 8). Nota-se uma correlação positiva entre 10 de 15 ESTs (66%).

Figura 42: Análise de expressão gênica das ESTs em linhagens celulares de glioma humano.

Os gráficos representam os níveis de expressão relativa das ESTs, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT e utilização do nível de expressão na linhagem A172 como amostra calibradora. As barras representam a média dos experimentos, realizados em duplicata.

Tabela 8: Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em linhagens celulares de glioma humano das ESTs.

Os níveis de expressão relativa das ESTs foram determinados nas seis linhagens celulares de glioma humano (T98G, A172, U87, Hog, U343 e U373) utilizando-se PCR quantitativo, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT. Todas as combinações de dados, aos pares, foram submetidas ao teste estatístico de correlação de Pearson. O valor de significância de correlação (p) de cada uma das comparações está apresentado na tabela. Foram considerados significativos, valores de $p < 0,05$, representados por (S). (N) representa valores não significativos.

	EST2	EST5	EST6	EST8	EST10	EST13
EST2		0,1236	0,0018	0,0062	0,1142	0,2934
EST5	N		0,0409	0,0136	$P < 0.0001$	0,0018
EST6	S	S		0,0007	0,0346	0,1319
EST8	S	S	S		0,0122	0,0663
EST10	N	S	S	S		0,0023
EST13	N	S	N	N	S	

Em relação às 21 seqüências *full length* isoladas do cromossomo 22, não houve amplificação somente da uma seqüência correspondente ao gene 2.SULT4A1. Os perfis de expressão nas linhagens de gliomas humano se mostraram semelhantes entre a maioria dos genes analisados, com uma maior expressão nas linhagens A172 e T98G e menor expressão no restante das linhagens (Figura 43). A partir dos resultados de expressão gênica, foi possível avaliar a existência de correlação entre os níveis de expressão das seqüências *full length* obtidos para cada linhagem. Utilizou-se o teste estatístico de Correlação de Pearson entre os níveis de expressão relativa de todos os genes, aos pares (Tabela 9), para avaliar a existência de correlação entre os genes. Nota-se uma correlação positiva entre 110 de 190 seqüências *full length* (57,89%).

Figura 43: Análise de expressão gênica das seqüências *Full length* em linhagens celulares de glioma humano.

Os gráficos representam os níveis de expressão relativa dos genes, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT e utilização do nível de expressão na linhagem A172 como amostra calibradora. As barras representam a média dos experimentos, realizados em duplicata.

Tabela 9: Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em linhagens celulares de glioma humano das seqüências *Full length*.

Os níveis de expressão relativa das seqüências *full length* (identificadas pelos números da Tabela 5) foram determinados nas seis linhagens celulares de glioma humano (T98G, A172, U87, Hog, U343 e U373) utilizando-se PCR quantitativo, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT. Todas as combinações de dados, aos pares, foram submetidas ao teste estatístico de correlação de Pearson. O valor de significância de correlação (p) de cada uma das comparações está apresentado na tabela. Foram considerados significativos, valores de $p < 0,05$, representados por (S). (N) representa valores não significativos.

	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1		0,6055	0,2197	0,0048	0,0088	0,0139	0,0551	0,5082	0,0045	0,0097	0,0024	0,7972	0,3586	0,0444	0,0716	0,0018	0,0107	0,0067	0,0254	0,0304
3	N		0,2114	0,9902	0,7931	0,8154	0,533	0,7175	0,5068	0,8622	0,909	0,562	0,116	0,5938	0,4512	0,7094	0,898	0,9554	0,6981	0,6535
4	N	N		0,0588	0,1267	0,0282	0,004	0,5621	0,3201	0,0322	0,0885	0,3988	0,0003	0,007	0,002	0,1636	0,0398	0,0502	0,0155	0,0111
5	S	N	N		0,0012	$P < 0,0001$	0,0055	0,6014	0,039	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	0,6432	0,1242	0,003	0,0084	0,001	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	0,0006	0,0011
6	S	N	N	S		0,0039	0,0245	0,8583	0,0477	0,0033	0,0011	0,6722	0,2221	0,0155	0,0368	0,0005	0,0016	0,0013	0,0082	0,011
7	S	N	S	S	S		0,0016	0,5939	0,0615	$P < 0,0001$	0,0006	0,5611	0,0714	0,0007	0,0022	0,0044	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$
8	N	N	S	S	S	S		0,5176	0,1247	0,0016	0,0118	0,5679	0,0159	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	0,0365	0,0023	0,0035	0,0003	0,0001
9	N	N	N	N	N	N	N		0,5464	0,5763	0,5939	0,6577	0,5635	0,5522	0,5031	0,7272	0,619	0,5941	0,5549	0,5492
10	S	N	N	S	S	N	N	N		0,0438	0,034	0,5933	0,4912	0,1165	0,157	0,0265	0,0563	0,0447	0,091	0,0948
11	S	N	S	S	S	S	S	N	S		0,0005	0,57	0,0796	0,0008	0,0031	0,004	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	0,0001	0,0002
12	S	N	N	S	S	S	S	N	S	S		0,7098	0,1699	0,0071	0,0162	0,0003	0,0003	0,0001	0,0021	0,0033
13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		0,4638	0,5936	0,5169	0,6835	0,6463	0,6768	0,6053	0,5687
14	N	N	S	N	N	N	S	N	N	N	N	N		0,0233	0,0105	0,2829	0,0893	0,1074	0,0433	0,0346
15	S	N	S	S	S	S	S	N	N	S	S	N	S		0,0002	0,0252	0,0009	0,0017	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$
16	N	N	S	S	S	S	S	N	N	S	S	N	S	S		0,046	0,0046	0,0067	0,0006	0,0002
17	S	N	N	S	S	S	S	N	S	S	S	N	N	S	S		0,0029	0,002	0,0112	0,015
18	S	N	S	S	S	S	S	N	N	S	S	N	N	S	S	S		$P < 0,0001$	0,0002	0,0003
19	S	N	N	S	S	S	S	N	S	S	S	N	N	S	S	S	S		0,0004	0,0007
20	S	N	S	S	S	S	S	N	N	S	S	N	S	S	S	S	S	S		$P < 0,0001$
21	S	N	S	S	S	S	S	N	N	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	

Em relação aos genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano, os perfis de expressão nas linhagens de gliomas humano se mostraram semelhantes entre a maioria dos genes analisados, com uma maior expressão nas linhagens A172 e T98G e menor expressão no restante das linhagens (Figura 44). Utilizou-se o teste estatístico de Correlação de Pearson entre os níveis de expressão relativa de todos os genes, aos pares (Tabela 10) para avaliar a existência de correlação entre os níveis de expressão dos genes obtidos para cada linhagem. Nota-se uma correlação positiva entre 45 de 78 genes (57,7%).

Figura 44: Análise de expressão gênica de genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano.

Os gráficos representam os níveis de expressão relativa dos genes, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT e utilização no nível de expressão na linhagem A172 como amostra calibradora. As barras representam a média dos experimentos, realizados em duplicata.

Tabela 10: Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em linhagens celulares de glioma humano de genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano.

Os níveis de expressão relativa de genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano foram determinados nas seis linhagens celulares de glioma humano (T98G, A172, U87, Hog, U343 e U373) utilizando-se PCR quantitativo, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT. Todas as combinações de dados, aos pares, foram submetidas ao teste estatístico de correlação de Pearson. O valor de significância de correlação (p) de cada uma das comparações está apresentado na tabela. Foram considerados significativos, valores de $p < 0,05$, representados por (S). (N) representa valores não significativos.

	1'	2'	3'	4'	7'	8'	9'	14'	16'	19'A	19'B	21'	22'
1'		0,3263	0,5505	0,317	0,3681	0,3447	0,141	0,2147	0,5423	0,3396	0,3646	0,8371	0,4489
2'	N		0,6977	0,0013	0,0042	0,0024	0,0134	0,0031	0,0029	0,0032	0,0029	0,519	0,0178
3'	N	N		0,4949	0,6903	0,6019	0,7721	0,6368	0,7972	0,4667	0,3605	0,1201	0,7896
4'	N	S	N		0,0006	$P < 0.0001$	0,0081	0,0006	0,0022	$P < 0.0001$	0,0003	0,4931	0,0062
7'	N	S	N	S		$P < 0.0001$	0,0033	0,0004	0,0005	0,0005	0,0056	0,7383	0,0014
8'	N	S	N	S	S		0,0043	0,0003	0,0007	$P < 0.0001$	0,0021	0,6465	0,003
9'	N	S	N	S	S	S		0,0006	0,0163	0,0088	0,0282	0,9122	0,0106
14'	N	S	N	S	S	S	S		0,0046	0,0009	0,0058	0,6783	0,0035
16'	N	S	N	S	S	S	S	S		0,0022	0,007	0,725	0,005
19'A	N	S	N	S	S	S	S	S	S		0,0004	0,5352	0,0068
19'B	N	S	N	S	S	S	S	S	S	S		0,3496	0,0224
21'	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		0,8767
22'	N	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	N	

Devido à limitação de se trabalhar com amostras teciduais ou mesmo à manipulação de células *in vivo*, as linhagens celulares têm sido utilizadas como ferramentas para o conhecimento da Bioquímica e da Biologia Celular e Molecular. Apesar das diversas adaptações que ocorrem devido ao novo microambiente *in vitro* (alterações genéticas ao nível transcricional ou protéico), linhagens celulares e amostras tumorais apresentam diversos padrões de expressão gênica semelhantes (Ross et al., 2000). No entanto, o enriquecimento seletivo de células malignas em decorrência do tempo de cultura (em anos) e a ausência de estroma em linhagens celulares podem comprometer as comparações entre linhagens celulares e tumores (Birgersdotter et al., 2005).

Com todos estes resultados obtidos para identificação de genes envolvidos em linhagens celulares de tumores cerebrais humanos, assim como possíveis indícios de co-regulação entre genes importantes para o desenvolvimento de gliomas, foi realizada a análise de expressão dos genes em amostras clínicas de tecido cerebral humano acometido por diversos graus de glioma.

4.7.2.2. Análise de expressão gênica em amostras clínicas de glioma humano.

A realização destes ensaios para avaliação da expressão gênica em amostras clínicas de glioma humano tem como objetivo demonstrar os padrões de expressão gênica relacionados ao desenvolvimento e/ou progressão do tumor cerebral humano *in vivo*, sem as modificações introduzidas pela adaptação ao cultivo *in vitro*, no caso de culturas primárias e de linhagens celulares já estabelecidas.

Desta forma, a expressão dos genes selecionados foi avaliada em amostras clínicas de glioma, obtidas em colaboração com o Laboratório de Investigação Médica – 15 (LIM-15) da Faculdade de Medicina da USP, liderado pela Prof^a. Dra. Suely Marie. Foram utilizadas 13 amostras de cérebro humano não tumoral, obtidas a partir de cirurgias terapêuticas para epilepsia, 11 amostras de astrocitoma pilocítico (OMS grau I), 13 amostras de astrocitoma difuso (OMS grau II), 12 amostras de astrocitoma anaplásico (OMS grau III) e 20 amostras de glioblastoma multiforme (OMS grau IV), num total de 69 amostras (Tabela 1, Matérias e Métodos). A classificação histopatológica de todas as amostras foi avaliada por patologistas, antes da extração de RNA total das mesmas, conforme descrito no item 3.2.3.

Na Figura 45, observa-se a expressão das 7 ESTs selecionadas do *locus* 22q13 associado à gliomas, nas amostras clínicas, divididas em relação ao grau de malignidade (grau I, II, III e GBM). O valor médio de expressão relativa dos controles não-tumorais ou consideradas como normais, foi utilizado como amostra calibradora. Os níveis de expressão do transcrito de HPRT foram utilizados como controle interno. A partir dos dados de expressão relativa, foi possível fazer uma análise estatística utilizando-se o teste paramétrico Teste-t, uma vez que os grupos de dados apresentaram distribuição normal. A significância estatística indicada nas figuras refere-se à comparação dos níveis de expressão relativa em cada um dos diferentes graus de malignidade do tumor em relação às respectivas amostras normais.

Quatro ESTs analisadas (ESTs 3, 5, 6 e 8) apresentaram, nos gliomas, níveis relativos de expressão significativamente superiores em relação às amostras de tecido não-tumoral. A EST 2 apresentou um nível de expressão

significativamente menor nas amostras de gliomas de grau I e maior nas amostras de gliomas de grau II. As ESTs 10 e 13 apresentaram expressão maior significativa em somente uma dos conjuntos de amostras de gliomas analisadas, sendo elas, respectivamente, amostras de GBM e gliomas de grau II.

Figura 45: Análise de expressão gênica das seqüências de ESTs em amostras clínicas de gliomas humanos e controle de cérebro não tumoral.

Os gráficos representam os níveis de expressão relativa dos genes, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT e utilização da média do nível de expressão relativa dos controles normais como amostra calibradora. As barras representam a média dos experimentos, realizados em duplicata. Os asteriscos referem-se à significância estatística (teste-t) dos níveis de expressão relativos quantificados nas amostras tumorais comparados com as amostras normais (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

A partir dos resultados de expressão gênica nas amostras clínicas, foi possível avaliar se as mesmas correlações entre os níveis de expressão das ESTs obtidos para as linhagens de glioma humano se mantinham nas amostras clínicas de tumores humanos. Utilizou-se o teste estatístico de Correlação de Pearson entre os níveis de expressão relativa de todos os genes, aos pares (Tabela 11). Nota-se a manutenção de 9 correlações (positivas e negativas) nas amostras clínicas de glioma de 10 correlações obtidas nas amostras de linhagens de glioma humano (Tabela 8), sendo que 6 de 9 correlações são significativas (66%) e 3 de 9 correlações não são significativas (33%).

Tabela 11: Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em amostras clínicas de gliomas humanos das ESTs.

Os níveis de expressão relativa das ESTs foram determinados nas amostras clínicas utilizando-se PCR quantitativo, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT. Todas as combinações de dados, aos pares, foram submetidas ao teste estatístico de correlação de Pearson. O valor de significância de correlação (p) de cada uma das comparações está apresentado na tabela. Foram considerados significativos, valores de $p < 0,05$, representados por (S). (N) representa valores não significativos.

	EST2	EST3	EST5	EST6	EST8	EST10	EST13
EST2		P<0.0001	0,0918	0,0845	0,8238	0,1084	0,1235
EST3	S		P<0.0001	0,0546	P<0.0001	0,3918	P<0.0001
EST5	N	S		P<0.0001	P<0.0001	0,0749	P<0.0001
EST6	N	N	S		P<0.0001	P<0.0001	0,0027
EST8	N	S	S	S		0,0055	P<0.0001
EST10	N	N	N	S	S		0,0557
EST13	N	S	S	S	S	N	

Na Figura 46, observa-se a expressão relativa de 21 seqüências *full length* nas amostras clínicas que foram divididas de acordo com o grau do respectivo tumor. Os níveis de expressão de (4)SMM50, (8)FAM118A, (11)ATXN10, (13)PKDREJ, (16)TRMU não foram alterados nas amostras de gliomas em comparação com tecido cerebral normal.

Seis seqüências *full length* ((6)PPR5, (12)FLJ27365, (14)PPARA, (15)FLJ20699, (18)CELSR1, (20)CERK) apresentaram expressão significativamente superior nas amostras de gliomas de grau elevado de

malignidade (grau II, grau III e grau IV) em relação às amostras de tecido normal. Dentre estes genes, o gene (6)PPR5 apresentou uma expressão maior e com maior significância ($p<0,01$) nas amostras de gliomas de grau I, enquanto que nas outras amostras de maior grau de malignidade a significância encontrada foi um pouco menor ($p<0,05$). Os genes (12)FLJ27365 e (14)PPRA apresentaram expressão maior e com maior significância ($p<0,01$) nas amostras de gliomas de graus elevado de malignidade (III e IV ou GBM). O gene (15)FLJ20699 apresentou maior expressão nas amostras de gliomas de baixo grau de malignidade (grau I) com elevada significância estatística ($p<0,001$). Aparentemente, o gene (18)CELSR1 apresentou uma maior expressão em amostras de gliomas de elevado grau de malignidade (GBM), porém com a mesma significância estatística da expressão nas outras amostras de glioma. Por último, o gene (20)CERK apresentou maior expressão nas amostras de gliomas de elevado grau de malignidade (GBM) com maior significância estatística ($p<0,001$).

O gene (17)GTSE1 apresentou maior expressão nas amostras de gliomas de elevado grau de malignidade (GBM) com elevada significância estatística ($p<0,001$) e expressão maior nas amostras de glioma de grau I e III com significância estatística

Somente os genes (2)SULT4A1 e (5)PARVG apresentaram expressão significativamente inferior nas amostras de gliomas testadas, em relação às amostras de tecido normal. As diferenças mais significativas estatisticamente ($p<0,01$), foram observadas nas amostras de gliomas de grau I e grau IV (GBM) para o gene (2)SULT4A1 e somente nas amostras de glioblastomas para o gene (5)PARVG.

Outras cinco seqüências *full length* apresentaram expressão significativamente superior em somente duas amostras de gliomas em relação às amostras de tecido normal. Dentre estes genes, o gene (1)FLJ23588 apresentou uma expressão maior e com maior significância estatística ($p<0,01$) nas amostras de glioma de grau II de malignidade. O gene (3)PNPLA3 apresentou uma expressão maior e com maior significância estatística ($p<0,01$) nas amostras de glioma de grau I de malignidade. Os genes (9)RIBC2, (19)DIP e (21)TBC1 apresentaram expressão maior nas amostras de gliomas de graus mais elevados de malignidade (grau III e GBM), sendo que as maiores

significâncias estatísticas foram encontradas para o gene (21)TBC1 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Observou-se, também, um aumento do nível de expressão do gene (7)NUP50 apenas nas amostras de glioma de grau III em relação às amostras de tecido não-tumoral, com significância estatística de $p < 0,05$ e um aumento do nível de expressão do gene (10)FBLN1 apenas nas amostras de glioma de baixo grau de malignidade (grau I).

Figura 46: Análise de expressão gênica das seqüências *Full length* em amostras clínicas de gliomas humanos e controle de cérebro não tumoral.

Os gráficos representam os níveis de expressão relativa dos genes, após normalização pelo gene de expressão contitutiva HPRT e utilização da média do nível de expressão relativa dos controles normais como amostra calibradora. As barras representam a média dos experimentos, realizados em duplicata. Os asteriscos referem-se à significância estatística (teste-t) dos níveis de expressão relativos quantificados nas amostras tumorais comparados com as amostras normais (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

A partir dos resultados de expressão gênica nas amostras clínicas de gliomas e tecido não-tumoral, foi possível avaliar se as mesmas correlações entre os níveis de expressão das seqüências *full length* obtidas nas linhagens de glioma humano se mantinham nas amostras clínicas de tumores humanos. Utilizou-se o teste estatístico de Correlação de Pearson entre os níveis de expressão relativa de todos os genes, aos pares (Tabela 12). Nota-se a manutenção de 84 correlações (positivas e negativas) nas amostras clínicas de glioma de 190 correlações obtidas nas amostras de linhagens de glioma humano (Tabela 9), sendo que 54 de 84 correlações são significativas (64%) e 30 de 84 correlações não são significativas (36%).

Tabela 12: Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em amostras clínicas de glioma humano das seqüências *Full length*.

Os níveis de expressão relativa das seqüências *full length* foram determinados nas amostras clínicas de gliomas humanos utilizando-se PCR quantitativo, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT. Todas as combinações de dados, aos pares, foram submetidas ao teste estatístico de correlação de Pearson. O valor de significância de correlação (p) de cada uma das comparações está apresentado na tabela. Foram considerados significativos, valores de $p < 0,05$, representados por (S). (N) representa valores não significativos.

	1.CAP	2.SULT2A	3.PNPLA3	4.SAMM5	5.PARVG	6.PRR5	7.NUP50	8.FAM118	9.RIBC2	10.FBLN1	11.ATXN1	12.FLJ273	13.PKDRE	14.PPARA	15.FLJ206	16.TRMU	17.GTSE1	18.CELSR	19.DIP	20.CERK	21.TBCD2
1.CAP		0,4893	0,0638	0,0009	0,4305	0,0013	0,0151	0,0092	0,0055	0,3854	0,0095	0,0016	P<0.0001	P<0.0001	0,0146	0,0008	0,4701	0,8472	0,1922	0,7551	0,5141
2.SULT2A	N		0,2145	0,8066	0,3806	0,0741	0,1198	0,9157	0,0736	0,0561	0,558	0,0371	0,2415	0,0526	0,032	0,6696	0,3194	0,0749	0,0743	0,0142	0,1276
3.PNPLA3	N	N		0,0794	0,702	P<0.0001	0,0011	0,0054	0,0938	0,1467	0,0152	0,0002	0,0216	0,0025	P<0.0001	0,0269	0,6607	0,7246	0,3035	0,8294	0,9317
4.SAMM5	S	N	N		0,0008	0,0026	0,0147	P<0.0001	0,0284	0,0056	0,0007	0,008	0,0559	0,0033	P<0.0001	P<0.0001	0,5518	0,4664	0,1573	0,6768	0,8673
5.PARVG	N	N	N	N		0,0693	0,2784	P<0.0001	0,8543	0,1102	0,3554	0,0103	P<0.0001	0,0212	0,0002	P<0.0001	0,5397	0,6532	0,9775	0,5504	0,0603
6.PRR5	S	N	S	N	N		P<0.0001	0,0001	0,0107	0,0117	0,0043	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0,0009	0,8049	0,7165	0,4246	0,4539	0,6525
7.NUP50	S	N	S	N	N	S		0,0002	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0,0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0,1512	0,001	0,0023	0,9649	0,8966
8.FAM118	S	N	S	N	S	S	S		0,0115	0,0001	0,0011	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0,8676	0,3079	0,0861	0,6018	0,4103
9.RIBC2	S	N	N	N	N	S	S	S		0,0009	P<0.0001	P<0.0001	0,0095	P<0.0001	0,0001	0,0026	0,2017	0,0044	P<0.0001	0,6391	0,4846
10.FBLN1	N	N	N	N	N	S	S	S	S		0,0179	0,0004	0,057	0,0001	P<0.0001	0,01	0,1348	0,0036	0,0274	0,036	0,9794
11.ATXN1	S	N	S	N	N	S	S	S	S	S		P<0.0001	0,0059	P<0.0001	0,002	P<0.0001	0,4162	0,0009	P<0.0001	0,5102	0,583
12.FLJ273	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S		P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0,2235	0,0049	P<0.0001	0,3616	0,3669
13.PKDRE	S	N	S	N	S	S	S	S	S	N	S	S		P<0.0001	0,0006	P<0.0001	0,8457	0,9712	0,2549	0,7793	0,1515
14.PPARA	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		P<0.0001	P<0.0001	0,3903	0,0119	0,0003	0,3773	0,7453
15.FLJ206	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		P<0.0001	0,3443	0,0137	0,0015	0,1613	0,9168
16.TRMU	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		0,6334	0,0769	0,028	0,7605	0,6717
17.GTSE1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		0,0002	0,0103	0,2633	0,4032
18.CELSR	N	N	N	N	N	N	S	N	S	S	S	S	N	S	S	N	S		P<0.0001	0,0086	0,1645
19.DIP	N	N	N	N	N	N	S	N	S	S	S	S	N	S	S	S	S	S		0,1267	0,2112
20.CERK	N	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N		P<0.0001
21.TBCD2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S		

Na Figura 47, observa-se a expressão relativa dos genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano nas amostras clínicas, as quais foram divididas de acordo com o grau do respectivo tumor. Os níveis de expressão dos genes (2')SDF2L1, (7')YWHAH, (8).PIM3 e (22')SOX10 apresentaram um padrão de expressão semelhante entre eles, pois apresentam uma menor expressão nas amostras de glioma grau III, seguido de um aumento da expressão nas amostras de GBM. O gene (2')SDF2L1 apresentou uma maior expressão significativa em amostras de GBM, comparando-se com o nível de expressão nas amostras não-tumorais. O gene (7')YWHAH apresentou maior expressão significativa em amostras de GBM e menor expressão em amostras de gliomas de grau III. O gene (8')PIM3 apresentou um padrão de expressão semelhante ao gene (7') YWHAH, com expressão menor significativa nas amostras de glioma grau III e expressão maior significativa nas amostras de GBM, além de uma expressão maior e significativa nas amostras de gliomas de grau II. O gene (22')SOX10 apresentou expressão maior apenas nas amostras de gliomas de grau I. Todos os outros genes apresentam níveis de expressão significativamente elevados nos quatro conjuntos de amostras clínicas de glioma (grau I, II, III e GBM) em relação aos níveis de expressão em tecido cerebral normal.

A partir dos resultados de expressão gênica nas amostras clínicas de gliomas e tecido não-tumoral, foi possível avaliar que as correlações entre os níveis de expressão dos genes obtidos nas linhagens de glioma humano não se mantiveram nas amostras clínicas de tumores humanos. (Tabela 13). Nota-se a manutenção de 22 correlações (positivas e negativas) nas amostras clínicas de glioma de 55 correlações obtidas nas amostras de linhagens de glioma humano (Tabela 10), sendo que 14 de 22 correlações são significativas (63%) e 8 de 22 correlações não são significativas (36%).

Figura 47: Análise de expressão gênica de genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano em amostras clínicas de gliomas humanos e controle de cérebro não tumoral.

Os gráficos representam os níveis de expressão relativa dos genes, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT e utilização da média do nível de expressão relativa dos controles normais como amostra calibradora. As barras representam a média dos experimentos, realizados em duplicata. Os asteriscos referem-se à significância estatística (teste-t) dos níveis de expressão relativos quantificados nas amostras tumorais comparados com as amostras normais (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tabela 13 : Correlação, aos pares, de níveis relativos de expressão gênica em amostras clínicas de glioma humano de genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano. Os níveis de expressão relativa de genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano foram determinados nas amostras clínicas de gliomas humanos utilizando-se PCR quantitativo, após normalização pelo gene de expressão constitutiva HPRT. Todas as combinações de dados, aos pares, foram submetidas ao teste estatístico de correlação de Pearson. O valor de significância de correlação (p) de cada uma das comparações está apresentado na tabela. Foram considerados significativos, valores de p0,05, representados por (S). (N) representa valores não significativos.

	1'	2'	3'	4'	7'	8'	9'	19'(iso1)	19'(iso2)	21'	22'
1'		P<0.0001	P<0.0001	0,207	0,2465	P<0.0001	0,3885	0,0002	P<0.0001	0,0345	0,1436
2'	S		0,0004	0,1052	0,1216	P<0.0001	0,0277	0,0003	P<0.0001	0,0001	0,0139
3'	S	S		P<0.0001	0,4442	P<0.0001	0,0065	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	0,5324
4'	N	N	S		0,0275	0,2741	P<0.0001	P<0.0001	0,0359	P<0.0001	0,9345
7'	N	N	N	S		0,0437	0,6839	0,4037	0,2072	0,9613	0,2799
8'	S	S	S	N	S		0,0594	P<0.0001	P<0.0001	0,0017	0,2761
9'	N	S	S	S	N	N		P<0.0001	0,0709	P<0.0001	0,3583
19'(iso1)	S	S	S	S	N	S	S		P<0.0001	P<0.0001	0,5885
19'(iso2)	S	S	S	S	N	S	N	S		P<0.0001	0,863
21'	S	S	S	S	N	S	S	S	S		0,5928
22'	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	

5. DISCUSSÃO

5.1. Clonagem e descrição do transcrito completo de NRP/B de rato

A primeira etapa da caracterização funcional de NRP/B foi clonar e descrever o transcrito completo de NRP/B e sua estrutura genômica.

A amplificação do transcrito completo de NRP/B de rato foi realizada através de RT-PCR, utilizando *primers* específicos, desenhados a partir de seqüências de ESTs de rato que se alinhavam nas extremidades das seqüências humana e de camundongo na interface gráfica do programa BLAT (<http://genome.uscs.edu>). Um fragmento de 4,5kbp foi amplificado com sucesso e seu tamanho era compatível com o tamanho do transcrito de rato predito, baseado na homologia com as seqüências humana e de camundongo. O inserto foi então, clonado no vetor de clonagem pENTR2B. O seqüenciamento completo do transcrito de NRP/B de rato foi realizado gerando-se, primeiramente, fragmentos randômicos por sonicação que foram seqüenciados, e posteriormente, desenhando-se *primers* específicos em regiões específicas onde os clones aleatórios da sonicação não forneceram seqüências suficientes para obtenção da seqüência completa.

Após a determinação da seqüência de NRP/B de rato de 4.545bp, foi possível avaliar a estrutura do gene, composta por 3 exons localizados na região 2q12 do cromossomo 2 do genoma de rato, que se estende ao longo de 12kpb no genoma. A região codificante, à semelhança dos transcritos de humano e de camundongo está localizada num único exon (exon 2), sugerindo a conservação deste gene durante a evolução. A região codificante possui 1.767 nucleotídeos que codifica uma proteína de 589 aminoácidos e contém os domínios protéicos BTB/POZ, Back e Kelch, presentes nas proteínas ortólogas de NRP/B de humano e camundongo. A proteína NRP/B de rato apresenta 99,6% e 99,8% de identidade com os ortólogos já descritos de humano e camundongo.

5.2. Expressão de NRP/B em células ST1 e em outros tecidos de rato

Como outra parte da análise funcional de NRP/B, foi feita a análise do perfil de expressão ao nível de mRNA e de proteína em células ST1 carenciadas para soro por 24h e tratadas com hormônio glicocorticóide hidrocortisona. Os dados referentes aos ensaios de Northern blot indicam um aumento nos níveis de mRNA de cerca de 7 vezes após 5h de tratamento, em comparação com as células carenciadas para soro (Figura 10). Este aumento corrobora os dados obtidos previamente no laboratório (Vedoy, 2000; Vedoy & Sogayar, 2002). Quanto ao nível protéico, diferentemente da ausência do sinal do transcrito de NRP/B nas células ST1 carenciadas para soro por 24h, ambas isoformas (57 e 67kD) da proteína estão presentes. A isoforma menor de 57kD é decorrente de um segundo potencial códon de iniciação localizado 220 nucleotídeos após o primeiro códon de iniciação, que possui uma sequência consenso Kozak e resulta numa proteína de 516 aminoácidos e massa molecular de 57kD. A proteína de 57kD, portanto, apresenta uma porção, de 34 aminoácidos, deletada do domínio BTB. Há um aumento discreto dos níveis protéicos de cerca de duas vezes após 5h de tratamento com Hy em comparação com as células ST1 sem tratamento (c), sendo que a indução ocorre na fração nuclear das células, ocorrendo uma ligeira diminuição no nível protéico na fração citoplasmática (Figura 11).

O papel de p53 na reversão fenotípica tumoral-normal das células ST1 durante o tratamento com o hormônio glicocorticóide, está sendo investigado pelo doutorando Antero Macedo (Projeto Fapesp 01/12286-9) em nosso laboratório, havendo evidências diretas e indiretas que p53 está sendo ativado durante o processo de reversão fenotípica. Outros trabalhos já relacionaram o envolvimento de p53 com hormônios glicocorticóides em outros tipos celulares (Crochemore et al., 2002; Urban et al., 2003). A ativação de p53, induzida pelo tratamento com Hy nas células ST1, acarretaria a transcrição de seus genes-alvos que apresentaram expressão diferencial já comprovada (Vedoy & Sogayar, 2002), como, por exemplo, p21, Ciclina G, Trombospondina-1, MKP-1 (*Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-1*) e NRP/B. Sabendo-se que p53 regula a expressão de NRP/B ao nível transcricional (Liang et al., 2004; Polyak et al., 1997), a indução de NRP/B nos ensaios de Northern blot pode ser

explicada pela ativação de p53 durante o tratamento com Hy e conseqüente aumento de expressão de NRP/B. Já ao nível protéico, a indução não é tão evidente. A modulação da função dos produtos gênicos é um processo complexo, podendo ser exercida em diversos níveis, sendo a modulação da taxa de início de síntese e de outros estágios da transcrição o tipo de mecanismo mais comum de regulação gênica. Além disso, o processo de tradução fornece outros pontos de intervenção para regulação dos níveis de proteínas produzidas por uma célula, como em processos relacionados com aspectos estruturais das proteínas, como, por exemplo, modificações pós-traducionais, renovação protéica, interação com outras proteínas e localização sub-celular (Stryer et al., 2004). A fosforilação da proteína NRP/B num resíduo de tirosina é regulada durante a progressão do ciclo celular, sendo que a kinase responsável pela fosforilação ainda não foi identificada (Kim et al., 1998). Durante a diferenciação neuronal, NRP/B está associada com a forma hipofosforilada de pRB (Kim et al., 1998) e tal interação é específica e ocorre entre os domínios BTB de NRP/B e o sub-domínio TR de pRB (Kim et al., 2005). Durante o tratamento com Hy, há uma inibição da transição G1-S do ciclo celular das células ST1. Neste caso, a fosforilação de NRP/B estaria atenuada e poderia promover um acúmulo de NRP/B no núcleo das células, o que poderia explicar o resultado obtido na Figura 11. Outros experimentos seriam necessários para se confirmar a indução e localização das isoformas de NRP/B por Hy ao nível protéico, uma vez que um único experimento de western blot realizado com extratos protéicos enriquecidos para diferentes proteínas celulares (tratados ou não com Hy), mostrou uma leve indução dos níveis protéicos de expressão de NRP/B (Figura 12).

A análise do perfil de expressão ao nível de mRNA em painel de tecidos de rato da Clontech mostrou uma expressão exclusiva em tecido cerebral (Figura 13). Este resultado é semelhante ao encontrado para o gene NRP/B humano (Hernandez, 1998; Kim et al., 1998), sendo que estes autores também demonstraram níveis baixos de expressão em pâncreas, tecido este, não disponível no painel de cDNAs de rato da Clontech utilizado.

5.3. Análise funcional de NRP/B

Para a realização da análise funcional do gene NRP/B no modelo celular escolhido de células de glioma de rato ST1, foram escolhidos dois sistemas de transferência gênica: o sistema plasmideal e o retroviral. O sistema plasmideal do sistema Gateway (Invitrogen), recém lançado na época do início deste trabalho, apresentava como vantagem a transferência do inserto de estudo de um vetor de entrada (pENTR2B) para qualquer outro vetor de expressão, no caso deste trabalho, o vetor pDEST12.2 (vetor de expressão em células de mamíferos), através de uma simples reação de transposição, ao invés da metodologia de subclonagem tradicional, que é menos eficiente e mais trabalhosa. As construções contendo a região codificante de NRP/B de rato foram obtidas com sucesso, porém a seleção de clones transfectantes estáveis, utilizando-se dois antibióticos devido à existência de sub-populações celulares naturalmente resistentes à antibióticos na linhagem ST1, foi obtida apenas após várias tentativas de transfecção. A obtenção de apenas um clone transfectante estável para a construção pDEST12.2-NRP/B e outro para o vetor vazio pDEST12.2 demonstra a dificuldade da utilização do sistema plasmideal nesta linhagem, uma vez que já foi demonstrado em alguns trabalhos de ex-alunos do laboratório esta dificuldade para expressão ectópica de genes nas células ST1, principalmente pelo fato desta linhagem ser relativamente resistente à transfecção e apresentarem alterações significativas de fenótipo quando transfectadas com vetores plasmideais vazios.

Paralelamente, foi utilizado o sistema retroviral de transferência gênica para as células ST1. A padronização do processo de produção de retrovírus recombinante baseado no vetor pLPCX e a infecção de células ST1 foram realizadas juntamente com outro aluno de doutorado, Marcos A. A. Demasi. O sistema retroviral foi capaz de transduzir grande parte da população de células ST1, permitindo uma expressão gênica elevada, homogênea e estável, promovida pelas características do ciclo de vida de retrovírus, pela capacidade de integração estável em cópia única (ou poucas cópias) no DNA genômico das células e pela utilização de promotor forte. As populações de células ST1 superexpressando a região codificante de NRP/B de rato, EGFP e vetor vazio

pLPCX foram obtidas com sucesso e com facilidade, comparando-se com o sistema plasmideal.

Foram atingidos elevados níveis de expressão de NRP/B na população celular infectada duplamente com retrovírus, tanto por ensaios de Northern blot como por PCR quantitativo (Figuras 18 e 19). Já o nível de expressão de NRP/B na população de células ST1 infectadas somente uma única vez, em crescimento exponencial, é bem menor comparando-se com a dupla infecção no ensaio de Northern blot, mas é maior em relação à expressão do transfectante estável de NRP/B e em células ST1 parentais em crescimento exponencial, demonstrando a maior eficiência de transferência gênica pelo sistema retroviral (dupla infecção). Por este motivo, a população de células ST1 infectadas com retrovírus foi escolhida para realização dos ensaios funcionais de NRP/B. Ao nível protéico, a superexpressão de NRP/B foi confirmada por ensaios de Western blot, sendo que ambas isoformas foram superexpressas (Figura 20), e por imunofluorescência (Figura 21), onde observou-se uma localização predominantemente citoplasmática de NRP/B, como já descrito em tumores cerebrais humanos (Liang et al., 2004).

Tendo em mãos uma população de células ST1 que superexpressam NRP/B, foram realizados vários experimentos para avaliar como o gene influenciaria as características proliferativas destas células e se a superexpressão de apenas este gene poderia levar à semelhante inibição da proliferação induzida por hormônios glicocorticóides nas células ST1.

Os resultados das curvas de crescimento das populações de ST1 geradas por infecção retroviral, juntamente com a linhagem parental ST1, sugerem um pequeno aumento no tempo de dobramento das células em crescimento exponencial, mas não apresentaram diferenças na densidade de saturação quando tratadas (ou não) com Hy (Figura 23).

Entretanto, em ensaios de crescimento em suspensão de agarose, as células que superexpressam NRP/B mostraram uma menor e estatisticamente significativa habilidade de formação de colônias, em relação à linhagem parental e à linhagem celular infectada com vetor vazio pLPCX, sugerindo uma possível diminuição da capacidade tumorigênica destas células (Figuras 24 e 25).

Os resultados obtidos em ensaios de tumorigênese *in vivo* também demonstraram uma taxa de inibição do crescimento de tumor primário de aproximadamente 75% das células que superexpressam NRP/B (Figura 26).

Estes dados sugerem um efeito anti-tumoral de NRP/B. Uma das principais diferenças entre células tumorigênicas-transformadas e células normais é a capacidade de crescimento em meio semisólido (Cifone, 1982; Freedman & SHhin, 1974; MacPherson & Montagnier, 1964), uma vez que a sobrevivência de células normais requer a aderência a um substrato (Meredith Jr et al., 1993; Stupack et al., 2001). A característica de crescimento independente de ancoragem de células tumorais, assim como sua capacidade de crescimento em meio de cultura com baixa concentração de soro e perda da inibição por contato durante o crescimento, tem sido atribuído à autonomia destas células em relação aos mecanismos regulatórios de crescimento (Shin et al., 1975), como a superexpressão de Bcl2 e/ou perda da atividade de p53, que permitem que as células se tornem independentes dos sinais de sobrevivência mediada por integrinas (Jin & Varner, 2004). É conhecido que a dependência de ancoragem para o crescimento celular está confinada à fase G1 do ciclo celular e que somente células que atravessam o ponto de restrição ao final da fase G1 não requerem adesão ao substrato para completar o ciclo de divisão celular (Bohmer et al., 1996).

A recuperação da dependência de ancoragem em células ST1 tratadas com Hy pode ser devido ao efeito do hormônio em limitar a passagem das células além da fase G1 do ciclo. Este mesmo mecanismo pode ser atribuído à diminuição na formação de colônias em agarose e de tumores em camundongos *nude* em decorrência da superexpressão de NRP/B nas células ST1, já que em outro tipo celular (PC-12), a superexpressão de NRP/B provocou um acúmulo de células nas fases G0-G1 do ciclo celular (Kim et al., 2005). A diminuição de formação de colônias pequenas e médias nos ensaios de suspensão em agarose é evidente nas células ST1-NRP/B, porém não foi observada diminuição no número de colônias grandes. A superexpressão de NRP/B poderia estar dificultando somente o início da formação de colônias. Devemos lembrar que a população celular infectada com retrovírus contendo o cDNA de NRP/B não é uma linhagem originada de um clone celular, e a heterogeneidade dos níveis de expressão de NRP/B das células pode ser

responsável pelo resultado obtido. O crescimento tumoral *in vivo* é dependente de angiogênese (Folkman, 1995) já que a formação de veias sanguíneas é crítico para este processo (Ribatti et al., 1999), ou seja, a inibição do crescimento do tumor está correlacionada com a redução de vascularização. A angiogênese é um processo controlado por diversas proteínas produzidas no corpo humano que estimulam as células a repararem danos em veias sanguíneas ou a formarem novas veias, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Sauer & Deissler, 2003), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) (Dalal et al., 2005), fator de crescimento de fibroblasto ácido (aFGF), Interleucina-8, angiogenina, fator de crescimento de placenta (PGF) (Folkman, 2002), fator de crescimento transformante – $TGF\alpha,\beta$. Os agentes antiangiogênicos são a angiostatina (Narizhneva et al., 2005), trombospondina-1, fragmento de 16kD da prolactina, Interferon $-\alpha,\beta$ e endostatina (Carmeliet & Jain, 2000; Folkman, 2004). Interessantemente, o gene da trombospondina-1 também foi isolado como sendo diferencialmente expresso nas células ST1 depois do tratamento com hormônio Hy, juntamente com o gene NRP/B (Vedoy & Sogayar, 2002), o que indica que genes com papel antiangiogênico e anti-tumoral de NRP/B estão relacionados com o efeito anti-tumoral de GC em células ST1. Experimentos que avaliem a densidade de vasos sanguíneos nos tumores de células ST1-pLPCX e células ST1-NRP/B seriam necessários para se confirmar esta hipótese. Somente foi realizado o ensaio de imunohistoquímica que comprovou a superexpressão de NRP/B no único tumor pequeno formado a partir de células ST1-NRP/B nos ensaios de tumorigênese *in vivo* (Figura 27).

A partir dos resultados obtidos nesta parte do trabalho, pode-se concluir que as células ST1 que superexpressam o gene NRP/B possuem menor habilidade em crescimento em meio semi-sólido, assim como apresentam uma redução da tumorigenicidade em camundongos nude, sugerindo que NRP/B possua uma função de supressor de tumor na tumorigênese de gliomas. Apesar destes resultados obtidos para a população celular ST1-NRP/B possam ser decorrentes de artefatos de uma situação forçada de superexpressão, os dados permitem uma melhor compreensão para elucidação dos mecanismos moleculares de ação do hormônio hidrocortisona nas células de glioma de rato

ST1, fornecendo informações importantes da atuação de hormônios glicocorticóides no controle de proliferação celular.

Como o efeito da superexpressão é artificial, os resultados podem ou não refletir o que realmente ocorre nas células ST1 quando submetidas ao tratamento com hormônio glicocorticóide. Uma alternativa para contornar este problema seria avaliar o efeito do silenciamento de NRP/B sobre o potencial de Hy inibir o crescimento das células ST1. O silenciamento de NRP/B em células ST1 através do sistema lentiviral somente se mostrou eficiente quando foi realizada uma tripla infecção com os três diferentes RNAs desenhados para o gene NRP/B. As populações de células ST1 infectadas somente com um tipo de RNAi de NRP/B apresentaram apenas uma diminuição da indução da expressão de NRP/B promovida por hidrocortisona. Os ensaios de citometria de fluxo mostraram que as populações celulares infectadas (271, 761 e 956) respondem da mesma forma que as células parentais ST1 ao tratamento com Hy, promovendo um acúmulo de células na fase G0-G1 do ciclo celular. O resultado da ausência de indução de NRP/B nas populações de células infectadas com cada tipo de RNAi para NRP/B pode ser explicado devido à expressão de NRP/B já se apresentar elevada nas células carenciadas para soro (o nível de expressão de NRP/B foi calculado utilizando-se, como amostra calibradora, o nível de expressão de cada população celular carenciada). Devido à dificuldade de se obter o silenciamento do gene NRP/B nas células ST1, estas populações celulares foram obtidas apenas recentemente e a análise funcional para avaliar o impacto da inibição da expressão de NRP/B nas células ST1 ainda não foi realizada. Mas foi possível utilizá-las para avaliar o envolvimento de NRP/B na progressão do ciclo celular, discutido a seguir.

A evidência que o gene NRP/B pode estar envolvido no processo de progressão do ciclo celular veio da observação da indução da expressão de NRP/B em células de fibroblastos de camundongo normais estimuladas com soro, de modo a induzir a progressão celular através do ciclo celular (Figura 35). A expressão de NRP/B está sendo modulada ao longo do ciclo celular. Ao verificamos os nossos dados de superexpressão de NRP/B em células ST1, pudemos observar que a superexpressão do gene promoveu uma leve tendência para um maior tempo de dobramento em crescimento exponencial quando comparada com a linhagem parental ST1 (Figura 23). A análise da

transição G0/G1-S nas células ST1 silenciadas para o gene NRP/B demonstrou que a porcentagem de células na fase S é ligeiramente maior após, promovendo uma progressão no ciclo celular um pouco mais acelerada em comparação com a linhagem parental ST1 (Figura 36). Todos estes resultados preliminares sugerem que a expressão de NRP/B é um elemento importante para uma perfeita progressão do ciclo celular, embora sejam necessários dados mais conclusivos para se confirmar o real papel de NRP/B no ciclo celular. A superexpressão de NRP/B selvagem em células PC-12 provocou um acúmulo de células na fase G0-G1 do ciclo celular (Kim et al., 2005), dado que corrobora os nossos resultados.

Alguns mecanismos moleculares descritos na literatura podem levantar algumas hipóteses sobre a inibição da progressão do ciclo celular induzida por NRP/B. Mecanismos que controlam o ciclo celular podem afetar a matriz nuclear e seus complexos constituintes em diversos níveis. pRB é uma conhecida proteína associada a matriz nuclear (Loidl & Eberharter, 1995), sendo regulada por fosforilação dependente do ciclo celular e desempenhando um papel fundamental na supressão de tumores (Riley et al., 1994). Na sua forma hipofosforilada (fase G0 e início de G1), pRB evita a entrada prematura na fase S por se ligar ao fator de transcrição E2F, inibindo sua atividade. Os níveis de fosforilação de pRB, promovido pelo complexo cyc-D-cdk4 e cycE-cdk2, aumentam à medida que as células progridem na fase G1 do ciclo celular (Nevins et al., 1997). Foi demonstrado que NRP/B é altamente fosforilado durante a progressão no ciclo celular de células SH-SY5 e que a suprerexpressão de de NRP/B em células PC-12 induz crescimento de neuritos e parada de crescimento na fase G0-G1 do ciclo celular (Kim et al., 1998; Kim et al., 2000). O domínio BTB de NRP/B é importante para interação com a proteína pRB por interação com o subdomínio TR, o qual é conservado entre as ciclinas. A função de uma proteína zinc finger de leucemia promielocítica (PLZF) foi descrita com um repressor transcricional através da ligação de seu domínio BTB a promotores de genes alvos envolvidos na regulação do ciclo celular, como a ciclina A (Yeyati et al., 1999). O efeito de supressão do crescimento de NRP/B pode ser mediado através da interação do domínio BTB com pRB ou possivelmente, por outras proteínas regulatórias do ciclo celular como E2F ou CDKs (Kim et al., 2005).

O nosso laboratório vem explorando, há décadas, as bases moleculares da ação anti-tumoral de GCs nas linhagem de glioma de rato ST1 para correlacionar tais dados para gliomas humanos (Colin, 2006). Atualmente, há várias linhas de pesquisas propostas no laboratório para caracterização de genes responsáveis pelo controle da proliferação celular, diferenciação e interação célula-célula em outros tipos de tumores humanos (de próstata, insulinooma, de mama), além dos cerebrais. Devido à disponibilidade de várias linhagens de diversos tecidos humanos no laboratório, foi possível avaliar a expressão de NRP/B em linhagens humanas tumorais de cérebro e de mama, e uma menor expressão em linhagens de útero, próstata e pulmão (Figura 37A). Em tecidos humanos normais, a expressão de NRP/B foi avaliada somente no cérebro e uma expressão menor em pâncreas (Kim et al., 1998).

Nas linhagens de próstata, a maior expressão de NRP/B foi detectada na linhagem PC3 que é andrógeno dependente e uma menor expressão nas linhagens LN (responsiva à andrógeno) e DU145 (não responsiva à hormônios). Nas linhagens de pulmão, a expressão de nRP/B não foi detectada na única linhagem derivada de fibroblastos normal de pulmão (IMR90), mas foi detectada nas outras derivadas de carcinoma e adenocarcinoma de pulmão. Nas linhagens de mama, uma maior expressão de NRP/B foi detectada nas linhagens ZR751, MB231 e HS578T (estas últimas duas apresentam maior potencial invasivo dentre as 5 linhagens) e uma menor expressão nas linhagens MCF7 (que possui menor potencial invasivo) e MB435 (que apresenta potencial invasivo e elevado potencial metastático). A expressão de NRP/B em tecido de mama está sendo descrita, pela primeira vez, no presente trabalho. Considerando-se o resultado obtido nas linhagens de tumores de mama, pode-se sugerir um papel importante de NRP/B neste tipo específico de tumor. O laboratório possui cDNAs de amostras clínicas de tumores de mama que poderiam fornecer informações interessantes relacionada ao padrão de expressão gênica de NRP/B com desenvolvimento e/ou progressão de tumores mamários. Este é um experimento que será realizado assim que possível.

Quanto às linhagens de cérebro, uma expressão elevada de NRP/B foi observada nas linhagens A172 e U373 (ambas derivadas de GBM), uma baixa expressão foi observada nas linhagens T98G, HOG e U343 (derivadas de GBM, oligodendroglioma e astrocitoma, respectivamente) e uma expressão

intermediária na linhagem U87, derivada de GBM. A expressão de NRP/B também já foi determinada em outras linhagens celulares de glioblastomas como SNB-19, SK-MG12, U-251MG e U118-MG por ensaios de Northern blot (Hernandez, 1998; Kim et al., 2000).

A expressão de NRP/B também foi analisada por ensaios de PCR quantitativo em amostras clínicas de tumores astrocíticos de diferentes graus de malignidade, revelando, pela primeira vez, um aumento da sua expressão correlacionada com aumento de malignidade dos tumores (grau II até GBM), comparando a expressão com tecido cerebral normal (Figura 37B). Mutações foram detectadas na seqüência de NRP/B em linhagens humanas de tumor cerebral e em culturas primárias de GBM humano e contribuem para a tumorigênese cerebral por ativação da proliferação celular, supressão de apoptose e alteração na dinâmica do citoesqueleto nuclear (Liang et al., 2004). Tais alterações, em decorrência de mutações no gene de NRP/B, contribuem para a tumorigênese de tecidos cerebrais, ligada ao aumento de expressão do mutante de NRP/B. As mutações no domínio BTB de NRP/B, domínio responsável pela interação com pRB (Kim et al., 2005), podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de tumores cerebrais por alterar as funções normais de pRB, uma vez que, mutações em pRB ou nas vias mediadas por pRB ocorrem em 70-80% dos glioblastomas (Henson et al., 1994; Ichimura et al., 2000; Ueki et al., 1996). A significativa baixa expressão de NRP/B observada para as amostras de astrocitoma de grau I mostra claramente que este tumor, também chamado de Astrocitoma Pilocítico, é o único astrocitoma considerado benigno e com características distintas dos outros graus (II, III), que estão correlacionados para a progressão até o grau IV do tumor mais agressivo. O seqüenciamento de NRP/B nas amostras clínicas será realizado para avaliar a existência de mutações e se estas estariam relacionadas com os tumores astrocíticos de maior grau de malignidade.

5.4. Considerações Finais

Utilizando-se o modelo de glioma de rato ST1, nosso laboratório tem identificado diversos genes envolvidos no efeito anti-proliferativo dos hormônios glicocorticóides. A determinação dos mecanismos moleculares da ação destes

hormônios poderia levar à identificação de potenciais alvos para o desenho de novas estratégias no tratamento de gliomas. Neste trabalho, foi possível identificar e caracterizar a sequência completa correspondente ao transcrito de NRP/B de rato, ainda desconhecida, e depositá-la no Banco de Dados do GenBank (AY669396). Dados recentes do laboratório sugerem o envolvimento de p53 na reversão fenotípica das células ST1 induzidas por GCs. NRP/B é alvo transcricional de p53 e seria interessante avaliar se os seus níveis de expressão são modulados em outros sistemas celulares onde a ativação de p53 faça parte da ação anti-proliferativa de GCs. O papel funcional de NRP/B foi avaliado através da superexpressão do gene na linhagem ST1, o que provocou diminuição da capacidade de crescimento em meio semi-sólido e diminuição do potencial tumorigênico em ensaios de tumorigenicidade *in vivo*. É de fundamental importância avaliar o efeito do silenciamento do gene nas células ST1, uma vez que o efeito de superexpressão é muito artificial. O estabelecimento de modelos experimentais *in vivo* de tumorigênese ortópica (no mesmo local de onde o tumor originalmente foi extraído), através de estereotaxia, permitirá correlacionar a contribuição de NRP/B em processos como invasão, migração e angiogênese, dentro do microambiente próprio onde esses tumores se desenvolvem naturalmente. Nossos resultados relataram, pela primeira vez, uma correlação positiva entre o aumento da expressão de NRP/B com o aumento do grau de malignidade de gliomas humanos. Além disso, neste trabalho, experimentos preliminares indicaram o envolvimento do gene NRP/B no processo de progressão do ciclo celular, sendo que futuras análises serão realizadas para confirmação destes dados.

5.5. Identificação de genes putativamente associados com tumores do sistema nervoso central e avaliação de expressão em linhagens e amostras clínicas de glioma humano.

5.5.1. Estratégias adotadas para identificação de putativos genes associados com gliomas

Foram utilizadas duas estratégias diferentes para a identificação de genes localizados na região 22q13 do cromossomo 22 humano: na primeira, foram utilizados os dados do Transcriptoma Humano, e na segunda, utilizou-se os dados obtidos na hibridização de microarrays com cDNAs das células ST1 e P7 (Colin, 2006).

Na primeira estratégia adotada, foi realizada uma revisão bibliográfica com o intuito de identificar regiões cromossômicas perdidas (Kozjak et al.) durante o desenvolvimento de gliomas. Os estudos que foram utilizados para esta identificação analisavam a perda de marcadores de microsatélite, e com base nesses dados, foi possível estabelecer uma região mínima de 5,5kb, flanqueada pelos marcadores D22S282 e D22S1169 que comumente é perdida durante o desenvolvimento de gliomas. Foi possível identificar os clones genômicos que se localizavam no intervalo compreendido entre os dois marcadores, através da ferramenta Map Viewer, disponibilizada pelo NCBI. O número de acesso de cada clone foi utilizado para buscas de seqüências expressas no Banco de Dados do Transcriptoma Humano.

Para o isolamento de ESTs mapeados na região 22q13 delimitada para estudo, foi adotado o critério bastante estrigente de presença de estrutura de *splicing* nas ESTs quando alinhadas contra a seqüência genômica. Este critério elimina as seqüências contaminantes de DNA genômico e promove uma seleção confiável de seqüências realmente transcritas, embora haja eliminação de várias ESTs verdadeiras, principalmente as derivadas da porção 3' de transcritos. Devido ao elevado número de ESTs que apresentavam estrutura de *splicing*, a redução de ESTs candidatas ocorreu através da seleção daquelas que possuíam expressão em tecido cerebral. (Tabela 4). Somente a EST6, que não apresenta estrutura de *splicing* foi selecionada devido à existência de outras ESTs possuidoras de tal estrutura.

Em relação aos transcritos completos (seqüências *full length*) localizados na região de estudo do cromossomo 22 humano, 21 seqüências foram selecionadas após eliminação da redundância através de consulta feita ao Banco de Dados do Transcriptoma Humano.

Para a segunda estratégia adotada para seleção de genes que poderiam estar relacionados com o desenvolvimento de câncer cerebral, foram utilizados os dados obtidos na hibridização de *microarrays* Affymetrix® com cDNAs das células ST1 e P7, trabalho realizado na tese de doutorado de Christian Colin (Colin, 2006). Neste trabalho, foi possível inferir e confirmar a expressão correlacionada de um conjunto de genes relevantes para gliomas humanos, a partir de dados de expressão de linhagens de glioma de rato. Como exemplo, exatamente como ocorre em GBM humano, observou-se uma expressão aumentada de diversos receptores de fatores de crescimento peptídicos na linhagem P7 (mais transformada), além de vários outros genes relacionados à migração de células e desenvolvimento do sistema nervoso central. Já na linhagem ST1 foi observada maior expressão de genes relacionados com regulação negativa da proliferação celular e supressão tumoral (Colin, 2006).

Como os dados obtidos no *array* eram de seqüências de rato, foi necessário realizar uma análise dos genes para localização do seu ortólogo correspondente do genoma humano. Automaticamente, foi possível determinar a localização cromossômica no genoma humano de apenas 38% dos genes devido ao transcriptoma de rato estar incompleto, sendo que a análise dos genes restantes foi realizada manualmente. Da listagem de 1.293 seqüências diferencialmente expressas entre as linhagens ST1 e P7, somente 23 genes/ESTs localizavam-se no cromossomo 22. Destes, somente doze genes foram selecionados para análise de expressão em linhagens e amostras clínicas de gliomas humano: quatro ((1')HMOX-1, (21')TIMP3, (3')NF2 e (7')YWHAH) genes já relacionados com a progressão de gliomas humanos foram utilizados para validar as amostras clínicas de tumores cerebrais de diferentes graus de malignidade; duas isoformas de gene com maior expressão na linhagem P7 ((19')TCF20) para avaliar se ambas possuem o mesmo perfil de expressão nas amostras testadas; três genes que são expressos em tecido cerebral, porém não associados com tumores cerebrais ((14') NPTX, (16')SYNGR e (22')SOX10); e outros quatro genes ((2')SDF2L1, (4')TOB2,

(8')PIM3 e (9')TOB2) isolados com maior expressão nas células ST1 (com menor potencial tumorigênico), já que nossa busca é de genes supressores de tumor em gliomas.

5.5.2. Quantificação de expressão gênica relativa por PCR em tempo real

A validação experimental em cDNAs de linhagens e amostras clínicas de tumores cerebrais humanos foi realizada para todas as ESTs e genes descritos no item anterior, principalmente pelo fato da maior parte dos genes não estarem relacionados com desenvolvimento ou progressão de tumores cerebrais. Inclusive, os genes que possuíam aparente papel na oncogênese de outras neoplasias foram testados para confirmação de expressão dos mesmos nas amostras tumorais e principalmente em cérebro, uma vez que a expressão de um gene em um tecido específico não é necessariamente em outro.

A discussão da quantificação da expressão gênica por PCR será feita separadamente; abordando primeiro, as ESTs isoladas da região do cromossomo 22 delimitada para estudo através do Banco de Dados do Transcriptoma Humano, seguida das seqüências *full length* isoladas através do uso do mesmo banco e, finalmente, os genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato que se localizam no cromossomo 22 humano.

- ESTs isoladas através do Banco do Transcriptoma mapeadas na região 22q13.31 a 22q13.33

A análise de expressão gênica das EST selecionadas foi realizada, primeiramente, em linhagens celulares de glioma de humano. Como já citado no item anterior, a amplificação de algumas ESTs não ocorreu devido à existência de regiões repetitivas nas seqüências, o que impossibilitou o desenho de *primers*, ou pelo fato das ESTs serem as únicas seqüências expressas representantes de uma região no genoma humano, o que sugere uma expressão baixa ou em janelas de tempo restritas de células, difícil de ser detectada por reação de PCR normal, sendo necessária a utilização de *primers* do tipo nested para amplificação. A amplificação ocorreu nas ESTs 2, 5, 6, 8, 10 e 13 (Figura 42). Na análise de expressão gênica em amostras clínicas de

tumores cerebrais humanos, a EST3 que não havia sido amplificada nas linhagens celulares de tumores de cérebro, foi amplificada nestas amostras (Figura 45). A manutenção de 60% das correlações (positivas e negativas) nas amostras clínicas de glioma (Tabela 11) em relação às amostras de linhagens de glioma humano (Tabela 8). Não foram encontradas diferenças significativas de expressão gênica quando tumores de diferentes graus foram comparados entre si, o que pode indicar que o aumento de expressão destas ESTs esteja relacionado com a condição tumoral (início da formação de tumor), sendo um processo comum em todos os diferentes graus de malignidade de gliomas. As ESTs 2, 10 e 13 demonstraram menor correlação positiva quando comparadas com as outras ESTs nas amostras clínicas de tumores cerebrais humanos, assim como nas linhagens celulares, com exceção da EST10. A expressão relativa da EST2 nas amostras de gliomas dos diversos graus de malignidade não foi muito alterada, considerando-se a pequena diferença nos níveis de expressão, apesar das diferenças entre o grau I (menor expressão) e grau II (maior expressão) serem estatisticamente significativas, comparando-se com o nível de expressão das amostras não-tumorais (teste-t). As ESTs 10 e 13 apresentaram uma expressão maior e significativa somente em uma das amostras de glioma (grau IV e II, respectivamente), quando comparadas com as amostras de tecido não-tumoral.

Os níveis de expressão das ESTs analisadas nas linhagens celulares de glioma humano se correlacionam, sendo que as mesmas correlações se mantiveram entre os níveis de expressão nas amostras clínicas, o que pode sugerir a existência de elos regulatórios ou funcionais entre elas. O objetivo do trabalho era a identificação de genes supressores de tumor na região 22q13.31 e 22q13.33, porém nenhuma destas ESTs apresentou menor expressão nas amostras clínicas de glioma, mas, ao contrário, as ESTs 3, 5, 6 e 8 se mostraram superexpressas nas amostras de glioma. Somente a EST2 mostra uma tendência de expressão menor nas amostras clínicas de gliomas de grau I (estatisticamente significativa) e glioblastomas (GBM), o que sugere a necessidade de um estudo futuro mais aprofundado para caracterização do transcrito completo desta EST (KIAA1644, que corresponde a uma proteína identificada num projeto de seqüenciamento de mRNAs em larga escala, e que

não possui função conhecida) para confirmação do seu papel na gênese de tumores cerebrais humanos.

- Seqüências *full length* isoladas através do Banco do Transcriptoma mapeadas na região 22q13.31 a 22q13.33

A análise de expressão das seqüências *full length* foi realizada, primeiramente, nas linhagens celulares de tumores cerebrais humanos. A amplificação ocorreu com todos os pares de *primers* desenhados para os genes (Figura 43), com exceção do gene SULT4, A1. Na análise de expressão gênica em amostras clínicas de tumores cerebrais humanos, todos os genes foram analisados (Figura 46). Houve a manutenção de apenas 44% das correlações (positivas e negativas) nas amostras clínicas de glioma (Tabela 9) em comparação com as amostras de linhagens de glioma humano (Tabela 12). Os níveis relativos de expressão dos genes (4)CGI, (8)C22orf9, (11)ATXN10, (13)PKDREJ, (16)TRMU não se alteraram nas amostras clínicas de gliomas quando comparadas com tecido não-tumoral, sugerindo que estes genes não estejam relacionados com o desenvolvimento de tumores cerebrais.

Já outros seis genes ((6)PPR5, (12)FLJ27365, (14)PPARA, (15)FLJ20699, (18)CELSR1, (20)CERK) apresentaram expressão maior estatisticamente significativa em todas as amostras de gliomas, quando comparada com tecido não-tumoral. O gene (6)PPR5 é um candidato gene supressor de tumor em carcinomas mamários (podendo ter seu promotor metilado ou ter sua expressão diminuída pela ação de desacetilação de histonas), porém se apresenta superexpresso em tumores de cólon (Johnstone et al., 2005), assim como se apresenta nas amostras clínicas de tumores cerebrais humanos analisadas. As bases moleculares para a regulação oposta da expressão de (6)PPR5 entre tais tecidos ainda não é conhecida, bem como sua função. Tal modulação diferencial de genes supressores de tumor tem sido observada em diversos genes, como, por exemplo, o gene supressor de tumor p16 que está superexpresso em carcinoma colorretal e apresenta menor expressão em carcinoma pancreático e em outros cânceres (Dai et al., 2000; Naka et al., 1998). Duas seqüências de FLJs ((15)FLJ 20699 e (12)FLJ27365) selecionadas também apresentaram maior expressão nas amostras de gliomas, sendo que a caracterização das proteínas seria necessária para

melhor compreensão do papel destes das mesmas no desenvolvimento de gliomas humanos. Há evidências que (14)PPARs sejam capazes de suprimir o crescimento de diferentes tipo de cânceres humanos, por mecanismos distintos de parada de crescimento, apoptose e indução de diferenciação, sendo que, por exemplo, mutações em outra isoforma de PPAR, a PPAR γ em carcinoma de colon, provoca perda da habilidade de ligação e de seu papel de supressor de tumor (Strakova et al., 2005). A expressão elevada de (14)PPARA nas amostras clínicas de gliomas também pode ocorrer em decorrência da expressão de um receptor mutado, que promoveria a perda da sua capacidade de supressão de crescimento de tumor ou da ausência de ligantes específicos que promovam a supressão de crescimento celular, uma vez que a utilização de agonistas específicos fenofibrato e gemfibrozil provoca inibição da resposta inflamatória em astrócitos (Xu et al., 2006). (18)CELSR1 é um gene especificamente neural, estando envolvido na via de sinalização de polaridade planar das células (PCP - Planar Cell Polarity). A ativação aberrante de vias de sinalização de ativação de PCP em cânceres humanos pode favorecer o aparecimento de fenótipos malignos, como anormalidades na polaridade do tecido, invasão e metástase (Kato, 2005), o que pode explicar a superexpressão de celsr-1 nas amostras de gliomas. A ceramida quinase ((20)CERK) e seu produto, ceramida 1-fosfato são reguladores e indutores de resposta inflamatória (Pettus et al., 2003), fazendo com que a superexpressão encontrada para CERK nas amostras clínicas de gliomas seja coerente. Inibidores potenciais de CERK podem originar uma nova geração de agentes antiinflamatórios e anti-câncer (Lamour & Chalfant, 2005).

As seqüências *full length* (1)FLJ23588, (Gill et al.)PNPLA3, (9)RIBC2, (19)DIP e (21)TBC1D22A apresentaram expressão superior e estatisticamente significativa em somente duas das classes de amostras de gliomas, assim como os genes (7)NUP50 e (10)FBLN1 apresentaram expressão superior e estatisticamente significativa em somente uma das classes de amostras clínicas de gliomas. Somente o gene (17)GTSE1 apresentou maior expressão nas classes de amostras de gliomas grau I, III e GBM, com significância estatística. Estes resultados sugerem um aumento de expressão dos genes relacionado ao estadiamento ou tipo histológico do tumor.

Dos 21 genes analisados nas amostras clínicas de gliomas humanos, somente dois apresentaram expressão significativamente inferior nas amostras de gliomas quando comparadas com amostras não-tumorais. O gene (2)SULT4A1 (sulfotransferase 4A1) está envolvido no metabolismo de neurotransmissores (Liyou et al., 2003), sendo que seu substrato ainda não foi identificado. A descoberta da real função de sult4A1 poderia explicar sua menor expressão observada nas classes de amostras clínicas de glioma grau I, III e GBM, quando comparada com amostras normais. Vale ressaltar que o glioma grau I ou Pilocítico é um único astrocitoma considerado benigno, enquanto os outros graus (II, III) estão correlacionados para a progressão até o grau IV do tumor mais agressivo. A parvina- γ ou parvg pertence à família de proteínas ligadoras de actina (Korenbaum et al., 2001) que estão associadas à adesão focal, interação célula-matriz, sendo sua expressão essencial para manutenção da morfologia celular normal. Sua expressão reduzida poderia implicar na progressão de neoplasias e tumores, semelhante a outras moléculas de adesão já descritas como supressores de tumor (Huang et al., 1997). Apesar das evidências de redução da expressão de PARVG em algumas linhagens celulares de câncer (Korenbaum et al., 2001), não foram encontradas mutações que se relacionem com a carcinogênese em mama, cólon e oligodendrogliomas (Alonso et al., 2005; Castellvi-Bel et al., 2003), somente polimorfismos que foram encontrados em ambas amostras de DNA de tecido tumoral e não-tumoral. Nossos resultados mostram uma diminuição da expressão de parvg que é significativa somente nas amostras clínicas de glioblastoma multiforme, o que sugere um papel na progressão de tumores astrocíticos e não na inicialização tumoral.

- Genes diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7 localizados no cromossomo 22 humano.

A análise de expressão dos genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 foi realizada, primeiramente, nas linhagens celulares de tumores cerebrais humanos. A amplificação ocorreu com todos os pares de *primers* desenhados para os genes (Figura 44). Na análise de expressão gênica em amostras clínicas de tumores cerebrais humanos, todos os genes foram analisados (Figura 47), com exceção para os genes (14')NPTX e

(16')SYNGR1, que não apresentaram amplificações nos cDNA testados. Houve a manutenção de 40% de correlações (positivas e negativas) nas amostras clínicas de glioma (Tabela 10) em relação às obtidas nas amostras de linhagens de glioma humano (Tabela 13). Os níveis relativos de expressão dos genes, (7')YWHAH, (8')PIM3 e foram alterados de maneira semelhante nas amostras clínicas de gliomas, apresentando uma diminuição da expressão em amostras clínicas de grau III, seguido de um aumento da expressão nas amostras de glioblastoma multiforme, ambos significativos. Os genes (2')SDF2L1 e (22')SOX10 mostraram expressão estatisticamente significativa nas amostras de GBM e de astrocitomas pilocíticos, respectivamente. Estes resultados sugerem que as expressões destes genes estejam relacionadas mais especificamente com o estadiamento ou tipo histológico do tumor.

Já o restante dos genes ((1')HOMX, (3')NF2, (4')TOB2, (9')TOM1, (19')TCF20 ambas isoformas e (21')TIMP3) apresentaram expressão estatisticamente significativa maior em todas as amostras de gliomas, quando comparadas com tecido não-tumoral. O gene heme oxigenase ((1')HMOX1) confirmou os dados da literatura, pois é expresso seletivamente em cérebro (Hara et al., 1996) e induzido simultaneamente com ativação de macrófagos (Muraoka & Shibahara, 1993), sendo que os níveis de mRNA de heme oxigenase (hmox1) estão associados com a densidade vascular e o aumento da infiltração de macrófagos em glioblastomas (Nishie et al., 1999). Nossos resultados relativos ao gene (3')NF2 corroboram aqueles obtidos por imunofluorescência em tumores cerebrais (Hitotsumatsu et al., 1997), porém, não foram encontradas mutações neste gene em gliomas (De Vitis et al., 1996; Hoang-Xuan et al., 1995; Ng et al., 1995; Rubio et al., 1994; Watkins et al., 1996), fato que não permite associar este gene com um papel na tumorigênese ou na transformação maligna de neoplasmas astrocíticos, podendo ser um efeito secundário no processo de transformação maligna. A expressão elevada do gene (4')TOB2 nas amostras clínicas de gliomas sugere seu papel na progressão de tumores astrocíticos. Experimentos que comprovassem a sua localização celular nos gliomas seriam necessários para melhor compreensão do papel deste gene na condição tumoral de tecidos cerebrais, uma vez que em decorrência da alteração da sua localização nuclear para citoplasmática, provoca diminuição do seu papel antiproliferativo. Tal efeito foi observado em

células transformadas por ErbB2, ras ou src (Kawamura-Tsuzuku et al., 2004). A proteína (9')TOM1 está envolvida no tráfego endossomal e o gene correspondente se apresenta mais expresso em todas as classes de amostras de glioma (Grau I, II, III e IV), e pode estar relacionada com o início da progressão tumoral, sendo um processo comum a todos os graus de malignidade. O fator de transcrição 20 ((19')TCF20) liga-se ao promotor de MMP3 (stromelysin-3) e estimula sua transcrição (Kirstein et al., 1996). MMP3 é uma metaloproteinase que degrada matriz extracelular, que está correlacionada diretamente com tumorigenicidade e invasividade de linhagens celulares de astrocitomas (Mercapide et al., 2003), dados que explicam a maior expressão de TCF20 nas amostras clínicas de glioma. A superexpressão de MMP3 em glândulas mamárias de camundongos transgênicos induz a progressão tumoral de hiperplasias para carcinomas malignos (Sternlicht et al., 1999), sendo considerado um gene promotor natural de tumores que eleva a susceptibilidade à câncer (Sternlicht et al., 2000). TCF20 também aumenta a atividade transcricional de fatores de transcrição, atuando como co-ativador transcricional (Rekdal et al., 2000). As duas isoformas de TCF20 foram analisadas, mas não foram observadas diferenças de expressão entre as isoformas, demonstrando que ambas variantes estão relacionadas com o desenvolvimento e/ou progressão de gliomas humanos. O padrão de *splicing* de TCF20 é conhecido e varia em diferentes tecidos e durante o desenvolvimento embrionário (Rekdal et al., 2000). O inibidor tecidual de metaloproteinases-3 ((21')TIMP3) regula a composição de matriz, suprimindo crescimento celular, invasão e migração (Birkedal-Hansen et al., 1993), inibe a angiogênese mediada por VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e induz apoptose (Ahonen et al., 1998; Qi et al., 2003), sendo considerado um supressor de tumor (Anand-Apte et al., 1996). Metilação em sua região promotora foi encontrada em glioblastomas multiforme secundários (Nakamura et al., 2005). Os nossos resultados, porém, apresentam aumento da expressão de TIMP-3 nas amostras clínicas de gliomas ao nível de mRNA. Outros experimentos seriam necessários para avaliar a presença de possíveis mutações no gene nas amostras de gliomas e/ou diferenças de ativação ou o balanço entre MMPs/TIMPs, o que melhor explicaria os resultados obtidos. Resultados obtidos recentemente no laboratório indicam que a invasão e

metástase tumoral é o balanço MMP/inibidor em amostras de carcinoma de mama (Figueira, 2006). A utilização do balanço enzima/inibidor como fator prognóstico na determinação do risco do desenvolvimento de metástases poderá ser verificado através de estudos envolvendo um maior tempo de seguimento das pacientes (Blavier et al., 1999).

5.5.3. Considerações Finais

O genoma humano possui uma organização complexa de aproximadamente 3 bilhões de nucleotídeos. A utilização da tecnologia de seqüenciamento automatizado e a dedução da seqüência completa do genoma humano (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) tem acelerado a identificação de mutações e alterações no genoma de cânceres (aberrações cromossômicas, translocações, deleções, amplificações e metilações), as quais podem ser utilizadas como alvos de novas terapias. (Balmain et al., 2003; Strausberg et al., 2004)

O seqüenciamento de cDNAs continua sendo uma metodologia de grande importância para a identificação e definição da estrutura do gene, apesar de seu custo elevado (Ota et al., 2004). As seqüências *full length* de mRNAs são cruciais para identificação de formas alternativas de *splicing* relacionadas com a fisiologia celular normal, bem como patologias complexas, como cânceres (Xu & Lee, 2003), além do papel biológico destas variantes na progressão e origem de neoplasias. A identificação de genes *in silico* é bastante direta, sendo que os programas de predição são desenhados para permitir o reconhecimento de estruturas de genes humanos (como exemplo, fases abertas de leitura, início de transcrição, sítios de *splicing*, entre outras características) na seqüência genômica. Porém esta metodologia não é muito confiável, uma vez que análises preliminares da seqüência completa do cromossomo 22 mostraram que entre os transcritos identificados neste cromossomo por programas de predição, somente 20% possuíam a predição correta de sua estrutura e 16% de exons validados experimentalmente, não foram detectados pelos programas de predição (Dunham et al., 1999).

A montagem da seqüência genômica do cromossomo 22 e de seus transcritos sofrem alterações constantes conforme a identificação e validação

de novos transcritos. Este fato pode ser evidenciado pelo aumento do número de genes (21) descritos e localizados na região de estudo (entre os marcadores D22S282 e D22S1169) no cromossomo 22, no início deste estudo em 2001, para 50 genes na penúltima atualização (*build 35 version*) e 53 genes na última atualização (*build 36 version*) do banco de dados do MapViewer (do NCBI). Esta atualização constante dificultou nossa procura de um gene supressor de tumor que possa estar relacionado com a tumorigênese de gliomas humanos, já que não foi possível analisar todos os genes descritos na região delimitada apresentando, freqüentemente, perda de heterozigose do cromossomo 22. Outro fator que limitou a nossa procura foi o critério de seleção de ESTs, o qual foi muito estridente, uma vez que o número inicial de seqüências parciais expressas era muito grande, o que impossibilitaria a análise de todas. As ESTs oferecem uma gama de informações de seqüências que apresentam níveis de expressão que variam de pouco a muito expressas.

Como a perda de heterozigose no cromossomo 22 não é um evento com 100% de freqüência nos gliomas humanos, assim como não o é para outras regiões que apresentam LOHs, provavelmente há um balanceamento na perda de funções de vários genes, com funções de genes supressores de tumor ou oncogenes. A LOH no 22q não está relacionada com outras alterações genéticas comumente encontradas em gliomas, como perda no cromossomo 1p, 9q, amplificação de EGFR e deleção de INK4/ARF, exceto com a perda em 10q, outra região altamente relacionada com a progressão tumoral (Laigle-Donadey et al., 2006). Normalmente, a associação de LOH com câncer se deve à presença de um gene supressor de tumor na região deletada, porém, outras seqüências podem ser perdidas também, como por exemplo, RNAs não codificantes (que incluem microRNAs, siRNAs e outras espécies de RNA) que possuem funções apesar de não serem traduzidos, agindo principalmente na regulação da expressão de outros genes ou da estrutura de cromatina, do processamento de mRNA e *splicing*, da estabilidade de mRNA, entre outras funções (Costa, 2005; Hall & Russell, 2005; Hammond, 2006).

A presença de LOH no 22q continua sendo relacionada com a progressão de gliomas e foi encontrada, num estudo recente, com maior freqüência em tumores astrocíticos (37%) do que em tumores oligodendrogliais ou mistos (21%) (Laigle-Donadey et al., 2006). Outro estudo revelou que LOH no 22q foi

encontrado em um ou mais *locus* em 33% de astrocitomas grau II, em 40% de astrocitomas anaplásicos, em 41% de GBM primários e 82% de GBM secundários, e o envolvimento do gene TIMP-3 hipermetilado em GBMs secundários, localizado na região 22q12.3 (Hartmann, 2004; Nakamura et al., 2005). Este trabalho não descarta a possibilidade da existência de outros genes supressores de tumores nos *locus* 22q12.3-13.3 e 22q13.31. Um outro estudo mais recente identificou três genes envolvidos em outra região diferente do nosso estudo contendo LOH no cromossomo 22 (Hartmann, 2004; Nakamura et al., 2005). Como resultado geral do nosso esforço para localizar um gene supressor no cromossomo 22 que estivesse correlacionado com a progressão tumoral de gliomas, uma grande parte de todos os genes analisados apresentou expressão elevada nas amostras clínicas de gliomas humanos, na etapa de validação experimental, resultado este, inverso do esperado. Este fato ocorreu em decorrência de alguns genes já apresentarem: funções relacionadas com gliomas humanos (no caso dos genes HMOX1, YWHAH, TIMP-3 e NF2). Esta foi uma forma de se validar as amostras clínicas de gliomas, confirmando a superexpressão destes genes nas amostras, quando comparadas às amostras de tecido não-tumoral. A superexpressão de outros genes pode ser explicada dependendo dos genes analisados, tais como: o gene TCF20, que está relacionado diretamente com tumorigenicidade em linhagens celulares de astrocitomas; o gene CELSR1 está envolvido em vias de sinalização de polaridade celular; o gene CERK está envolvido com inflamação; e os genes FLJ23588 e PIM3 possuem funções relacionadas com tumores de outros tecidos humano. Todos estes genes nunca haviam sido relacionados com a progressão tumoral de tumores cerebrais humanos, e são considerados como novos dados obtidos neste trabalho. Uma outra parte dos genes analisados não possuía funções conhecidas que relacionassem com a expressão maior em amostras clínicas de gliomas em relação às amostras normais (FLJ27365, PPARA, FLJ20699, GSTE1, PNPLA3, NUP50, RIBC2, DIP, SDF2L1, TOM1). Somente uma pequena parte dos genes analisados estava relacionada com papel de genes supressores de tumor e/ou oncogenes em outros tecidos (genes TOB2, PRR5, FBLN1 e PARVG), sendo que três deles apresentaram expressão elevada em amostras clínicas de gliomas e somente o gene parvg, juntamente com o gene sult4A1 (que não possui função

conhecida) apresentaram expressão menor nas amostras de gliomas, sendo considerados como possíveis genes supressores de tumor localizados na região freqüentemente deletada do cromossomo 22 em gliomas humanos. Nosso trabalho sugere o papel de gene supressor de tumor para três genes: KIAA1644, SULT4A1 e PARVG. A validação do papel de supressores de tumor destes genes pode ser realizada futuramente, avaliando-se se o efeito da superexpressão destes genes em linhagens tumorais atenuaria a fenótipo transformado ou se o silenciamento de cada um destes genes em linhagens consideradas normais provocaria alterações no controle de crescimento. Seria necessário também avaliar a contribuição de cada um destes genes (superexpresso ou silenciado) em relação à migração, invasão e angiogênese de gliomas em modelos experimentais de gliomagenese ortópica por estereotaxia nos locais onde o tumor originalmente se desenvolve. A criação de linhagens de camundongos transgênicos ou knock-out para os genes de estudo poderia permitir um melhor entendimento do papel de cada gene num contexto *in vivo*, além de permitir avaliar a resposta dos modelos experimentais *in vivo*, com perfis de expressão gênica diferentes, frente ao tratamento com drogas conhecidas e/ou experimentais ativas contra gliomas.

No trabalho de doutorado do aluno Christian Colin, os genes que apresentaram expressão maior em linhagens e amostras clínicas de tumores cerebrais humanas eram codificantes de fatores de crescimento e seus receptores, que apresentam expressão marcadamente maior na linhagem P7 e que, sabidamente, desempenham papel essencial no desenvolvimento dos gliomas. Os genes diferencialmente expressos encontrados neste trabalho (Colin, 2006) foram utilizados para identificação de genes relacionados com gliomas humano no cromossomo 22, como uma segunda estratégia. Foi possível concluir que tal estratégia não foi promissora para este objetivo específico de se identificar genes supressores de tumor na região 22q, uma vez que nenhum dos genes selecionados se localizava na região delimitada pelos marcadores D22S282 e D22S1169. Mas foi possível avaliar a expressão de outros genes, ainda não correlacionados com a progressão de gliomas humanos e confirmar a expressão aumentada de outros genes envolvidos no desenvolvimento e na progressão de gliomas.

É preciso levar em consideração que os genes foram selecionados de uma espécie diferente (gliomas de rato) e validados em amostras de linhagens e tecidos humanos, que podem apresentar diferenças inter-espécies bem distintas.

As diferentes correlações de expressão encontradas entre genes em linhagens celulares de tumores cerebrais humanos e em amostras clínicas de gliomas humano se devem a diferenças existentes nestas amostras: as amostras clínicas de glioma humano e de tecido cerebral não-tumoral reproduzem, de forma mais próxima possível os padrões de expressão gênica relacionados com desenvolvimento e/ou progressão de gliomas humanos *in vivo*, uma vez que foram utilizados RNAs extraídos diretamente de tumores congelados, retirados de cirurgias cerebrais; já as linhagens celulares de tumores cerebrais apresentam modificações introduzidas pela adaptação ao cultivo *in vitro* e o enriquecimento de determinados tipos celulares durante o prolongado período de cultura, podendo apresentar padrões de expressão gênica diferentes daqueles encontrados *in vivo*.

É importante ressaltar a utilização dos dados obtidos nesta parte do trabalho como ferramenta para diagnóstico de tumores cerebrais, uma vez que grande parte dos genes analisados apresentou expressão elevada em amostras clínicas de tumores cerebrais nos diversos graus de malignidade, sendo que outros genes apresentaram expressão significativamente maior e específica em determinados estadiamentos de gliomas. Futura análise funcional dos genes identificados poderá permitir a construção de novas drogas anti-tumorais e/ou desenho de estratégias de terapia gênica para gliomas.

6. CONCLUSÕES

a) Clonagem e análise funcional do gene NRP/B:

- O cDNA correspondente ao transcrito completo de NRP/B de rato foi clonado e seqüenciado com sucesso. A seqüência obtida foi depositada no banco de dados GenBank do NCBI (AY669396), tornando-se seqüência de referência (RefSeq) em 20 de abril de 2005 (NM_001003401).
- Os níveis do mRNA de NRP/B apresentam um aumento progressivo durante o tratamento das células ST1 com o hormônio glicocorticóide hidrocortisona. Quanto aos níveis protéicos, foi observado um discreto aumento durante o mesmo tratamento, resultado refletido em duas isoformas distintas de NRP/B.
- NRP/B aparentemente apresenta expressão específica em tecido cerebral de rato.
- A porção codificante completa de NRP/B de rato foi amplificada e clonada em vetores de expressão em células de mamífero pDEST12.2 e pLPCX.
- O método de transferência gênica por vetores retrovirais se mostrou mais eficiente nas células ST1, comparando-se com o método de transdução através de construções plasmideais. Foi possível obter populações de células infectadas com retrovírus recombinante que superexpressam NRP/B para a realização de ensaios funcionais.
- A análise funcional das células ST1-NRP/B mostrou que há uma leve tendência de aumento no tempo de dobramento destas células em ensaios de curva de crescimento em substrato sólido. Estas células também demonstraram menor capacidade de crescimento em meio semi-sólido e menor potencial tumorigênico em ensaios de tumorigenicidade *in vivo*.
- Foi possível silenciar o NRP/B em células ST1 com a tecnologia de RNA de interferência em sistema lentiviral, porém ainda não foi possível avaliar os efeitos do silenciamento deste gene na proliferação das células ST1.

- Experimentos preliminares mostram o envolvimento do gene NRP/B no processo de progressão do ciclo celular.
- A expressão de NRP/B foi avaliada em linhagens humanas de cérebro, útero, próstata, pulmão e mama, indicando uma maior expressão em tecidos cerebrais (conforme relatado na literatura) e mamários (visto pela primeira vez no presente trabalho).
- A expressão de NRP/B é significativamente maior em amostras clínicas de tumores humanos com graus de malignidade maiores, sendo significativamente menor em amostras clínicas de astrocitoma pilocítico (grau I), quando comparadas com a expressão em amostras não-tumorais, indicando que este gene pode ser um bom marcador para diagnóstico e/ou identificação do estadiamento de gliomas humanos.

b) Identificação de genes no *locus* 22q13 associados ao câncer cerebral humano:

- Utilizando-se informações do Banco de Dados do Transcriptoma e análises in silico, foi possível identificar 3 genes (KIAA1644, SULT4A1 e PARVG), localizados no *locus* 22q13, frequentemente deletado em gliomas humanos, que podem estar relacionados com a progressão de gliomas humanos.
- Considerando-se a constante atualização de seqüências depositadas diariamente nos Bancos de Dados do genoma humano, não foi possível avaliar a expressão de todos os genes e ESTs presentes na região 22q13.
- A outra estratégia adotada, utilizando-se os dados de genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7, não resultou na identificação de genes supressores de tumor na região estudada, porém possibilitou a confirmação da expressão de outros genes, sabidamente envolvidos na progressão de gliomas humanos.
- A análise de expressão de vários genes em linhagens e amostras clínicas de gliomas humano mostrou a existência de correlações entre eles ao nível transcricional.

- Uma futura análise funcional dos genes identificados nesta parte do trabalho permitirá o desenho de novas estratégias de terapia gênica e/ou a utilização destes como marcadores para prognóstico de determinados estadiamentos clínicos de gliomas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Addeo, R., Casale, F., Caraglia, M., D'Angelo, V., Crisci, S., Abbruzzese, A., Di Tullio, M.T. & Indolfi, P. (2004). Glucocorticoids induce G1 arrest of lymphoblastic cells through retinoblastoma protein Rb1 dephosphorylation in childhood acute lymphoblastic leukemia in vivo. *Cancer Biol Ther*, **3**, 470-6.
- Ahonen, M., Baker, A.H. & Kahari, V.M. (1998). Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res*, **58**, 2310-5.
- Aitken, A. (1995). 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem Sci*, **20**, 95-7.
- Akagi, K., Kurahashi, H., Arita, N., Hayakawa, T., Monden, M., Mori, T., Takai, S. & Nishisho, I. (1995). Deletion mapping of the long arm of chromosome 22 in human meningiomas. *Int J Cancer*, **60**, 178-82.
- Akbasak, A. & Sunar-Akbasak, B. (1992). Oncogenes: cause or consequence in the development of glial tumors. *J Neurol Sci*, **111**, 119-33.
- Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R. & Dopazo, J. (2004). FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*, **20**, 578-80.
- Al-Shahrour, F., Minguez, P., Vaquerizas, J.M., Conde, L. & Dopazo, J. (2005). BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res*, **33**, W460-4.
- Albagli, O., Dhordain, P., Deweindt, C., Lecocq, G. & Leprince, D. (1995). The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ*, **6**, 1193-8.
- Allione, F., Eisinger, F., Parc, P., Noguchi, T., Sobol, H. & Birnbaum, D. (1998). Loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 22Q in human sporadic breast carcinomas. *Int J Cancer*, **75**, 181-6.
- Alonso, M.E., Bello, M.J., de Campos, J.M., Isla, A., Vaquero, J., Gutierrez, M., Sarasa, J.L. & Rey, J.A. (2005). No evidence of INI1hSNF5 (SMARCB1) and PARVG point mutations in oligodendroglial neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet*, **160**, 169-73.
- Altucci, L. & Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**, 181-93.
- Amado, R.G. & Chen, Y.S. (1999). Lentiviral Vectors - the promise of gene therapy within reach? *Science*, **285**, 674-676.
- Anand-Apte, B., Bao, L., Smith, R., Iwata, K., Olsen, B.R., Zetter, B. & Apte, S.S. (1996). A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol*, **74**, 853-62.
- Apte, S.S., Mattei, M.G. & Olsen, B.R. (1994). Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22. *Genomics*, **19**, 86-90.
- Argraves, W.S., Greene, L.M., Cooley, M.A. & Gallagher, W.M. (2003). Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep*, **4**, 1127-31.
- Armelin, M.C. & Armelin, H.A. (1983). Glucocorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth control of rat glioma cells. *J Cell Biol*, **97**, 459-65.
- Armelin, M.C., Oliveira, M.L., Mercado, J.M., Sasahara, R.M., Valentini, S.R. & Carvalho, L.H. (1996). Molecular genetic approach to cell proliferation control and neoplasia. *Braz J Med Biol Res*, **29**, 911-9.
- Armelin, M.C., Stocco, R.C. & Armelin, H.A. (1983). Control of rat C6 glioma cell proliferation: uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in suspension and monolayer cultures. *J Cell Biol*, **97**, 455-8.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M. & Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, **25**, 25-9.
- Asubel F, B.R., Kingston RM, Moore DD, Seidmarn JG, Smith JA, Struhl K. (1998). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Auersperg, N. (1964). Long-Term Cultivation of Hypodiploid Human Tumor Cells. *J Natl Cancer Inst*, **32**, 135-63.

- Balmain, A., Gray, J. & Ponder, B. (2003). The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet*, **33 Suppl**, 238-44.
- Barth, R.F. (1998). Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol*, **36**, 91-102.
- Baulande, S., Lasnier, F., Lucas, M. & Pairault, J. (2001). Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem*, **276**, 33336-44.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F. & Delattre, J.Y. (2003). Primary brain tumours in adults. *Lancet*, **361**, 323-31.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. & Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, **161**, 370-1.
- Berezney, R. & Coffey, D.S. (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, **60**, 1410-7.
- Birch, B.D., Johnson, J.P., Parsa, A., Desai, R.D., Yoon, J.T., Lycette, C.A., Li, Y.M. & Bruse, J.N. (1996). Frequent type 2 neurofibromatosis gene transcript mutations in sporadic intramedullary spinal cord ependymomas. *Neurosurgery*, **39**, 135-140.
- Birgersdotter, A., Sandberg, R. & Ernberg, I. (2005). Gene Expression perturbation in vitro - A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in Cancer Biology*, **15**, 405-412.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. & Engler, J.A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, **4**, 197-250.
- Blatch, G.L. & Lassle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays*, **21**, 932-9.
- Blavier, L., Henriot, P., Imren, S. & Declerck, Y.A. (1999). Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. *Ann N Y Acad Sci*, **878**, 108-19.
- Bloom, D.W., Fawcett, J. (1994). *A Textbook of Hystology*. Ed. Chapman & Hall: New York.
- Bohmer, R.M., Scharf, E. & Assoian, R.K. (1996). Cytoskeletal integrity is required through the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependet expression of cyclin D1. *Mol Biol Cell*, **7**, 101-111.
- Bomont, P., Cavalier, L., Blondeau, F., Ben Hamida, C., Belal, S., Tazir, M., Demir, E., Topaloglu, H., Korinthenberg, R. & Tuysuz, B. (2000). The gene encoding gigaxonin, a new member og the cyroskeletal BTB/kelch repeat family, is mutated in giant axonal neuropathy. *Nat Genet*, **26**, 370-374.
- Bork, P. & Doolittle, R. (1994). Dorsophila kelch motif is derived from a common enzyme fold. *J Mol Biol*, **236**, 1277-1282.
- Bouterfa, H., Picht, T., Kess, D., Herbold, C., Noll, E., Black, P.M., Roosen, K. & Tonn, J.C. (2000). Retinoids inhibit human glioma cell proliferation and migration in primary cell cultures but not in established cell lines. *Neurosurgery*, **46**, 419-30.
- Brennan, M.D. & Condra, J. (2005). Transmission disequilibrium suggests a role for the sulfotransferase-4A1 gene in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **139**, 69-72.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H. & Marky, L.A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3746-50.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. (2002). A System for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Bryan, E.J., Thomas, N.A., Palmer, K., Dawson, E., Englefield, P. & Campbell, I.G. (2000). Refinement of an ovarian cancer tumour suppressor gene locus on chromosome arm 22q and mutation analysis of CYP2D6, SREBP2 and NAGA. *Int J Cancer*, **87**, 798-802.
- Cailleau, R., Olive, M. & Cruciger, Q.V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, **14**, 911-5.
- Camargo, A.A., de Souza, S.J., Brentani, R.R. & Simpson, A.J. (2002). Human gene discovery through experimental definition of transcribed regions of the human genome. *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 13-6.
- Camargo, A.A., Samaia, H.P., Dias-Neto, E., Simao, D.F., Migotto, I.A., Briones, M.R., Costa, F.F., Nagai, M.A., Verjovski-Almeida, S., Zago, M.A., Andrade, L.E., Carrer, H., El-Dorry, H.F., Espreafico, E.M., Habr-Gama, A., Giannella-Neto, D., Goldman, G.H., Gruber, A., Hackel, C., Kimura, E.T., Maciel, R.M., Marie, S.K., Martins, E.A., Nobrega, M.P., Paco-Larson, M.L., Pardini, M.I., Pereira, G.G., Pesquero, J.B., Rodrigues, V., Rogatto, S.R., da Silva, I.D., Sogayar, M.C., Sonati, M.F., Tajara, E.H., Valentini, S.R.,

- Alberto, F.L., Amaral, M.E., Aneas, I., Arnaldi, L.A., de Assis, A.M., Bengtson, M.H., Bergamo, N.A., Bombonato, V., de Camargo, M.E., Canevari, R.A., Carraro, D.M., Cerutti, J.M., Correa, M.L., Correa, R.F., Costa, M.C., Curcio, C., Hokama, P.O., Ferreira, A.J., Furuzawa, G.K., Gushiken, T., Ho, P.L., Kimura, E., Krieger, J.E., Leite, L.C., Majumder, P., Marins, M., Marques, E.R., Melo, A.S., Melo, M., Mestriner, C.A., Miracca, E.C., Miranda, D.C., Nascimento, A.L., Nobrega, F.G., Ojopi, E.P., Pandolfi, J.R., Pessoa, L.G., Prevedel, A.C., Rahal, P., Rainho, C.A., Reis, E.M., Ribeiro, M.L., da Ros, N., de Sa, R.G., Sales, M.M., Sant'anna, S.C., dos Santos, M.L., da Silva, A.M., da Silva, N.P., Silva, W.A., Jr., da Silveira, R.A., Sousa, J.F., Stecconi, D., Tsukumo, F., Valente, V., Soares, F., Moreira, E.S., Nunes, D.N., Correa, R.G., Zalcborg, H., Carvalho, A.F., Reis, L.F., Brentani, R.R., Simpson, A.J. & de Souza, S.J. (2001). The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12103-8.
- Carmeliet, P. & Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 249-257.
- Castells, A., Gusella, J.F., Ramesh, V. & Rustgi, A.K. (2000). A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. *Cancer Res*, **60**, 2836-9.
- Castells, A., Ino, Y., Louis, D.N., Ramesh, V., Gusella, J.F. & Rustgi, A.K. (1999). Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology*, **117**, 831-7.
- Castellvi-Bel, S., Castells, A., Johnstone, C.N., Pinol, V., Pellise, M., Elizalde, J.I., Romo, N., Rustgi, A.K. & Pique, J.M. (2003). Evaluation of PARVG located on 22q13 as a candidate tumor suppressor gene for colorectal and breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, **144**, 80-2.
- Cavaliere, R., Lopes, M.B. & Schiff, D. (2005). Low-grade gliomas: an update on pathology and therapy. *Lancet Neurol*, **4**, 760-70.
- Cha, H.H., Cram, E.J., Wang, E.C., Huang, A.J., Kasler, H.G. & Firestone, G.L. (1998). Glucocorticoids stimulate p21 gene expression by targeting multiple transcriptional elements within a steroid responsive region of the p21waf1/cip1 promoter in rat hepatoma cells. *J Biol Chem*, **273**, 1998-2007.
- Chen, W., Zollman, S., Couderc, J.-L. & Laski, F.A. (1995). The BTB domain of *bric à brac* mediates dimerization *in vitro*. *Mol Cell Biol*, **15**, 3424-3429.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G. & Thompson, J.D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3497-500.
- Chernova, O.B., Hunyadi, A., Malaj, E., Pan, H., Crooks, C., Roe, B. & Cowell, J.K. (2001). A novel member of the WD-repeat gene family, WDR11, maps to the 10q26 region and is disrupted by a chromosome translocation in human glioblastoma cells. *Oncogene*, **20**, 5378-92.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294-9.
- Cifone, M.A. (1982). In vitro growth characteristics associated with benign and metastatic variants of tumor cells. *Cancer Metastasis Rev*, **1**, 335-347.
- Colin, C. (2006). Identificação de genes diferencialmente expressos em linhagens de glioma de rato e sua potencialidade como novos alvos terapêuticos para gliomas humanos. In *Departamento de Bioquímica*. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- Collins, J.E., Goward, M.E., Cole, C.G., Smink, L.J., Huckle, E.J., Knowles, S., Bye, J.M., Beare, D.M. & Dunham, I. (2003). Reevaluating human gene annotation: a second-generation analysis of chromosome 22. *Genome Res*, **13**, 27-36.
- Collins, J.E., Wright, C.L., Edwards, C.A., Davis, M.P., Grinham, J.A., Cole, C.G., Goward, M.E., Aguado, B., Mallya, M., Mokrab, Y., Huckle, E.J., Beare, D.M. & Dunham, I. (2004). A genome annotation-driven approach to cloning the human ORFeome. *Genome Biol*, **5**, R84.
- Collins, T., Stone, J.R. & Williams, A.J. (2001). All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol Cell Biol*, **21**, 3609-15.
- Collins, V.P. (1998). Gliomas. *Cancer Surv*, **32**, 37-51.
- Collins, V.P. (2004). Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **75 Suppl 2**, ii2-11.
- Costa, F.F. (2005). Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene*, **357**, 83-94.

- Crochemore, C., Michaelidis, T.M., Flisger, D., Loeffler, J.P. & Almeida, O.F. (2002). Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation. *FASEB J*, **16**, 761-770.
- Dai, C.Y., Furth, E.E., Mick, R., Koh, J., Takayama, T., Niitsu, Y. & Enders, G.H. (2000). p16(INK4a) expression begins early in human colon neoplasia and correlates inversely with markers of cell proliferation. *Gastroenterology*, **119**, 929-42.
- Dalal, S., Berry, A.M., Cullinane, C.J., Mangham, D.C., Grimer, R., Lewis, I.J., Johnston, C., Laurence, V. & Burchill, S.A. (2005). Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma family. *Clin Cancer Res*, **11**, 2364-2378.
- Das, M., Burge, C.B., Park, E., Colinas, J. & Pelletier, J. (2001). Assessment of the total number of human transcription units. *Genomics*, **77**, 71-8.
- de Ridder, L.I., Laerum, O.D., Mork, S.J. & Bigner, D.D. (1987). Invasiveness of human glioma cell lines in vitro: relation to tumorigenicity in athymic mice. *Acta Neuropathol (Berl)*, **72**, 207-13.
- de Souza, S.J., Camargo, A.A., Briones, M.R., Costa, F.F., Nagai, M.A., Verjovski-Almeida, S., Zago, M.A., Andrade, L.E., Carrer, H., El-Dorry, H.F., Espreafico, E.M., Habr-Gama, A., Giannella-Neto, D., Goldman, G.H., Gruber, A., Hackel, C., Kimura, E.T., Maciel, R.M., Marie, S.K., Martins, E.A., Nobrega, M.P., Paco-Larson, M.L., Pardini, M.I., Pereira, G.G., Pesquero, J.B., Rodrigues, V., Rogatto, S.R., da Silva, I.D., Sogayar, M.C., de Fatima Sonati, M., Tajara, E.H., Valentini, S.R., Acencio, M., Alberto, F.L., Amaral, M.E., Aneas, I., Bengtson, M.H., Carraro, D.M., Carvalho, A.F., Carvalho, L.H., Cerutti, J.M., Correa, M.L., Costa, M.C., Curcio, C., Gushiken, T., Ho, P.L., Kimura, E., Leite, L.C., Maia, G., Majumder, P., Marins, M., Matsukuma, A., Melo, A.S., Mestriner, C.A., Miracca, E.C., Miranda, D.C., Nascimento, A.N., Nobrega, F.G., Ojopi, E.P., Pandolfi, J.R., Pessoa, L.G., Rahal, P., Rainho, C.A., da Ros, N., de Sa, R.G., Sales, M.M., da Silva, N.P., Silva, T.C., da Silva, W., Jr., Simao, D.F., Sousa, J.F., Stecconi, D., Tsukumo, F., Valente, V., Zalcberg, H., Brentani, R.R., Reis, F.L., Dias-Neto, E. & Simpson, A.J. (2000). Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12690-3.
- De Vitis, L.R., Tedde, A., Vitelli, F., Ammannati, F., Mennona, P., Bono, P., Grammatico, B., Grammatico, P., Radice, P., Bigozzi, U., Montali, E. & Papi, L. (1996). Analysis of the neurofibromatosis type 2 gene in different human tumors of neuroectodermal origin. *Hum Genet*, **97**, 638-41.
- Defer, G.L., Adle-Biassette, H., Ricolfi, F., Martin, L., Authier, F.J., Chomienne, C., Degos, L. & Degos, J.D. (1997). All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas: clinical and radiological stabilization associated with the appearance of intratumoral calcifications. *J Neurooncol*, **34**, 169-77.
- Demasi, M.A.A. (2005). Caracterização funcional de genes diferencialmente regulados por glicocorticóides e análise do proteoma em linhagens de glioma sensível à hormônios anti-tumorais glicocorticóides. In *Departamento de Bioquímica - Instituto de Química*. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- Demasi, M.A.A., Montor, W.R., Ferreira, G.B., Pimenta, D.C., Labriola, L. & Sogayar, M.C. (2006). Differential proteomic analysis of the anti-proliferative effect of glucocorticoids hormones in ST1 rat glioma cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (submitted)*.
- Dias Neto, E., Garcia Correa, R., Verjovski-Almeida, S., Briones, M.R., Nagai, M.A., da Silva, W., Jr., Zago, M.A., Bordin, S., Costa, F.F., Goldman, G.H., Carvalho, A.F., Matsukuma, A., Baia, G.S., Simpson, D.H., Brunstein, A., de Oliveira, P.S., Bucher, P., Jongeneel, C.V., O'Hare, M.J., Soares, F., Brentani, R.R., Reis, L.F., de Souza, S.J. & Simpson, A.J. (2000). Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3491-6.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. & Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6025-30.
- Dirks, P.B., Patel, K., Hubbard, S.L., Ackerley, C., Hamel, P.A. & Rutka, J.T. (1997). Retinoic acid and the cyclin dependent kinase inhibitors synergistically alter proliferation and morphology of U343 astrocytoma cells. *Oncogene*, **15**, 2037-48.
- Dodds, D.C., Omeis, I.A., Cushman, S.J., Helms, J.A. & Perin, M.S. (1997). Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal

- pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49. *J Biol Chem*, **272**, 21488-94.
- Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B.A., Chissoe, S., Hunt, A.R., Collins, J.E., R., B., Beare, D.M., Clamp, M., Smink, L.J., Ainscough, R., Almeida, J.P., Babbage, A., Bagguley, C., Bridgeman, A.M., Buck, D., Burgess, J., Burtil, W.D. & O'Brien, K.P. (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*, **40**, 489-495
- Durfee, T., Mancini, M., Jones, D., Elledge, S. & Lee, W. (1994). The amino-terminal region of the retinoblastoma gene product binds a novel nuclear matrix protein that colocalizes to centers for RNA processing. *J Cell Biol*, **127**, 609-622.
- Engel, L.W., Young, N.A., Tralka, T.S., Lippman, M.E., O'Brien, S.J. & Joyce, M.J. (1978). Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res*, **38**, 3352-64.
- Evans, D.G., Sainio, M. & Baser, M.E. (2000). Neurofibromatosis type 2. *J Med Genet*, **37**, 897-904.
- Ewing, B. & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*, **8**, 186-94.
- Figueira, R.C.S. (2006). Expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e de seus inibidores (TIMPs e RECK) em modelo de progressão tumoral de câncer de mama e sua correlação com dados clínico-patológicos. In *Departamento de Bioquímica*. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-11.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, **1**, 27-31.
- Folkman, J. (2002). Looking for a good endothelial address. *Cancer Cell*, **1**, 113-115.
- Folkman, J. (2004). Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS*, **112**, 496-507.
- Freedman, V.H. & Shih, S. (1974). Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell*, **3**, 335-360.
- Freshney, R.I. (1984). Effects of glucocorticoids on glioma cells in culture. Minireview on cancer research. *Exp Cell Biol*, **52**, 286-92.
- Friedl, F., Kimura, I., Osato, T. & Ito, Y. (1970). Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proc Soc Exp Biol Med*, **135**, 543-5.
- Fujii, C., Nakamoto, Y., Lu, P., Tsuneyama, K., Popivanova, B.K., Kaneko, S. & Mukaida, N. (2005). Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *Int J Cancer*, **114**, 209-18.
- Fujisawa, H., Reis, R. & Nakamura, M. (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (*de novo*) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest*, **80**, 65-72.
- Fukuda, S., Sumii, M., Masuda, Y., Takahashi, M., Koike, N., Teishima, J., Yasumoto, H., Itamoto, T., Asahara, T., Dohi, K. & Kamiya, K. (2001). Murine and human SDF2L1 is an endoplasmic reticulum stress-inducible gene and encodes a new member of the Pmt/rp protein family. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 407-14.
- Furukawa, M., He, Y.J., Borchers, C. & Xiong, Y. (2003). Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol*, **5**, 1001-7.
- Galanis, E., Buckner, J.C., Dinapoli, R.P., Scheithauer, B.W., Jenkins, R.B., Wang, C.H., O'Fallon, J.R. & Farr, G., Jr. (1998). Clinical outcome of gliosarcoma compared with glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group results. *J Neurosurg*, **89**, 425-30.
- Gallagher, W.M., Currid, C.A. & Whelan, L.C. (2005). Fibulins and cancer: friend or foe? *Trends Mol Med*, **11**, 336-40.
- Gambarini, A.G., Funck, S.T. & Armelin, H.A. (1979). Glioma cell growth: effect of pituitary factor, hydrocortisone and serum. *Rev Bras Biol*, **39**, 671-6.
- Gazdar, A.F., Carney, D.N., Russell, E.K., Sims, H.L., Baylin, S.B., Bunn, P.A., Jr., Guccion, J.G. & Minna, J.D. (1980). Establishment of continuous, clonable cultures of small-cell carcinoma of lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Res*, **40**, 3502-7.

- Geisert, E.G., Johnson, H.G. & Binder, L.I. (1990). Expression of microtubule-associated protein 2 by reactive astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 3967-3971.
- Gey, G.O., Coffman, W.D. & Kubicek, M.T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, **12**, 264-265.
- Geyer, R., Wee, S., Anderson, S., Yates, J. & Wolf, D.A. (2003). BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol Cell*, **12**, 783-90.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. & Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1417-23.
- Gill, T.J., 3rd, Smith, G.J., Wissler, R.W. & Kunz, H.W. (1989). The rat as an experimental animal. *Science*, **245**, 269-76.
- Gimenez y Ribotta, M., Menet, V. & Privat, A. (2001). The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog Brain Res*, **132**, 587-610.
- Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res*, **8**, 195-202.
- Görg, A., Postel, W. & Günther, S. (1988). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **9**, 531-546.
- Görg, A., Weiss, W. & Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, **4**, 3665-3685.
- Greene, L.M., Twal, W.O., Duffy, M.J., McDermott, E.W., Hill, A.D., O'Higgins, N.J., McCann, A.H., Dervan, P.A., Argraves, W.S. & Gallagher, W.M. (2003). Elevated expression and altered processing of fibulin-1 protein in human breast cancer. *Br J Cancer*, **88**, 871-8.
- Gurskaya, N.G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P.D., Khaspekov, G.L., Lukyanov, K.A., Vagner, L.L., Ermolaeva, O.D., Lukyanov, S.A. & Sverdlov, E.D. (1996). Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem*, **240**, 90-7.
- Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M. & Weissenbach, J. (1994). The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet*, **7**, 246-339.
- Hackett, A.J., Smith, H.S., Springer, E.L., Owens, R.B., Nelson-Rees, W.A., Riggs, J.L. & Gardner, M.B. (1977). Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *J Natl Cancer Inst*, **58**, 1795-806.
- Hall, P.A. & Russell, S.H. (2005). New perspectives on neoplasia and the RNA world. *Hematol Oncol*, **23**, 49-53.
- Hammond, S.M. (2006). MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev*, **16**, 4-9.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature*, **418**, 244-51.
- Hannon, G.J. & Rossi, J.J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, **431**, 371-8.
- Hara, E., Takahashi, K., Tominaga, T., Kumabe, T., Kayama, T., Suzuki, H., Fujita, H., Yoshimoto, T., Shirato, K. & Shibahara, S. (1996). Expression of heme oxygenase and inducible nitric oxide synthase mRNA in human brain tumors. *Biochem Biophys Res Commun*, **224**, 153-458.
- Harada, K., Nishizaki, T., Maekawa, K., Kubota, H., Suzuki, M., Ohno, T., Sasaki, K. & Soeda, E. (2000). A sequence-ready BAC clone contig of human chromosome 10p15 spanning the loss of heterozygosity region in glioma. *Genomics*, **67**, 268-72.
- Hartmann, C., Nümann, A., Mueller, W., Holtkamp, N., Simon, M., von Deimling, A. (2004). Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytomas. *Int J Cancer*, **108**, 839-844.
- Henson, J.W., Schnitker, B.L., Correa, K.M., von Deimling, A., Fassbender, F., Xu, H.J., Benedict, W.F., Yandell, D.W. & Louis, D.N. (1994). The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol*, **36**, 714-21.
- Hermanson, M., Funa, K., Hartman, M., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H., Westermark, B. & Nister, M. (1992). Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res*, **52**, 3213-3219.
- Hernandez, M.C., Andres-Barquim, P. J., Holt, I., Israel, M. A. (1998). Cloning of human ENC-1 and evaluation of its expression and regulation in nervous system tumors. *Exp Cell Res*, **242**, 470-477.

- Hernandez, M.C., Andres-Barquin, P.J., Martinez, S., Bulfone, A., Rubenstein, J.L. & Israel, M.A. (1997). ENC-1: a novel mammalian kelch-related gene specifically expressed in the nervous system encodes an actin-binding protein. *J Neurosci*, **17**, 3038-51.
- Hesselager, G. & Holland, E.C. (2003). Using mice to decipher the molecular genetics of brain tumors. *Neurosurgery*, **53**, 685-94; discussion 695.
- Hitotsumatsu, T., Iwaki, T., Kitamoto, T., Mizoguchi, M., Suzuki, S.O., Hamada, Y., Fukui, M. & Tateishi, J. (1997). Expression of neurofibromatosis 2 protein in human brain tumors: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)*, **93**, 225-32.
- Hoang-Xuan, K., Merel, P., Vega, F., Hugot, J.P., Cornu, P., Delattre, J.Y., Poisson, M., Thomas, G. & Delattre, O. (1995). Analysis of the NF2 tumor-suppressor gene and of chromosome 22 deletions in gliomas. *Int J Cancer*, **60**, 478-81.
- Holland, E.C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R.E. & Fuller, G.N. (2000). Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet*, **25**, 55-7.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Chu, T.M., Wajsman, Z.L., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, U., Chai, L.S., Kakati, S., Arya, S.K. & Sandberg, A.A. (1980). The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res*, **37**, 115-32.
- Huang, B., Starostik, P., Kuhl, J., Tonn, J.C. & Raggendorf, W. (2002). Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human ependymomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, **103**, 415-20.
- Huang, X. & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*, **9**, 868-77.
- Huang, Y.W., Balun, R. & Vitetta, E.S. (1997). Adhesion molecules as targets for cancer therapy. *Histol Histopathol*, **12**, 467-477.
- Ichimura, K., Bolin, M.B., Goike, H.M., Schmidt, E.E., Moshref, A. & Collins, V.P. (2000). Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res*, **60**, 417-24.
- Ichimura, K., Schmidt, E.E., Goike, H.M. & Collins, V.P. (1996). Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16^{INK4A}, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene*, **13**, 1065-1072.
- Iida, A., Kurose, K., Isobe, R., Akiyama, F., Sakamoto, G., Yoshimoto, M., Kasumi, F., Nakamura, Y. & Emi, M. (1998). Mapping of a new target region of allelic loss to a 2-cM interval at 22q13.1 in primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, **21**, 108-12.
- Ikematsu, N., Yoshida, Y., Kawamura-Tsuzuku, J., Ohsugi, M., Onda, M., Hirai, M., Fujimoto, J. & Yamamoto, T. (1999). Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, **18**, 7432-41.
- Ino, Y., Silver, J. S., Blazejewski, L., Nishikawa, R., Matsutani, M., von Deimling A., Louis D. N. (1999). Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade. *J Neuropathol Exp Neurol*, **58**, 881-5.
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. & Todaro, G.J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol*, **4**, 549-53.
- James, C.D., Carlom, E., Dumanski, J.P., Hansen, M., Nordenskjold, M., Collins, V.P. & Cavenee, W.K. (1988). Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *cancer Res*, **48**, 5546-5551.
- Jin, H. & Varner, J. (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British Journal of Cancer*, **90**, 561-565.
- Johnstone, C.N., Castellvi-Bel, S., Chang, L.M., Sung, R.K., Bowser, M.J., Pique, J.M., Castells, A. & Rustgi, A.K. (2005). PRR5 encodes a conserved proline-rich protein predominant in kidney: analysis of genomic organization, expression, and mutation status in breast and colorectal carcinomas. *Genomics*, **85**, 338-51.
- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F. & Jones, L.W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*, **17**, 16-23.
- Kast, B. (2001). The best supporting actors. *Nature*, **412**, 674-6.
- Katoh, M. (2005). WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep*, **14**, 1583-8.
- Kaup, B., Schindler, I., Knupfer, H., Schlenzka, A., Preiss, R. & Knupfer, M.M. (2001). Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *J Neurooncol*, **51**, 105-10.

- Kawamura-Tsuzuku, J., Suzuki, T., Yoshida, Y. & Yamamoto, T. (2004). Nuclear localization of Tob is important for regulation of its antiproliferative activity. *Oncogene*, **23**, 6630-8.
- Kedra, D., Pan, H.Q., Seroussi, E., Fransson, I., Guilbaud, C., Collins, J.E., Dunham, I., Blennow, E., Roe, B.A., Piehl, F. & Dumanski, J.P. (1998). Characterization of the human synaptogyrin gene family. *Hum Genet*, **103**, 131-41.
- Kesari, S., Ramakrishna, N., Sauvageot, C., Stiles, C.D. & Wen, P.Y. (2005). Targeted molecular therapy of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep*, **5**, 186-97.
- Kim, T.A., Jiang, S., Seng, S., Cha, K., Avraham, H.K. & Avraham, S. (2005). The BTB domain of the nuclear matrix protein NRP/B is required for neurite outgrowth. *J Cell Sci*, **118**, 5537-48.
- Kim, T.A., Lim, J., Ota, S., Raja, S., Rogers, R., Rivnay, B., Avraham, H. & Avraham, S. (1998). NRP/B, a novel nuclear matrix protein, associates with p110(RB) and is involved in neuronal differentiation. *J Cell Biol*, **141**, 553-66.
- Kim, T.A., Ota, S., Jiang, S., Pasztor, L.M., White, R.A. & Avraham, S. (2000). Genomic organization, chromosomal localization and regulation of expression of the neuronal nuclear matrix protein NRP/B in human brain tumors. *Gene*, **255**, 105-16.
- Kirstein, M., Sanz, L., Quinones, S., Moscat, J., Diaz-Meco, M.T. & Saus, J. (1996). Cross-talk between different enhancer elements during mitogenic induction of the human stromelysin-1 gene. *J Biol Chem*, **271**, 18231-6.
- Kleihues, P. & Sobin, L.H. (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer*, **88**, 2887.
- Knudson, A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-3.
- Koehler, P.J. (1995). Use of corticosteroids in neuro-oncology. *Anticancer Drugs*, **6**, 19-33.
- Korenbaum, E., Olski, T.M. & Noegel, A.A. (2001). Genomic organization and expression profile of the parvin family of focal adhesion proteins in mice and humans. *Gene*, **279**, 69-79.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2003). An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, **278**, 48520-3.
- Kraus, J.A., de Millas, W., Sorensen, N., Herbold, C., Schichor, C., Tonn, J.C., Wiestler, O.D., von Deimling, A. & Pietsch, T. (2001). Indications for a tumor suppressor gene at 22q11 involved in the pathogenesis of ependymal tumors and distinct from hSNF5/INI1. *Acta Neuropathol (Berl)*, **102**, 69-74.
- Kufe, D.W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Bast Jr, R. C., Gansler, T. S., Holland, J. F., Fre III, E. (2003). *Cancer Medicine*. BC Decker Inc: Hamilton (Canada).
- Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I. & Wegner, M. (1998). Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci*, **18**, 237-50.
- Laigle-Donadey, F., Criniere, E., Benouaich, A., Lesueur, E., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K. & Sanson, M. (2006). Loss of 22q chromosome is related to glioma progression and loss of 10q. *J Neurooncol*, **76**, 265-8.
- Lamour, N.F. & Chalfant, C.E. (2005). Ceramide-1-phosphate: the "missing" link in eicosanoid biosynthesis and inflammation. *Mol Interv*, **5**, 358-67.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczký, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissole, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.

- Leenstra, S., Oskam, N.T., Bijleveld, E.H., Bosch, D.A., Troost, D. & Hulsebos, T.J. (1998). Genetic sub-types of human malignant astrocytoma correlate with survival. *Int J Cancer*, **79**, 159-65.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H. & Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, **275**, 1943-7.
- Li, Y.Y., Popivanova, B.K., Nagai, Y., Ishikura, H., Fujii, C. & Mukaida, N. (2006). Pim-3, a proto-oncogene with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human pancreatic cancer and phosphorylates bad to block bad-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res*, **66**, 6741-7.
- Liang, F.F., Miller, D.C. & Koslow, M. (1994). Pathways to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg*, **81**, 427-436.
- Liang, P. & Pardee, A.B. (1992). Differential Display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Science*, **257**, 967-971.
- Liang, X.Q., Avraham, H.K., Jiang, S. & Avraham, S. (2004). Genetic alterations of the NRP/B gene are associated with human brain tumors. *Oncogene*, **23**, 5890-900.
- Liebermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R.L., I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1985). Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature*, **313**, 144-147.
- Lindsay, M.E., Plafker, K., Smith, A.E., Clurman, B.E. & Macara, I.G. (2002). Nup60/Nup50 is a tri-stable switch that stimulates importin- α : β -mediated nuclear protein import. *Cell*, **110**, 349-60.
- Liu, Y.M., Moldes, M., Bastard, J.P., Bruckert, E., Viguerie, N., Hainque, B., Basdevant, A., Langin, D., Pairault, J. & Clement, K. (2004). Adiponutrin: A new gene regulated by energy balance in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 2684-9.
- Liyou, N.E., Buller, K.M., Tresillian, M.J., Elvin, C.M., Scott, H.L., Dodd, P.R., Tannenbergl, A.E. & McManus, M.E. (2003). Localization of a brain sulfotransferase, SULT4A1, in the human and rat brain: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem*, **51**, 1655-64.
- Loidl, P. & Eberharter, A. (1995). Nuclear matrix and the cell cycle. *Int Rev Cytol*, **162B**, 377-403.
- Lokker, N.A., Sullivan, C.M., Hollenbach, S.J., Israel, M.A. & Giese, N.A. (2002). Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res*, **62**, 3729-35.
- Louis, D.N. & Gusella, J.F. (1995). A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet*, **11**, 412-5.
- Louis, D.N., Holland, E.C. & Cairncross, J.G. (2001). Glioma Classification - A molecular Reappraisal. *Am J Pathology*, **159**, 779-786.
- MacPherson, I. & Montagnier, L. (1964). Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology*, **23**, 291-294.
- Maher, E.A., Furnari, F.B., Bachoo, R.M., Rowitch, D.H., Louis, D.N., Cavenee, W.K. & DePinho, R.A. (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev*, **15**, 1311-33.
- Mancini, M.A., He, D., Ouspenski, I. & Brinkley, B.R. (1996). Dynamic continuity of nuclear and mitotic matrix proteins in the cell cycle. *J Cell Biochem*, **62**, 158-64.
- Marz, P., Probst, A., Lang, S., Schwager, M., Rose-John, S., Otten, U. & Ozbek, S. (2004). Ataxin-10, the spinocerebellar ataxia type 10 neurodegenerative disorder protein, is essential for survival of cerebellar neurons. *J Biol Chem*, **279**, 35542-50.
- Marz, P., Stetefeld, J., Bendfeldt, K., Nitsch, C., Reinstein, J., Shoeman, R.L., Dimitriades-Schmutz, B., Schwager, M., Leiser, D., Ozcan, S., Otten, U. & Ozbek, S. (2006). Ataxin-10 Interacts with O-Linked beta-N-Acetylglucosamine Transferase in the Brain. *J Biol Chem*, **281**, 20263-70.
- McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J. & Kay, M.A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature*, **418**, 38-9.
- Mercapide, J., Lopez De Cicco, R., Castresana, J.S. & Klein-Szanto, A.J. (2003). Stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression accounts for invasive properties of human astrocytoma cell lines. *Int J Cancer*, **106**, 676-82.

- Meredith Jr, J.E., Fazeli, B. & Schwartz, M.A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*, **4**, 953-961.
- Mischel, P.S. & Cloughesy, T.F. (2003). Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol*, **13**, 52-61.
- Miyakawa, A., Wang, X.L., Nakanishi, H., Imai, F.L., Shiiba, M., Miya, T., Imai, Y. & Tanzawa, H. (1998). Allelic loss on chromosome 22 in oral cancer: possibility of the existence of a tumor suppressor gene on 22q13. *Int J Oncol*, **13**, 705-9.
- Mollenhauer, J., Wiemann, S., Scheurlen, W., Korn, B., Hayashi, Y., Wilgenbus, K.K., von Deimling, A. & Poustka, A. (1997). DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet*, **17**, 32-9.
- Monte, M., Benetti, R., Buscemi, G., Sandy, P., Del Sal, G. & Schneider, C. (2003). The cell cycle-regulated protein human GTSE-1 controls DNA damage-induced apoptosis by affecting p53 function. *J Biol Chem*, **278**, 30356-64.
- Monte, M., Collavin, L., Lazarevic, D., Utrera, R., Dragani, T.A. & Schneider, C. (2000). Cloning, chromosome mapping and functional characterization of a human homologue of murine gtse-1 (B99) gene. *Gene*, **254**, 229-36.
- Muhammad, A.K.M.G., Yoshimine, T., Maruno, M., Tokiyoshi, K., Takemoto, O. & Hayakawa, T. (1997). Chromosome 22q allelic losses at microsatellite loci in human astrocytic tumors. *Neurol Med Chir*, **37**, 606-611.
- Muraoka, V. & Shibahara, S. (1993). Identification of a cis-regulatory element and putative trans-acting factors responsible for 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-mediated induction of heme oxygenase expression in myelomonocytic cell lines. *Mol Cell Biol*, **13**, 7881-7891.
- Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P. & Tonks, N.K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13513-8.
- Nahaczewski, A.E., Fowler, S.B. & Hariharan, S. (2004). Dexamethasone therapy in patients with brain tumors--a focus on tapering. *J Neurosci Nurs*, **36**, 340-3.
- Naka, T., Kobayashi, M., Ashida, K., Toyota, N., Kaneko, T. & Kaibara, N. (1998). Aberrant p16INK4 expression related to clinical stage and prognosis in patients with pancreatic cancer. *Int J Oncol*, **12**, 1111-6.
- Nakamura, M., Ishida, E., Shimada, K., Kishi, M., Nakase, H., Sakaki, T. & Konishi, N. (2005). Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest*, **85**, 165-175.
- Nakamura, M., Watanabe, T., Klangby, U., Asker, C., Wiman, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (2001a). p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol*, **11**, 159-68.
- Nakamura, M., Yang, F. & Fujisawa, H. (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 10 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, **59**, 539-543.
- Nakamura, M., Yonekawa, Y. & Kleihues, P. (2001b). Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest*, **81**, 77-82.
- Namkoong, H., Shin, S.M., Kim, H.K., Ha, S.A., Cho, G.W., Hur, S.Y., Kim, T.E. & Kim, J.W. (2006). The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. *BMC Cancer*, **6**, 74.
- Narizhneva, N.V., Razorenova, O.V., Podrez, E.A., Chen, J., Chandrasekharan, U.M., Dicorleto, P.E., Plow, E.F., Topol, E.J. & Byzova, T.V. (2005). Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *Faseb J*, **19**, 1158-1160.
- Nevins, J.R., Leone, G., DeGregori, J. & Jakoi, L. (1997). Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol*, **173**, 233-6.
- Ng, H., Lau, K., Tse, J.Y.M., Lo, K., Wong, J.H.C., Poon, W. & Huang, D.P. (1995). Combined molecular genetic studies of chromosome 22q and the neurofibromatosis type 2 gene in central nervous system tumors. *Neurosurgery*, **37**, 764-773.
- Nichols, W.W., Murphy, D.G., Cristofalo, V.J., Toji, L.H., Greene, A.E. & Dwight, S.A. (1977). Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science*, **196**, 60-3.
- Niki, T., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M. & Ariga, H. (2003). DJBP: a novel DJ-1-binding protein, negatively regulates the androgen receptor by recruiting histone deacetylase complex, and DJ-1 antagonizes this inhibition by abrogation of this complex. *Mol Cancer Res*, **1**, 247-61.

- Nishie, A., Ono, M., Shono, T., Fukushima, J., Otsubo, M., Onoue, H., Ito, Y., Inamura, T., Ikezaki, K., Fukui, M., Iwaki, T. & Kuwano, M. (1999). Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res*, **5**, 1107-13.
- Nishikawa, R., Ji, X.D., Harmon, R.C., Lazar, C.S., Gill, G.N., Cavenee, W.K. & Huang, H.J. (1994). A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7727-31.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S. & Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, **409**, 714-20.
- Norrander, J.M., deCathelineau, A.M., Brown, J.A., Porter, M.E. & Linck, R.W. (2000). The Rib43a protein is associated with forming the specialized protofilament ribbons of flagellar microtubules in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell*, **11**, 201-15.
- Ohgaki, H. (2005). Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*, **25**, 1-7.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M.G., Lutoff, U.M. & Kleihues, P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*, **64**, 6892-9.
- Oskam, N.T., Bijleveld, E.H. & Hulsebos, T.J. (2000). A region of common deletion in 22q13.3 in human glioma associated with astrocytoma progression. *Int J Cancer*, **85**, 336-9.
- Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., Wakamatsu, A., Hayashi, K., Sato, H., Nagai, K., Kimura, K., Makita, H., Sekine, M., Obayashi, M., Nishi, T., Shibahara, T., Tanaka, T., Ishii, S., Yamamoto, J., Saito, K., Kawai, Y., Isono, Y., Nakamura, Y., Nagahara, K., Murakami, K., Yasuda, T., Iwayanagi, T., Wagatsuma, M., Shiratori, A., Sudo, H., Hosoi, T., Kaku, Y., Kodaira, H., Kondo, H., Sugawara, M., Takahashi, M., Kanda, K., Yokoi, T., Furuya, T., Kikkawa, E., Omura, Y., Abe, K., Kamihara, K., Katsuta, N., Sato, K., Tanikawa, M., Yamazaki, M., Ninomiya, K., Ishibashi, T., Yamashita, H., Murakawa, K., Fujimori, K., Tanai, H., Kimata, M., Watanabe, M., Hiraoka, S., Chiba, Y., Ishida, S., Ono, Y., Takiguchi, S., Watanabe, S., Yosida, M., Hotuta, T., Kusano, J., Kanehori, K., Takahashi-Fujii, A., Hara, H., Tanase, T.O., Nomura, Y., Togiya, S., Komai, F., Hara, R., Takeuchi, K., Arita, M., Imose, N., Musashino, K., Yuuki, H., Oshima, A., Sasaki, N., Aotsuka, S., Yoshikawa, Y., Matsunawa, H., Ichihara, T., Shiohata, N., Sano, S., Moriya, S., Momiyama, H., Satoh, N., Takami, S., Terashima, Y., Suzuki, O., Nakagawa, S., Senoh, A., Mizoguchi, H., Goto, Y., Shimizu, F., Wakebe, H., Hishigaki, H., Watanabe, T., Sugiyama, A., et al. (2004). Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet*, **36**, 40-5.
- Ozaki, T., Saijo, M., Murakami, K., Enomoto, H., Taya, Y. & Saikiyama, S. (1994). Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene*, **9**, 2649-2653.
- Pagni, M., Iseli, C., Junier, T., Falquet, L., Jongeneel, V. & Bucher, P. (2001). trEST, trGEN and Hits: access to databases of predicted protein sequences. *Nucleic Acids Res*, **29**, 148-51.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, **94**, 153-6.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**, 74-108.
- Pattillo, R.A., Hussa, R.O., Story, M.T., Ruckert, A.C., Shalaby, M.R. & Mattingly, R.F. (1977). Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science*, **196**, 1456-8.
- Pettus, B.J., Bielawska, A., Spiegel, S., Roddy, P., Hannun, Y.A. & Chalfant, C.E. (2003). Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. *J Biol Chem*, **278**, 38206-13.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Pfriege, F.W. & Barres, B.A. (1995). What the fly's glia tell the fly's brain. *Cell*, **83**, 671-4.
- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S. & Yamamoto, K.R. (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature*, **348**, 166-8.

- Pintard, L., Willis, J.H., Willems, A., Johnson, J.L., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P.E., Tyers, M., Bowerman, B. & Peter, M. (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, **425**, 311-6.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, **389**, 300-5.
- Post, G.R. & Dawson, G. (1992). Characterization of a cell line derived from a human oligodendroglioma. *Mol Chem Neuropathol*, **16**, 303-17.
- Qi, J.H., Ebrahim, Q., Moore, N., Murphy, G., Claesson-Welsh, L., Bond, M., Baker, A. & Anand-Apte, B. (2003). A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med*, **9**, 407-15.
- Qing, J., Maher, V.M., Tran, H., Argraves, W.S., Dunstan, R.W. & McCormick, J.J. (1997). Suppression of anchorage-independent growth and matrigel invasion and delayed tumor formation by elevated expression of fibulin-1D in human fibrosarcoma-derived cell lines. *Oncogene*, **15**, 2159-68.
- Ramos, R.A., Meilandt, W.J., Wang, E.C. & Firestone, G.L. (1999). Dysfunctional glucocorticoid receptor with a single point mutation ablates the CCAAT/enhancer binding protein-dependent growth suppression response in a steroid-resistant rat hepatoma cell variant. *Faseb J*, **13**, 169-80.
- Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K., Meltzer, P.S. & Collins, V.P. (1994). Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS and MDM2. *Cancer Res*, **54**, 4299-4303.
- Reifenberger, J., Ring, G.U., Gies, U., Cobbers, L., Oberstrass, J., An, H.X., Niederacher, D., Wechsler, W. & Reifenberger, G. (1996). Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol*, **55**, 822-31.
- Rekdal, C., Sjøttem, E. & Johansen, T. (2000). The nuclear factor SPBP contains different functional domains and stimulates the activity of various transcriptional activators. *J Biol Chem*, **275**, 40288-300.
- Replogle-Schwab, R., Pienta, K.J. & Getzenberg, R.H. (1996). The utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **6**, 103-13.
- Rey, J.A., Bello, M.J., Jimenez-Lara, A.M., Vaquero, J., Kusak, M.E., De Campos, J.M., Sarasa, J.L. & Pestana, A. (1992). Loss of heterozygosity for distal markers on 22 q in human gliomas. *Int J Cancer*, **51**, 703-706.
- Ribatti, D., Vacca, A. & Dammacco, F. (1999). The role of the vascular phase in solid tumor growth: a historical review. *Neoplasia*, **1**, 293-302.
- Riley, D., Lee, E. & Lee, W. (1994). The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 1-29.
- Roger, P., Pujol, P., Lucas, A., Baldet, P. & Rochefort, H. (1998). Increased immunostaining of fibulin-1, an estrogen-regulated protein in the stroma of human ovarian epithelial tumors. *Am J Pathol*, **153**, 1579-88.
- Ross, D.T., Scherf, U., Eisen, M.B., Perou, C.M., Rees, C. & Spellman, P. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*, **24**, 337-235.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, **132**, 365-86.
- Rubio, M.P., Correa, K.M., Ramesh, V., MacCollin, M.M., Jacoby, L.B., von Deimling, A., Gusella, J.F. & Louis, D.N. (1994). Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas. *Cancer Res*, **54**, 45-47.
- Sambrook J, M.T., Fritsch EF. (1989). *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. Col Spring Harbor.
- Sasahara, R.M. (1995). Efeito anti-tumorigênico de hormônios glucocorticóides sobre células C6 de glima de rato: bases moleculares. In *Departamento de Bioquímica*. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- Sauer, G. & Deissler, H. (2003). Angiogenesis: prognostic and therapeutic implications in gynecologic and breast malignances. *Curr Opin Obstet Gynecol*, **15**, 45-49.
- Sawyers, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature*, **432**, 294-7.

- Schmidt, F., Groscurth, P., Dichgans, J. & Weller, M. (2000). Human malignant glioma cell lines are refractory to retinoic acid-mediated differentiation and sensitization to apoptosis. *Cell Physiol Biochem*, **10**, 159-68.
- See, S.J., Levin, V.A., Yung, W.K., Hess, K.R. & Groves, M.D. (2004). 13-cis-retinoic acid in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Neuro-oncol*, **6**, 253-8.
- Seet, L.F., Liu, N., Hanson, B.J. & Hong, W. (2004). Endofin recruits TOM1 to endosomes. *J Biol Chem*, **279**, 4670-9.
- Seng, T.J., Ichimura, K., Liu, L., Tingby, O., Pearson, D.M. & Collins, V.P. (2005a). Complex chromosome 22 rearrangements in astrocytic tumors identified using microsatellite and chromosome 22 tile path array analysis. *Genes Chromosomes Cancer*, **43**, 181-93.
- Sevenet, N., Lellouch-Tubiana, A., Schofield, D., Hoang-Xuan, K., Gessler, M., Birnbaum, D., Jeanpierre, C., Jouvett, A. & Delattre, O. (1999). Spectrum of hSNF5/INI1 somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet*, **8**, 2359-68.
- Sharp, P.A. (2001). RNA interference--2001. *Genes Dev*, **15**, 485-90.
- Sherr, C.J. & Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.
- Shin, S.I., Freedman, V.H., Risser, R. & Pollack, R. (1975). Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 4435-9.
- Smith, J.S., Tachibana, I., Passe, S.M., Huntley, B.K., Borell, T.J., Iturria, N., O'Fallon, J.R., Schaefer, P.L., Scheithauer, B.W., James, C.D., Buckner, J.C. & Jenkins, R.B. (2001). PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1246-56.
- Sogayar, M.C., Camargo, A.A., Bettoni, F., Carraro, D.M., Pires, L.C., Parmigiani, R.B., Ferreira, E.N., de Sa Moreira, E., do Rosario, D.d.O.L.M., Simpson, A.J., Cruz, L.O., Degaki, T.L., Festa, F., Massier, K.B., Sogayar, M.C., Filho, F.C., Camargo, L.P., Cunha, M.A., De Souza, S.J., Faria, M., Jr., Giuliatti, S., Kopp, L., de Oliveira, P.S., Paiva, P.B., Pereira, A.A., Pinheiro, D.G., Puga, R.D., JE, S.d.S., Albuquerque, D.M., Andrade, L.E., Baia, G.S., Briones, M.R., Cavaleiro-Luna, A.M., Cerutti, J.M., Costa, F.F., Costanzi-Strauss, E., Espreafico, E.M., Ferrasi, A.C., Ferro, E.S., Fortes, M.A., Furchi, J.R., Giannella-Neto, D., Goldman, G.H., Goldman, M.H., Gruber, A., Guimaraes, G.S., Hackel, C., Henrique-Silva, F., Kimura, E.T., Leoni, S.G., Macedo, C., Malnic, B., Manzini, B.C., Marie, S.K., Martinez-Rossi, N.M., Menossi, M., Miracca, E.C., Nagai, M.A., Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., Oba-Shinjo, S.M., Oliveira, M.K., Orabona, G.M., Otsuka, A.Y., Paco-Larson, M.L., Paixao, B.M., Pandolfi, J.R., Pardini, M.I., Passos Bueno, M.R., Passos, G.A., Pesquero, J.B., Pessoa, J.G., Rahal, P., Rainho, C.A., Reis, C.P., Ricca, T.I., Rodrigues, V., Rogatto, S.R., Romano, C.M., Romeiro, J.G., Rossi, A., Sa, R.G., Sales, M.M., Sant'Anna, S.C., Santarosa, P.L., Segato, F., Silva, W.A., Jr., Silva, I.D., Silva, N.P., Soares-Costa, A., Sonati, M.F., Strauss, B.E., Tajara, E.H., Valentini, S.R., Villanova, F.E., Ward, L.S. & Zanette, D.L. (2004). A transcript finishing initiative for closing gaps in the human transcriptome. *Genome Res*, **14**, 1413-23.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1409-16.
- Stanelle, J., Tu-Rapp, H. & Putzer, B.M. (2005). A novel mitochondrial protein DIP mediates E2F1-induced apoptosis independently of p53. *Cell Death Differ*, **12**, 347-57.
- Stayner, C. & Zhou, J. (2001). Polycystin channels and kidney disease. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 543-6.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.H. & Tavtigian, S.V. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, **15**, 356-62.
- Stein, G.H. (1979). T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J Cell Physiol*, **99**, 43-54.
- Sternlicht, M.D., Bissell, M.J. & Werb, Z. (2000). The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene*, **19**, 1102-13.

- Sternlicht, M.D., Lochter, A., Sympon, C.J., Huey, B., Rougier, J.P., Gray, J.W., Pinkel, D., Bissell, M.J. & Werb, Z. (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*, **98**, 137-46.
- Stogios, P.J. & Prive, G.G. (2004). The BACK domain in BTB-kelch proteins. *Trends Biochem Sci*, **29**, 634-7.
- Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H. & Paulson, D.F. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer*, **21**, 274-81.
- Strakova, N., Ehrmann, J., Bartos, J., Malikova, J., Dolezel, J. & Kolar, Z. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) agonists affect cell viability, apoptosis and expression of cell cycle related proteins in cell lines of glial brain tumors. *Neoplasma*, **52**, 126-36.
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B., Buetow, K.H., Schaefer, C.F., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Jordan, H., Moore, T., Max, S.I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A.A., Rubin, G.M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Usdin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S.S., Loquellano, N.A., Peters, G.J., Abramson, R.D., Mullahy, S.J., Bosak, S.A., McEwan, P.J., McKernan, K.J., Malek, J.A., Gunaratne, P.H., Richards, S., Worley, K.C., Hale, S., Garcia, A.M., Gay, L.J., Hulyk, S.W., Villalon, D.K., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Lu, X., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Kettman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madan, A., Young, A.C., Shevchenko, Y., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Touchman, J.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S., Krzywinski, M.I., Skalska, U., Smailus, D.E., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J. & Marra, M.A. (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16899-903.
- Strausberg, R.L., Simpson, A.J., Old, L.J. & Riggins, G.J. (2004). Oncogenomics and the development of new cancer therapies. *Nature*, **429**, 469-74.
- Stryer, L., Tymoczko, J.M. & Berg, J.M. (2004). *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company: New York.
- Stupack, D.G., Puente, X.S., Butsaboualoy, S., Storgard, C.M. & Cheresch, D.A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol*, **155**, 459-470.
- Sugiura, M., Kono, K., Liu, H., Shimizugawa, T., Minekura, H., Spiegel, S. & Kohama, T. (2002). Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J Biol Chem*, **277**, 23294-300.
- Tiscornia, G., Singer, O., Ikawa, M. & Verma, I.M. (2003). A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1844-8.
- Tohma, Y., Gratas, C. & Biernat, W. (1998). PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, **57**, 684-689.
- Tom Tang, Y., Emtage, P., Funk, W.D., Hu, T., Arterburn, M., Park, E.E. & Rupp, F. (2004). TAFA: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. *Genomics*, **83**, 727-34.
- Trofatter, J.A., MacCollin, M.M., Rutter, J.L., Murrell, J.R., Duyao, M.P., Parry, D.M., Eldridge, R., Kley, N., Menon, A.G., Pulaski, K. & et al. (1993). A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell*, **72**, 791-800.
- Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L. & Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *Embo J*, **11**, 433-9.
- Ueki, K., Ono, Y., Henson, J.W., Efird, J.T., von Deimling, A. & Louis, D.N. (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res*, **56**, 150-3.
- Urban, G., Golden, T., Aragon, I.V., Cowser, L., Cooper, S.R., Dean, N.M. & Honkanen, R.E. (2003). Identification of a functional link for the p53 tumor suppressor protein in dexamethasone-induced growth suppression. *J Biol Chem*, **278**, 9747-9753.

- Valentini, S.R. & Armelin, M.C. (1996). Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. *J Endocrinol*, **148**, 11-7.
- Varkey, J.P., Muhlrad, P.J., Minniti, A.N., Do, B. & Ward, S. (1995). The *Caenorhabditis elegans* spe-26 gene is necessary to form spermatids and encodes a protein similar to the actin-associated proteins kelch and scruin. *Genes Dev*, **9**, 1074-86.
- Vedoy, C.G. (2000). Isolamento e identificação e caracterização de seqüências expressas de DNA (ESTs) de genes regulados por glicocorticóides na reversão fenotípica tumoral-normal de células ST1 de glioma de rato. In *Bioquímica do Instituto de Química* pp. 102. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- Vedoy, C.G. & Sogayar, M.C. (2002). Isolation and characterization of genes associated with the anti-tumor activity of glucocorticoids. *Brain Res Mol Brain Res*, **106**, 57-69.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huseon, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-51.
- Versteeg, I., Sevenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M.F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A. & Delattre, O. (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*, **394**, 203-6.
- von Deimling, A., Fimmers, R., Schmidt, M.C., Bender, B., Fassbender, F., Nagel, J., Jahnke, R., Kaskel, P., Duerr, E.M., LKoopman, J., Maintz, D. & Sateinbeck, S. (2000). Comprehensive allelotyping and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, **59**, 544-558.
- von Deimling, A., von Ammon, K. & Schoenfeld, D. (1993). Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol*, **3**, 19-26.
- Wakui, H., Wright, A.P., Gustafsson, J. & Zilliacus, J. (1997). Interaction of the ligand-activated glucocorticoid receptor with the 14-3-3 eta protein. *J Biol Chem*, **272**, 8153-6.
- Waragai, M., Nagamitsu, S., Xu, W., Li, Y.J., Lin, X. & Ashizawa, T. (2006). Ataxin 10 induces neuritogenesis via interaction with G-protein beta2 subunit. *J Neurosci Res*, **83**, 1170-8.
- Watanabe, K., Tachibana, O. & Sata, K. (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*, **6**, 217-223.
- Watkins, D., Rutledge, M.H., Sarrazin, J., Rangaratnam, S., Poisson, M., Delattre, J.Y. & Rouleau, G.A. (1996). Loss of heterozygosity on chromosome 22 in human gliomas does not inactivate the neurofibromatosis type 2 gene. *Cancer Genet Cytogenet*, **92**, 73-8.
- Weber, M., Stockhammer, F., Schmitz, U. & von Deimling, A. (2001). Mutational analysis of INI1 in sporadic human brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*, **101**, 479-82.
- Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1409-20.
- Weinstein, B. & Solomon, F. (1990). Phenotypic consequences of tubulin overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*: differences between alpha-tubulin and beta-tubulin. *Mol Cell Biol*, **10**, 5295-304.
- Wessels, P.H., Twijnstra, A., Kessels, A.G., Krijne-Kubat, B., Theunissen, P.H., Ummelen, M.I., Ramaekers, F.C. & Hopman, A.H. (2002). Gain of chromosome 7, as detected by in situ hybridization, strongly correlates with shorter survival in astrocytoma grade 2. *Genes Chromosomes Cancer*, **33**, 279-84.

- Wild, A., Langer, P., Ramaswamy, A., Chaloupka, B. & Bartsch, D.K. (2001). A novel insulinoma tumor suppressor gene locus on chromosome 22q with potential prognostic implications. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 5782-7.
- Wismeth, C., Hau, P., Fabel, K., Baumgart, U., Hirschmann, B., Koch, H., Jauch, T., Grauer, O., Drechsel, L., Brawanski, A., Bogdahn, U. & Steinbrecher, A. (2004). Maintenance therapy with 13-cis retinoid acid in high-grade glioma at complete response after first-line multimodal therapy--a phase-II study. *J Neurooncol*, **68**, 79-86.
- Xu, J., Chavis, J.A., Racke, M.K. & Drew, P.D. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of astrocytes. *J Neuroimmunol*, **176**, 95-105.
- Xu, Q. & Lee, C. (2003). Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5635-43.
- Xue, F. & Cooley, L. (1993). Kelch encodes a component of intercellular bridges in Drosophila egg chambers. *Cell*, **72**, 681-693.
- Yamamoto, K.R. (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet*, **19**, 209-52.
- Yan, Q., Bykhovskaya, Y., Li, R., Mengesha, E., Shohat, M., Estivill, X., Fischel-Ghodsian, N. & Guan, M.X. (2006). Human TRMU encoding the mitochondrial 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate-methyltransferase is a putative nuclear modifier gene for the phenotypic expression of the deafness-associated 12S rRNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, **342**, 1130-6.
- Yana, I., Kurahashi, H., Nakamori, S., Kameyama, M., Nakamura, T., Takami, M., Mori, T., Takai, S. & Nishisho, I. (1995). Frequent loss of heterozygosity at telomeric loci on 22q in sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer*, **60**, 174-7.
- Yeyati, P.L., Sahaknovich, R., Boterashvili, S., Li, J., Ball, H.J., Waxman, S., Nason-Burchenal, K., Dmitrovsky, E., AZelent, A. & Licht, J.D. (1999). Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene*, **18**, 925-934.
- Yokota, N., Mainprize, T.G., Taylor, M.D., Kohata, T., Loreto, M., Ueda, S., Dura, W., Gtajkowska, W., Kuo, J.S. & Rutka, J.T. (2004). Identification of differentially expressed and development regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene*, **23**, 3444-3453.
- Zollman, S., Godt, D., Prive, G.G., Couderc, J.L. & Laski, F.A. (1994). The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10717-21.

Curriculum Vitae

Theri Leica Degaki

Nascida em São Paulo, capital, em 22 de abril de 1978.

Educação

Colégio "Joana D'Arc"
Ensino Fundamental e Médio
São Paulo – SP
1983 a 1995

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Graduação em Farmácia e Bioquímica (Modalidade Fármaco e Medicamentos)
São Paulo – SP
1996 a 2000

Ocupação

Aluna de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2001 até o presente. Bolsista da FAPESP.

Publicações

- Ferreira EN, Pires LC, Parmigiani RB, Bettoni F, Puga RD, Pinheiro DG, Andrade LE, Cruz LO, **Degaki TL**, Faria M Jr, Festa F, Giannella-Neto D, Giorgi RR, Goldman GH, Granja F, Gruber A, Hackel C, Henrique-Silva F, Malnic B, Manzini CV, Marie SK, Martinez-Rossi NM, Oba-Shinjo SM, Pardini MI, Rahal P, Rainho CA, Rogatto SR, Romano CM, Rodrigues V, Sales MM, Savoldi M, da Silva ID, da Silva NP, de Souza SJ, Tajara EH, Silva WA Jr, Simpson AJ, Sogayar MC, Camargo AA, Carraro DM. **Identification and complete sequencing of novel human transcripts through the use of mouse orthologs and testis cDNA sequences.** *Genet. Mol. Res*, v. 3(4), p. 493-511, 2004.
- Sogayar MC, Camargo AA, Bettoni F, Carraro DM, Pires LC, Parmigiani RB, Ferreira EN, de Sa Moreira E, do Rosario D de O Latorre M, Simpson AJ, Cruz LO, **Degaki TL**, Festa F, Massirer KB, Sogayar MC, Filho FC, Camargo LP, Cunha MA, De Souza SJ, Faria M Jr, Giuliatti S, Kopp L, de Oliveira PS, Paiva PB, Pereira AA, Pinheiro DG, Puga RD, S de Souza JE, Albuquerque DM, Andrade LE, Baia GS, Briones MR, Cavaleiro-Luna AM, Cerutti JM, Costa FF, Costanzi-Strauss E, Espreafico EM, Ferrasi AC, Ferro ES, Fortes MA, Furchi JR, Giannella-Neto D, Goldman GH, Goldman MH, Gruber A, Guimaraes GS, Hackel C, Henrique-Silva F, Kimura ET, Leoni SG, Macedo C, Malnic B, Manzini B CV, Marie SK, Martinez-Rossi NM, Menossi M, Miracca EC, Nagai MA, Nobrega FG, Nobrega MP, Oba-Shinjo

SM, Oliveira MK, Orabona GM, Otsuka AY, Paco-Larson ML, Paixao BM, Pandolfi JR, Pardini MI, Passos Bueno MR, Passos GA, Pesquero JB, Pessoa JG, Rahal P, Rainho CA, Reis CP, Ricca TI, Rodrigues V, Rogatto SR, Romano CM, Romeiro JG, Rossi A, Sa RG, Sales MM, Sant'Anna SC, Santarosa PL, Segato F, Silva WA Jr, Silva ID, Silva NP, Soares-Costa A, Sonati MF, Strauss BE, Tajara EH, Valentini SR, Villanova FE, Ward LS, Zanette DL; Ludwig-FAPESP Transcript Finishing Initiative. **A Transcript Finishing Initiative for closing gaps in the human transcriptome.** *Genome Research*, Cold Spring Harbor Laboratory, v. 14, p. 1413-1423, 2004.

- Lopes DHJ, Colin C, **Degaki TL**, Sousa ACV, Vieira MNN, Sebollela A, Martinez AMB, Bloch JrC, Ferreira ST, Sogayar MC . **Amyloidogenicity and cytotoxicity of recombinant mature human islet amyloid polypeptide (rhlAPP).** *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 41, p. 42803-42810, 2004.
- Lopes DHJ, Colin C, **Degaki TL**, Ferreira ST, Sogayar MC – **Método para clonagem, expressão recombinante e purificação do polipeptídeo amilóide de ilhotas pancreáticas humana.** *Relatório descritivo da patente de invenção.* (INPI Brazilian Patent Office – PI0400735-2), 2004.

Experiência em Projetos Biotecnológicos

- Participação na Rede Brasileira para Clonagem e Expressão de Fatores de Coagulação do Sangue, financiado pela FINEP pelo Grupo do Instituto de Química da USP, coordenado pela Prof^a Dra. Mari Cleide Sogayar. Período: 2001 a 2005.
- Participação no Projeto de Produção e Purificação de Amilina Recombinante em sistema de expressão bacteriana. Trabalho em colaboração com Dr^a. Dahabada Lopes e Prof. Dr. Sergio Ferreira da UFRJ que resultou em uma publicação em periódico e depósito de patente. Período: 2002 a 2004.
- Produção de antisoro (anticorpo policlonal) em coelhos contra uma proteína que codifica um transportador de trealose recombinante em sistema de expressão bacteriana, referente ao Projeto de Iniciação Científica. Período: 2000 a 2001.

Experiência Profissional

- Novartis Biociências S.A.
Cargo: Analista Júnior
Setor: Laboratório de Microbiologia - Controle de Qualidade.
Período: março de 2000 a março de 2001.
- Bolsista de Iniciação Científica pela FAPESP. (Processo 98/11635-50)

Projeto intitulado: Gene codificador de Transportador de Trealose em células pancreáticas

Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Cardillo Corrêa, junto ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Prof^a. Dr^a. Mari Cleide Sogayar no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP.

Período: fevereiro de 1999 a janeiro de 2000.

- Bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq (Auxílio integrado n° 522718/96.5)

Orientação: Prof^a. Dr^a. Mari Cleide Sogayar, em seu Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP.

Período: outubro de 1997 a janeiro de 1999.

Participação em Congressos e Reuniões Nacionais e Internacionais

- IV São Paulo Research Conference - Cancer today: from molecular biology to treatment

Local: São Paulo –SP

Período: 10 a 12 de novembro de 2005.

Pôster: **DEGAKI, T. L.** ; VEDOY, C. G. ; SOGAYAR, M. C. . Cloning and functional analysis of the NRP/B gene associated with the tumor to normal phenotypic reversion in rat ST1 glioma cell line.

- 51º Congresso Brasileiro de Genética

Local: Águas de Lindóia – SP

Período: 7 a 10 e setembro de 2005.

Pôster: **DEGAKI, T. L.** ; VEDOY, C. G. ; SOGAYAR, M. C. . Functional analysis of the NRP/B gene product associated with the tumor-normal phenotypic reversion induced by glucocorticoid treatment in rat ST1 glioma cell line.

- 95th Annual meeting - The American Association for Cancer Research AACR

Local: Orlando – Florida - EUA

Período: 27 a 31 de março de 2004.

Pôster: DEGAKI, T. L. ; VEDOY, C. G. ; SOGAYAR, M. C. . Functional analysis of a gene associated with the tumor to normal phenotypic reversion induced by glucocorticoid treatment of ST1 glioma cell.

- XXXII Reunião Anual SBBQ - Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBQ

Local: Caxambu – MG

Período: 17 a 20 de maio de 2003.

Pôster: DEGAKI, T. L. ; FESTA, F. ; CAMARGO, A. A. ; de SOUZA, S. J. ; SOGAYAR, M. C. . Hunting for, cloning and expression of cDNAs associated with brain human cancer and with the tumoral-normal phenotypic reversion.

- XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq
Local: Caxambu –MG
Período: 18 a 21 de maio de 2002.
Pôster: **DEGAKI, T. L.** ; CORRÊAGIANNELLA, M. L. C. ; STAMBUK, B. ; PANEK, A. D. ; de ARAUJO, P. S. ; SOGAYAR, M. C. . Threalose Transporter gene in pancreatic cells.

- XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq
Local: Caxambu – MG
Período: 19 a 22 de maio de 2001.
Pôster: **DEGAKI, T. L.** ; CORRÊA-GIANNELLA, M. L. C. ; STAMBUK, B. ; de ARAUJO, P. S. ; SOGAYAR, M. C. . Trehalose transporter gene in pancreatic cells.

- XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq
Local: Caxambu –MG
Período: 22 a 25 de maio de 1999.
Pôster: CORRÊA, M. L. C. ; AITA, C. A. M. ; OLIVEIRA, E. M. C. ; **DEGAKI, T. L.** ; ELIASCHEWITZ, F. G. ; NORONHA, I. L. ; MIRANDA, M. P. ; GENZINI, T. ; SOGAYAR, M. C. . Human Pancreatic Islets Isolation and Purification in Brazil.

- XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq
Local: Caxambu - MG
Período: 23 a 26 de maio de 1998.
Pôster: CORRÊA, M. L. C. ; AITA, C. A. M. ; OLIVEIRA, E. M. C. ; **DEGAKI, T. L.** ; ELIASCHEWITZ, F. G. ; NORONHA, I. L. ; MIRANDA, M. P. ; GENZINI, T. ; CARVALHO, A. Z. ; SOGAYAR, M. C. . Isolation and Purification of Human Pancreatic Islets.

**“Genoma funcional e análise *in silico* na
caracterização e no isolamento de genes
envolvidos em gliomas humanos”**

THERI LEICA DEGAKI

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

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. SUELY LOPES GOMES
IQ – USP

Prof. Dr. SANDRO JOSÉ DE SOUZA
Ludwig

Profa. Dra. SUELI MIEKO OBA SHINJO
FM – USP

Prof. Dr. LUIZ ROBERTO GIORGETTI DE BRITTO
ICB – USP

SÃO PAULO
20 DE SETEMBRO 2006