UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM
LINHAGENS DE GLIOMA DE RATO E SUA POTENCIALIDADE COMO
NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS PARA GLIOMAS HUMANOS**

Christian Colin

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 05/01/2006

Cinco de Janeiro de Dois Mil e Seis

“Identificação de genes diferencialmente expressos em linhagens de glioma de rato e sua potencialidade como novos alvos terapêuticos para gliomas humanos”

CHRISTIAN COLIN

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:

Prof. Dra. ~~MARY~~ CLEIDE SOGAYAR
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. SÉRGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ – USP

Prof. Dra. BETTINA MALNIC
IQ – USP

Prof. Dr. LUIS FERNANDO LIMA REIS
Instituto Ludwig

Prof. Dra. SARA TERESINHA OLALLA SAAD
FCM – UNICAMP

SÃO PAULO
06 DE FEVEREIRO 2006

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Colin, Christian
C696i Identificação de genes diferencialmente expressos em
linhagens de glioma de rato e sua potencialidade como novos
alvos terapêuticos para gliomas humanos / Christian Colin.
São Paulo, 2006.
187p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Sogayar, Mari Cleide

1. Expressão gênica 2. Regulação gênica 3. Receptores :
Biologia molecular 4. Genoma : Biologia molecular I. T. II.
Sogayar, Mari Cleide, orientador

- 574.88 CDD

**Esta Tese é dedicada aos meus pais,
e aos pacientes portadores de
tumores incuráveis.**

A Vitória da Vida

Pobre de ti se pensas ser vencido!
Tua derrota é caso decidido.
Queres vencer, mas como em ti não crês,
Tua descrença esmaga-te de vez.
Se imaginas perder, perdido estás!
Quem não confia em si, marcha para trás;
A força que te impele para frente
É a decisão firmada em tua mente.

Muita empresa esboroa-se sem fracasso
Inda antes do primeiro passo;
Muito covarde tem capitulado
Antes de haver a luta começado;
Pensa em grande, e os teus efeitos crescerão,
Pensa em pequeno, e irás direto ao chão.
Saber querer é o poder arquipotente
é a decisão firmada em tua mente.

Fraco é aquele que fraco se imagina
Olha ao alto o que ao alto se destina,
A confiança em si mesmo é a trajetória
Que leva aos altos cimos da Vitória.
Nem sempre o que mais corre a meta alcança,
Nem mais longe ou mais forte o disco lança.
Mas o que, certo em si, vai firme em frente,
Com a decisão firmada em sua mente.

(Anônimo)

Para ser grande, sê inteiro:
nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha,
Porque alta vive.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À Deus, não só pelas graças da Saúde e da Vida, mas também pelas múltiplas oportunidades de amadurecimento e crescimento como criatura humana, colocadas no meu caminho a todo instante, na forma de desafios e dificuldades, de aparentes fracassos e falsas desilusões mas que, mais adiante, me mostraram que “todos os males vêm para bem”. Por renovar as possibilidades de mudança em cada dia que se inicia, e pelas múltiplas concessões por graça, e não por merecimento. Pelo enorme privilégio que foi encontrar e aprender com as pessoas e situações que Ele colocou ao longo do meu caminho. E a todos os amigos, visíveis e invisíveis, que Ele me enviou no momento exato das minhas necessidades, para me indicar o caminho para contornar os problemas, para que eu não perdesse uma oportunidade eminente, para que eu aprendesse lições valiosas ou para que eu recobrasse, nos momentos difíceis, a energia necessária para seguir em frente.

À Mari, com muito carinho e gratidão, por ter me acolhido no seu laboratório de braços abertos, e por ter acreditado em mim incondicionalmente, desde o início. Por ter aceitado me orientar durante o programa de Doutorado, pela sua preocupação com o meu bem-estar pessoal e, simultaneamente, pela sua dedicação e comprometimento em proporcionar as melhores condições de trabalho possíveis, independentemente do esforço necessário para isto. Pelos exemplos de atitude, empenho, iniciativa, trabalho, esforço, perseverança e bom ânimo que você imprimiu em mim ao longo destes 7 anos. Pela sua disponibilidade irrestrita “24/7”, para tudo e para todos, para todas as últimas horas e todos os últimos minutos... Por compartilhar sua experiência profissional e pessoal ao longo destes anos todos, pelo muito que aprendi com você em assuntos tão variados, e pelas inúmeras oportunidades que me proporcionou, direta ou indiretamente, de melhorar enquanto pessoa, de crescer e me formar enquanto profissional, e de impulsionar grandemente o início da minha jornada pela Ciência.

A todos os atuais ou antigos técnicos do Marilab: Adriana, Carol Guzzi, Débora, Helena, Irenice, Katlin, Luana, Patrícia, Ricardo, Sandra, Socorro, Tatiana Corrêa e Zizi, por tornarem nosso trabalho bem mais fácil, pela solicitude, pelo apoio e auxílios constantes, e também pela amizade, pelo carinho, pelo companheirismo, e pelas boas risadas descontraídas.

A todos os colegas da iniciação científica, da pós-graduação e do pós-doutorado, com quem eu partilhei, pelo menos por uma época, o convívio diário, as dificuldades e as lutas do cotidiano do laboratório: Adriano, Ana Paula, André, Angelita, Antero, Ariadne, Áurea, Beth, Carlos, Carol, Cleber, Cristiane, Dahabada, Daniel, Denise Loli, Denise Cobiaishi, Diana, Fernanda Festa, Fernanda Ortis, Fernando, Gabriela, Gisella, Graça, Ilana, Ísis, Juan, Juliana, Karin, Leonardo, Leonor (Léo), Leticia Labriola, Letícia Terra, Laura, Lúcia Helena, Luciana Cruz, Luciana Gomes, Maki, Malú, Marcos, Marina, Mário, Matheo, Mauro, Miguel, Renata, Renato, Ricardo Vila, Rita, Roberto, Sheila, Silvy, Tatiana (Tata), Tatiana Corrêa, Tatiane, Theri, Vitor e Wagner. Obrigado pelo convívio, pelo auxílio de diferentes formas, pelo aprendizado e pela amizade!

Aos colegas dos laboratórios vizinhos (Professores Dorry, Carla Columbano, Pio Colepicolo, Hugo Armelin e Sérgio Verjovski), pela solicitude, pela boa-vontade e pela amizade constantes.

À Profa. Dra. Anna Carla Goldberg, pelo convívio, pelas discussões, pela cooperação e pela amizade.

A todos os funcionários do Instituto de Química pelo apoio, pela cordialidade e pela cooperação. Em especial, aos funcionários da portaria do IQ, pela solicitude, pela boa-vontade e pela amizade, 24 horas por dia...

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do IQ: Cibele, Emiliano, Milton e Marcelo, pela boa-vontade, cooperação e inúmeros “quebra-galhos” durante todo o período da pós-graduação e, em especial, à Profa. Aline, coordenadora da Comissão de Pós-Graduação do IQ, pela “floresta de galhos quebrados”, nos últimos suspiros do doutorado...

Às tantas pessoas que me ensinaram, orientaram e supervisionaram desde a iniciação, e em especial, à Luciana Nardinelli, à Malú e ao Mário, por terem desempenhado um papel tão importante na minha formação profissional (e pessoal), por partilharem também os pedaços não-acadêmicos da vida, pelo carinho e pela amizade que se mantêm até hoje.

Às minhas queridas alunas, Ariadne e Tatiane, com as quais eu muito mais aprendi do que ensinei e que, durante o período que compartilhamos, a vida da pós-graduação ficou bem menos pesada, mais produtiva e muito mais divertida... Meu mais sincero MUITO OBRIGADO à Ari, pelo imenso apoio e cooperação no começo do Doutorado, pela boa-vontade, pela amizade, pela confiança, pelo carinho e pelo excelente período que trabalhamos juntos... E à Tati, também, meus mais sinceros agradecimentos pela boa-vontade, pela amizade, pela tolerância, pela disposição em sempre ajudar, pela confiança, pela paciência, pelo carinho e por ter sido, tantas vezes, um ponto de apoio em momentos críticos deste final de DR... Onde quer que eu vá, não vou esquecer de vocês!

A todos os nossos colaboradores durante estes anos, em particular aos grupos dos Professores Dr. Daniel Giannella Neto e "Dra. Malú" (FM-USP), Dra. Verônica Coelho (FM-USP), Dr. Sérgio Ferreira (UFRJ), Dra. Anamaria Camargo (Instituto Ludwig), Dra. Sueli Marie (FM-USP), Dra. Silvy Engler (FCF-USP) e Dr. Emmanuel Dias Neto (HC-FMUSP), pelo "input", pelas experiências compartilhadas, pelo grande aprendizado que foi trabalhar com vocês todos, e por tudo que foi possível construirmos juntos. Ao meu amigo Emmanuel, pelas "happy hours", pela amizade, pelo apoio, pelas discussões excitantes, e por compartilhar, tanto do seu entusiasmo pela Ciência, quanto do seu extensivo conhecimento.

Em particular, gostaria de agradecer, também, à Profa. Dra. Sueli Marie e a Dra. Sueli Oba-Shinjo, assim como todo o seu grupo, em particular à Mazé, Paulo, Miyuki, Roseli e Dr. Flávio Miura, pelo grande auxílio com os primeiros experimentos de tumorigênese ortotópica e, por fim, por compartilhar conosco o conhecimento clínico e também por viabilizar o nosso acesso às amostras clínicas de glioma, sem as quais a relevância deste trabalho seria consideravelmente menor. À Sueli Oba, em particular, muito obrigado mais uma vez, pela amizade, pelo desprendimento e pela disposição em ajudar nos momentos finais do fim da Tese.

Agradecimento especial aos amigos contemporâneos no ingresso da pós-graduação: Ana Paula, Antero, Diana, Fê Festa, Fernando, Juan, Karin, Leonardo, Lú Cruz, Marcos, Rita, Sheila, Theri, e Wagner, pela colaboração, pelo apoio, pela convivência e pelo aprendizado que tivemos juntos.

Aos queridos amigos com os quais eu fui presenteado ao longo destes anos todos de convívio no LBCM, e cuja amizade permanecerá independente do tempo e da distância... Em especial, à Ana Paula, Antero, Dahabada, Diana, Fê Ortis, LuHe, Marcos, Rita, Sheila, Silvy e Tatiana Corrêa, e também aos novos amigos recém-chegados, Angelita, Carol e Vitor.

Às minhas caríssimas Ana Paula e Diana, com muito carinho, por estarem sempre presentes em todos os momentos, e por sempre se prontificarem a me ajudar antes que eu tivesse que pedir... Pelos excelentes momentos que passamos (e haveremos de passar) juntos, pelos seus ouvidos, seus ombros, suas mãos e corações... Pela ajuda fundamental, incondicional e pronta, que muito contribuiu para esta tese acabar!

Ao amigo Marcos, pelas discussões, pela amizade, desprendimento, cooperação, compartilhamento, paciência e solicitude, pelos conselhos sábios, pela sua gentileza de sempre e sua lealdade.

Ao meu querido Antero, pela companhia madrugadas afora e noites adentro, pelo apoio sempre presente, pelos conselhos, pela sua amizade sincera, por sua paciência, sua preocupação com o meu bem estar e sua lealdade... Você também está dentro dos meus "top 0,1% best friends"!

Ao Professor Dr. Charles Stiles (Chuck), do Dana-Farber Cancer Institute e Harvard Medical School (Boston, EUA), por ter, incondicionalmente, me aberto as portas do seu laboratório para o estágio de DR-Sanduiche e, desta forma, me proporcionando a chance de expandir os horizontes do aprendizado profissional e pessoal, num outro país e numa outra cultura. Pela hospitalidade com a qual eu fui recebido no seu laboratório, pelo privilégio que foi trabalhar no seu grupo, e pelas inúmeras contribuições para o desenvolvimento e aprimoramento deste trabalho de doutoramento e de outros projetos paralelos e, finalmente, pelo seu papel seminal no planejamento do meu futuro profissional, e pelo seu grande apoio e assistência nos processos que envolveram a "conquista" do aceite para o estágio de pós-doutoramento.

Aos queridos amigos do "Stiles Lab": Amy, Chandrava, Emily, Gizelda, Haesun, Heather, Hui, John, Kimberly, Line, Matthew, Michael, Naren, Patrícia e Robert, pelo calor com que eu fui recebido, pela hospitalidade, pela solicitude, pelas boas risadas e pela amizade. Muito Obrigado pelo período maravilhoso que eu passei por aí!

À Professora Dra. Patricia Dahia, atualmente no University of Texas Health Science Center at San Antonio (EUA), que me supervisionou durante o DR-Sanduiche no laboratório do Prof. Charles Stiles. Meus mais sinceros agradecimentos, com muito carinho, pela "warmth" com a qual me acolheu no laboratório desde a minha chegada, por ter compartilhado tanto do seu conhecimento e da sua experiência profissional, e pela sua disposição constante em orientar e ajudar no que se fizesse necessário, durante os primeiros passos dos múltiplos aspectos que envolveram (ou envolverão) mudar e trabalhar nos EUA. Por advogar em prol de tudo quanto era importante para mim enquanto estive em Boston pela primeira vez, pela amizade sincera, pelas marcas profundas que conviver e aprender com ela imprimiu na minha formação, e pela sua grande contribuição para a minha carreira, tanto para a finalização desta etapa, quanto para fazer deslanchar as próximas... Sem encontrar você pelo caminho, as perspectivas para o futuro seriam bem diferentes, *BIG TIME*... Não vou esquecer "EVER" o tempo que passamos juntos, e tudo o que você fez por mim...

À minha queridíssima Valéria (!), amiga de TODAS as horas, "na alegria e na tristeza, na saúde e na doença..." Obrigado por você existir na minha vida, com sua alegria e o seu bom ânimo contagiantes!!! Seja na Norte-América ou em qualquer outro lugar do mundo, impossível vai ser encontrar outra amigona como você... Você é única !!! Vou "trincar" de saudades suas... Que Deus continue fazendo de você esta pessoa iluminada, sempre... E à Miguela, pelo carinho, pela amizade, pelas risadas, pelas aventuras, pela companhia e pela solicitude de sempre. Vou sentir muita falta de vocês nos meus finais de semana...

Às minhas queridas amigas da velha turma da Farmácia 95N, em especial Cláudia, Joyce, Sheila e Marilena, pela amizade sincera e duradoura, e pelos momentos de descontração que, apesar de esparsos, adoçam muito a vida... E falando em velhas turmas, meu muito obrigado, igualmente, às minhas amigas Georgina, Hye e Rosita, da velha turma do laboratório de Hematologia, pela amizade, pelo apoio e pelo incentivo constante, independente do tempo e da distância.

Às pessoas que já não estão nesta dimensão da Vida, mas que enquanto estavam por aqui sempre acreditaram em mim, me aconselharam e me orientaram, contribuindo muito para que eu chegasse neste ponto de hoje: minha avó, Profa. Lúcia Helena Meloni Bruneri e o Prof. Luiz Rachid Trabulsi.

Ao Dr. David M. Livingston, por ter acreditado em mim, e por me proporcionar a oportunidade muito privilegiada de integrar o seu grupo para o pós-doutoramento e, conseqüentemente, por me proporcionar a chance de recomeçar, simultaneamente, em múltiplos setores da vida.

À minha família, pelo apoio, presença e carinho ímpares, em todos os momentos. Ao meu pai, pela minha existência, pelos valores que me transmitiu de responsabilidade, esforço, trabalho árduo e honestidade. Pela preocupação que teve, em vida, de planejar o futuro visando o nosso bem-estar. À minha querida irmãzinha Karina, pelo seu amor, seu carinho e por ter transformado, com a sua existência, a vida de nós todos. Você está no meu coração e na minha mente, a qualquer hora, e em qualquer lugar... Ao Roberto, pela amizade, pelo carinho, pela consideração, pela sua disposição em ajudar e pela sua benevolência. E à minha querida mãe, com MUITO CARINHO, pela minha vida, por todas as tempestades e bonanças que passamos juntos, pela nossa conexão espiritual que atravessa quaisquer barreiras, e por estar comigo em TODOS os momentos, independentemente da distância, encampando todos os meus desafios, abraçando todas as minhas causas e cercando minha existência com o seu amor, o seu carinho e a sua dedicação. Essa tese é sua !!!

À FAPESP e ao CNPq, que através da concessão de bolsas e auxílios viabilizaram esta tese de Doutorado e, também, o estágio de Doutorado-Sanduiche, que tanto contribuiu para minha formação.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, muito ou pouco, voluntária ou involuntariamente, contribuíram para a minha formação e para a conclusão deste Doutorado.

ÍNDICE GERAL

I)	ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	4
II)	LISTA DE ABREVIATURAS	6
III)	RESUMO	11
IV)	ABSTRACT	14
1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Gliomas: Classificação e Clínica	17
1.2.	Biologia molecular de gliomas	19
1.3.	O modelo celular C6/ST1/P7 de reversão fenotípica tumoral/normal	25
2.	OBJETIVOS	28
2.1.	Objetivo geral	28
2.2.	Objetivos específicos	28
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1.	Materiais	29
3.1.1.	Linhagens celulares	29
3.1.2.	Soluções e meios de cultura para células de mamífero	29
3.1.3.	Isótopo radioativo	30
3.2.	Métodos	30
3.2.1.	Cultura e manutenção dos estoques celulares	30
3.2.2.	Extração e purificação de RNA total de células de mamíferos (Chirgwin et al., 1979)	31
3.2.3.	Northern Blot	31
3.2.3.1.	Fractionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído (Thomas, 1980) e transferência para membrana de nylon.	31
3.2.3.2.	Marcação de sonda radioativa	32
3.2.3.3.	Hibridização e lavagem dos filtros	32
3.2.3.4.	Revelação por "phosphorimaging"	32
3.2.4.	Quantificação de expressão gênica por "Real Time RT-PCR" (Q-PCR)	33
3.2.4.1.	Desenho dos oligonucleotídeos para Q-PCR	33
3.2.4.2.	Síntese de cDNA	35
3.2.4.3.	Reações de amplificação por Q-PCR	35
3.2.4.4.	Cálculo e quantificação de expressão gênica	35
3.2.4.5.	Amostras clínicas	36
3.2.4.6.	Análises estatísticas	36

3.2.5.	Hibridização do “macroarray” comercial “Atlas Rat Expression Array” com sondas radioativas de cDNA	38
3.2.5.1.	Geração de sondas de cDNA radioativamente marcadas	38
3.2.5.2.	Pré-hibridização e hibridização das membranas	39
3.2.5.3.	Exposição e revelação das membranas	39
3.2.6.	Hibridização dos “microarrays” comerciais Affymetrix®	40
3.2.7.	Amplificação do transcrito completo do gene CHD7 por “Long distance PCR”	41
3.2.8.	Ensaio de tumorigênese de linhagens de glioma <i>in vivo</i>	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Identificação de genes potencialmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato através de hibridização de “macroarrays” de nylon comerciais.	43
4.1.1.	Extração de RNA e hibridização de “macroarrays” comerciais (“Atlas Expression Arrays Clontech®”)	43
4.1.2.	Validação da expressão diferencial de genes possivelmente diferencialmente expressos por Northern Blot.	52
4.2.	Identificação de genes potencialmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato através de hibridização de “microarrays” de alta densidade (GeneChip Affymetrix®).	62
4.2.1.	Análise dos resultados de hibridização dos “microarrays” de alta densidade.	62
4.2.1.1.	Normalização e análise preliminar dos experimentos de hibridização de “microarrays”.	62
4.2.1.2.	Geração e re-anotação da lista de genes potencialmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 obtida a partir dos “microarrays”.	68
4.2.1.3.	Análise global dos perfis de expressão gênica entre as linhagens ST1 e P7.	78
4.2.2.	Quantificação de expressão gênica relativa por Q-PCR.	82
4.2.2.1.	Validação por Q-PCR de expressão gênica diferencial entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato.	82
4.2.2.2.	Análise de expressão gênica em linhagens de glioma humano.	97
4.2.2.3.	Análise de expressão gênica em amostras clínicas de glioma humano.	103
4.3.	Identificação e análise de expressão de novas helicases de DNA com domínios SNF2	113
4.4.	Ensaio de tumorigênese <i>in vivo</i> de linhagens de glioma	120

5.	DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
5.1.	Expressão gênica e características fenotípicas diferenciais entre as linhagens de glioma.	123
5.2.	Utilização de dados de expressão gênica de linhagens de glioma de rato como ferramenta para o estudo de interações entre genes relacionados com glioma, e para identificação de possíveis novos alvos moleculares em gliomas humanos.	127
5.3.	Identificação do gene CHD7, um novo fator remodelador de cromatina, como um possível novo alvo molecular em gliomas humanos.	135
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	139
7.	CONCLUSÕES	142
8.	ANEXOS	144
8.1.	Genes potencialmente potencialmente diferencialmente expressos identificados através de hibridização da membrana “Rat 588”.	145
8.2.	Genes potencialmente potencialmente diferencialmente expressos identificados através de hibridização da membrana “Rat 1.2 II”.	147
8.3.	Genes potencialmente potencialmente diferencialmente expressos identificados através de hibridização da membrana “Mouse Câncer 1.2”.	149
8.4.	Genes potencialmente potencialmente diferencialmente expressos identificados através de hibridização dos “microarrays” Affymetrix “GeneChip® U34 Rat Genome Set”.	151
9.	BIBLIOGRAFIA	167
10.	CURRICULUM VITAE	186

I) ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Fracionamento em gel de agarose-formaldeído para verificação da qualidade e integridade de preparações de RNA total.	45
Figura 2 – Fracionamento em gel de agarose-tiocianato de guanidina para verificação da qualidade e integridade de preparações de RNA total.	46
Figura 3 – Hibridização da membrana comercial “Atlas Rat” contendo 588 genes conhecidos de rato em duplicata.	48
Figura 4 – Hibridização de membranas comerciais “Atlas Rat 1.2 II” contendo 1.172 genes conhecidos de rato.	49
Figura 5 – Hibridização de membranas comerciais “Mouse Cancer 1.2” contendo 1.172 genes conhecidos de camundongo.	50
Figura 6 – Confirmação da expressão diferencial dos genes P8, BAF60B e RhoB na linhagem ST1 por Northern blot.	54
Figura 7 – Confirmação da expressão diferencial dos genes I κ B α , Sindecano 4 (SDC4) e Glutathione-S-transferase microssomal 1 (MGST1) na linhagem ST1 por Northern blot.	55
Figura 8 – Confirmação da expressão diferencial dos genes Cromogranina C (SCG2) e BAF60A na linhagem P7 por Northern blot.	57
Figura 9 – Confirmação da expressão diferencial dos genes codificantes para “MARCKS-like protein” e Pleiotrofina por Northern blot.	58
Figura 10 – Análise preliminar dos resultados de hibridização dos “microarray” Affymetrix.	64
Figura 11 – Normalização dos resultados de hibridização de “microarrays” Affymetrix.	66
Figura 12 – Tela de análise dos dados do programa “dCHIP”.	67
Figura 13 – Exemplo de re-anotação da EST de rato AA850917.	72
Figura 14 – Exemplo de re-anotação da EST de rato AI070060.	74
Figura 15 – Reconfirmação, por Q-PCR, de genes previamente identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7.	84
Figura 16 – Expressão diferencial de genes relacionados a PDGF nas linhagens ST1 e P7.	85
Figura 17 – Expressão diferencial de genes relacionados a FGF nas linhagens ST1 e P7.	86
Figura 18 – Expressão diferencial de outros receptores e fatores de crescimento nas linhagens ST1 e P7.	88
Figura 19 – Expressão diferencial de genes codificantes para sub-unidades do complexo remodelador de cromatina SWI/SNF nas linhagens ST1 e P7.	89
Figura 20 – Análise de expressão de genes diversos relacionados a estrutura e remodelamento de cromatina nas linhagens ST1 e P7.	90
Figura 21 – Expressão diferencial de genes diversos nas linhagens ST1 e P7.	94

Figura 22 – Análise de expressão de genes com expressão coordenada em linhagens de glioma humano.	101
Figura 23 – Quantificação da expressão relativa dos genes CHD7, PTPTZ1 e PDGFRA em amostras clínicas de gliomas humanos e controles de cérebro não-tumoral.	104
Figura 24 – Quantificação da expressão relativa dos genes FGF1, PTN e SCG2 em amostras clínicas de gliomas humanos e controles de cérebro não-tumoral.	105
Figura 25 – Quantificação da expressão relativa dos genes BRG1 e Brm, utilizando diferentes pares de "primers", em amostras clínicas de gliomas humanos e controles de cérebro não-tumoral.	108
Figura 26 – Quantificação da expressão relativa dos genes ALK, EGFR, FGFR1 e FGFR3 em amostras clínicas de gliomas humanos e controles de cérebro não-tumoral.	110
Figura 27 – Quantificação da expressão relativa dos genes RNF130, ROBO1 e RELN em amostras clínicas de gliomas humanos e controles de cérebro não-tumoral.	112
Figura 28 – Identificação e isolamento de parálogos humanos da proteína Kis-L de <i>Drosophila</i> .	115
Figura 29 – Amplificação do cDNA completo de CHD7 e análise da sequência de proteína codificada pelo transcrito canônico predito.	117
Figura 30 – Tumorigênese <i>in vivo</i> (sc) das linhagens ST1 e P7 de glioma de rato.	121
Figura 31 – Tumorigênese <i>in vivo</i> (sc) de linhagens de glioma humano.	122
Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para Q-PCR.	34
Tabela 2 – Dados clínicos dos pacientes incluídos neste estudo.	37
Tabela 3 – Quadro-resumo geral de todos os experimentos de validação de expressão diferencial por Northern blot.	60
Tabela 4 – Resultados de categorias gênicas enriquecidas nos experimentos de hibridização dos "microarrays" Affymetrix.	80
Tabela 5 – Resultados de regiões cromossômicas transcricionalmente ativas enriquecidas nos experimentos de hibridização dos "microarrays" Affymetrix.	77
Tabela 6 – Tabela-resumo mostrando a reprodução de resultados anteriormente obtidos nos experimentos com "microarrays".	81
Tabela 7 – Genes adicionais escolhidos para quantificação de expressão por Q-PCR nas linhagens ST1 e P7.	77
Tabela 8 – Tabela-resumo dos níveis de expressão gênica relativos quantificados por Q-PCR nas linhagens ST1 e P7 de glioma de rato.	95
Tabela 9 – Tabela-resumo dos níveis de expressão gênica relativos quantificados por Q-PCR nas linhagens de glioma humano.	98
Tabela 10 – Correlação em pares de níveis relativos de expressão gênica em linhagens de glioma humano.	102
Tabela 11 – Correlação em pares entre níveis relativos de expressão gênica em amostras clínicas de glioma.	107

II) LISTA DE ABREVIATURAS

AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
ATRA	Ácido retinóico todo-trans
p14 ^{ARF}	<i>Alternative Reading Frame</i> (ou CDKN2A – <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
BAF60A	<i>BRG1/brm Associated Factor 60 kDa - A</i>
BAF60B	<i>BRG1/brm Associated Factor 60 kDa - B</i>
BAF170	<i>BRG1/brm Associated Factor 170 kDa</i>
BGN	Biglicano
bp	Pares de base
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1, early onset</i>
BRG-1	<i>Brahma-Related Gene 1</i>
BRK	<i>Brahma and Kismet Related domains</i>
Brm	<i>Brahma (Drosophila)</i>
BZRP	Receptor de benzodiazepina
C	Controle
CAT	Catalase
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CDKN	<i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor</i>
cDNA	DNA complementar
CHD	<i>Chromodomain helicase-DNA-binding protein</i>
CKSN2B	Caseína quinase 2 beta
cRNA	RNA complementar
CSDE1	<i>Cold shock domain containing E1</i>
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo
DPEP1	Dipeptidase
DR	Doutorado

E2F	<i>E2F transcription factor</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>
EPC1	<i>Enhancer of Polycomb 1</i>
EPC2	<i>Enhancer of Polycomb 2</i>
ERBB3	<i>v-Erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
EYA2	<i>EYes Absent homolog 2 (Drosophila)</i>
FANCM	<i>Fanconi anemia, complementation group M</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FYN	<i>Protein-tyrosine kinase FYN</i>
GADD45B	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta gene"</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC	glicocorticóide
gDNA	DNA genômico
GGT1	Gama glutamil transferase 1
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GMPPA	<i>GDP-mannose pyrophosphorylase A (Hexose fosforilase)</i>
GPX1	Glutaciona peroxidase 1
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GST	Glutaciona-S-transferase
GTPase	Guanosina trifosfatase
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HPRT1	Hipoxantina Fosforibosil Transferase 1
HMG I/Y	<i>High mobility group I/Y</i>
HSD11B1	Corticosteróide 11-beta-desidrogenase
Hy	Hidrocortisona
IL6R	Receptor de IL-6
p16 ^{INK4A}	<i>Inhibitor of CDK4 – A (ou CDKN2A – Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A)</i>
IQ	Instituto de Química
I κ B α	<i>Inhibitor of Kappa B, alpha isoform</i>
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

Kis-L	<i>Kismet-long Isoform</i>
LB	<i>Meio de Luria-Bertani</i>
LBCM	Laboratório de Biologia Celular e Molecular
LD-PCR	<i>Long distance PCR</i>
LH	Hormônio luteinizante
LIM-15	Laboratório de Investigação Médica - FMUSP - laboratório 15
LOH	<i>Loss Of Heterozigosity</i>
MDa	Mega Dalton
MARCKS	<i>Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate</i>
MGST1	Glutathione-S-transferase microsomal 1
MDK	Midquina
ML	mililitros
MLP1	<i>MARCKS-like protein 1</i>
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propanossulfônico
mRNA	RNA mensageiro
μL	microlitros
μM	micromolar
μg	microgramas
NF-κB	<i>Nuclear Factor- Kappa B</i>
nm	nanômetros
NTC	<i>Non-Template Control</i>
NUPR1	<i>NUclear PRotein 1</i>
ODC	Ornitina decarboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSM1	<i>Orosomuroid 1</i>
OTX1	<i>Orthodenticle homolog 1 (Drosophila)</i>
P8	<i>p8 protein (candidate of metastasis 1)</i>
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>
PIK3R1	<i>Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory subunit 1</i>
PM	Peso Molecular
PTEN	<i>Phosphatase and <u>TEN</u>sin homolog</i>

PTMA	<i>Prothymosin, alpha</i>
PTN	Pleiotrofina
PTPRZ1	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor type, Z polypeptide 1</i>
Q-PCR	<i>PCR quantitativo em tempo real</i>
Rb1	Retinoblastoma protein 1
rDNA	DNA ribossomal
rERBB3	avian ERYthroblastosis oncogene B3
RELN	Reelin
RhoB	<i>ras homolog gene family, member B</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RNA	Ácido ribonucléico
Rnase	Ribonuclease
rNFKBIA	<i>Nuclear Factor of Kappa light chain gene enhancer in B-cells Inhibitor, alpha</i>
rRNA	RNA ribossomal
RNF130	<i>RING Finger Protein 130</i>
RNF144	<i>RING Finger Protein 144</i>
ROBO1	<i>Roundabout 1</i>
PFKFB3	Fosfofructoquinase 3
RPM	Rotações por minuto
SMARCD2	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily D, member 2</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
s. c.	subcutâneo
SCG2	Secretogranina 2
SDC4	Sindecano-4
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SMAD5	Small Mothers Against Dodecaplegic gene 5
SMARCAx	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member x</i>
SNF2	<i>Sucrose Non-Fermenting 2</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SWI/SNF	<i>Mating-Type SWItch/Sucrose Non-Fermenting complex</i>
TE	Tris-EDTA
TGFB3	<i>Transforming Growth Factor Beta 3</i>
TP53	<i>Tumor Protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)</i>
TXNDC4	<i>TRX domains gene 4</i>

USP	Universidade de São Paulo
UTR	<i>UnTranslated Region</i>
YWHAE	Proteína 14-3-3 isoforma epsilon
YWHAG	Proteína 14-3-3 isoforma gama
YWHAH	Proteína 14-3-3 isoforma eta
YWHAQ	Proteína 14-3-3 subunidade teta
ZFP46	<i>Zinc finger 46</i>

III) RESUMO

Os gliomas estão entre os mais freqüentes e fatais tumores do sistema nervoso central. Apesar dos grandes avanços da Medicina nas áreas diagnósticas e terapêuticas, o tratamento desses tumores ainda é, na grande maioria dos casos, paliativo, sendo a extirpação cirúrgica do tumor o único recurso com potencial curativo e, ainda assim, apenas para os gliomas de baixo grau. Neste trabalho, foram analisados os perfis de expressão gênica diferencial entre linhagens de glioma de rato com diferentes graus de tumorigenicidade (linhagens ST1 e P7), visando identificar genes com potencial de aplicação na doença humana como marcadores moleculares e/ou novos alvos terapêuticos.

Numa primeira abordagem, foi realizado um rastreamento de genes potencialmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato através da hibridização de *macroarrays* de cDNA comerciais. Um conjunto de três membranas comerciais foi hibridizado com alvos radioativos gerados a partir de mRNA obtido destas duas linhagens, totalizando aproximadamente 3.000 genes. Nestes experimentos, foram identificados aproximadamente 200 genes como sendo possivelmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7. Os níveis de expressão relativa de cerca de 40 destes genes foram analisados por Northern blot, sendo que seis deles foram confirmados como sendo mais expressos na linhagem ST1 enquanto que 4 foram confirmados como sendo mais expressos na linhagem P7.

Num segundo momento, foi realizado um rastreamento de expressão gênica em larga escala, através do uso de *microarrays* de DNA contendo sondas que permitem a análise de expressão de aproximadamente 24.000 transcritos de rato. Esta análise levou à identificação de uma lista contendo aproximadamente 1.300 genes candidatos a diferencialmente expressos, que apresentaram razões de expressão relativa entre 2 e >3.000. Desta lista, ~700 genes foram identificados como provavelmente mais expressos na linhagem ST1, e cerca de 500 genes com expressão maior na linhagem P7.

A etapa de subsequente de validação da expressão diferencial foi realizada através de PCR quantitativo em tempo real (Q-PCR). A expressão de 49 genes foi quantificada em quatro preparações independentes de RNA originárias das linhagens ST1 e P7, sendo que 27 destes genes foram identificados como possivelmente diferencialmente expressos através dos *microarrays*, 10 dos quais haviam sido previamente confirmados por Northern Blot e 12 genes diversos. Destes genes, 21 foram confirmados por Q-PCR como sendo diferencialmente expressos entre as

linhagens ST1 e P7, além daqueles 10 genes cuja expressão diferencial havia sido anteriormente confirmada por Northern. Ao todo, oito genes foram confirmados como sendo mais expressos na linhagem ST1, e 23 genes o foram como sendo mais expressos na linhagem P7.

Vários dos genes confirmados como sendo diferencialmente expressos na linhagem ST1 estão, direta ou indiretamente, relacionados a parada de crescimento e supressão de fenótipo tumoral. Em contrapartida, diversos dos genes confirmados como sendo diferencialmente expressos na linhagem P7 codificam para receptores de fatores de crescimento peptídicos e seus respectivos ligantes. Em particular, foi detectado maior expressão, na linhagem P7, de receptores e ligantes relacionados ao fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento para fibroblastos (FGFs) e, também, do fatores de crescimento da família de pleiotrofina/midquina (PTN/MDK), e seus respectivos receptores. Sabidamente, vários destes genes estão envolvidos na neoangiogênese e na fechamento de alças autócrinas/parácrinas de estímulo da proliferação tumoral, em particular de gliomas humanos. Além disso, estes achados foram coerentes com o maior potencial tumorigênico ($\sim 2,5\times$) apresentado pela linhagem P7, quando injetadas s.c. no dorso de animais imunocomprometidos ($p < 0,01$).

As linhagens ST1 e P7 foram originalmente isoladas como sendo sub-linhagens derivadas da linhagem C6, cuja origem é clonal. Assim, uma possível interpretação para as diferenças marcantes dos perfis de expressão detectadas entre as linhagens ST1 e P7, é de que estas diferenças sejam, mais provavelmente, a consequência de algumas poucas alterações moleculares em genes-chave, e não de alterações extensas do genoma celular, uma vez que as duas linhagens têm, *a priori*, o mesmo “background” genético. Assim, um número limitado de aberrações genéticas adicionais, particulares de cada linhagem, seria suficiente para uma modificação substancial dos perfis de expressão gênica, se os genes alterados forem capazes de modular a expressão de vários outros genes. Na busca de indícios que fortalecessem esta hipótese, foi quantificado, em seis linhagens humanas de glioma, a expressão dos mesmos genes cuja expressão foi originalmente quantificada nas linhagens ST1 e P7. Em seguida, foram realizados testes de correlação em pares (Teste de Pearson) entre os níveis de expressão relativos destes genes para as seis linhagens, buscando identificar conjuntos de genes que apresentassem expressão coordenada, que, por sua vez, sugeririam a existência de possíveis relações regulatórias entre os mesmos. Foi possível observar expressão significativamente correlacionada de seis genes (CHD7, FGF1, PDGFRA, PTN, PTPRZ1 e SCG2), sugerindo uma possível co-regulação recíproca entre diferentes vias de fatores de

crescimento e/ou um novo fator remodelador de cromatina (CHD7). Paralelamente, o gene CHD7 foi, por sua vez, identificado como um novo fator remodelador de cromatina putativo, cujo cDNA completo pode ser amplificado, com êxito, através de RT-PCR longo.

A expressão destes mesmos seis genes foi quantificada, por Q-PCR, em 64 amostras clínicas de glioma e cérebro humano não-tumoral. Com exceção do gene SCG2, os demais cinco (CHD7, FGF1, PDGFRA, PTN e PTPRZ1) são significativamente mais expressos em todos os graus de glioma, quando comparados com cérebro humano não-tumoral ($p < 0,05$). Foi possível verificar, inclusive, que os níveis de expressão de vários destes genes estão altamente correlacionados nessas amostras. Em particular, observou-se correlação com alta significância entre os genes CHD7×PDGFRA ($p = 4,7 \times 10^{-17}$), FGF1×PTN ($p = 1,1 \times 10^{-19}$), do receptor PTPRZ1 contra todos os demais genes ($10^{-6} < p < 10^{-9}$) e, especificamente, contra seu ligante PTN ($p = 1,6 \times 10^{-14}$). Como os *loci* dos genes PTN e PTPRZ1 se encontram relativamente próximos (~15 Mb) numa região do cromossomo 7 humano, a qual frequentemente se encontra amplificada em gliomas humanos (7q), é possível que estes dois genes, codificantes para um fator de crescimento e seu respectivo receptor, façam parte de um novo amplicon em gliomas humanos. Além disso, vários genes com maior expressão na linhagem P7 (ALK, FGFR1, RNF130 e ROBO1) estão, também, significativamente mais expressos em certos graus de gliomas humanos, quando comparados com tecido cerebral humano não-tumoral.

De um modo geral, estes dados indicam que foi possível obter, a partir de linhagens de glioma de rato, incursões aplicáveis para um entendimento mais amplo da biologia que envolve a patogênese da doença humana. Um destes dados extrapoláveis entre diferentes modelos inter-espécies é que a co-expressão de múltiplas vias autócrinas de crescimento parece ser um achado comum tanto em modelos experimentais de glioma em rato quanto em linhagens e amostras clínicas de gliomas humanos, e que estas vias estão, potencialmente, interconectadas ao nível transcricional. Além disso, foi possível verificar que um novo gene codificante para um fator de remodelamento de cromatina (CHD7), apresenta níveis de expressão relativos muito aumentados em amostras clínicas de glioma, quando comparado com cérebro humano não-tumoral. Analisados em conjunto, os resultados obtidos aqui têm o potencial para conduzir ao desenvolvimento racional de novas estratégias terapêuticas e diagnósticas/prognósticas para gliomas humanos. A análise do papel funcional destes genes em glioma, e das vias moduladas por seus produtos, se constituirá de um passo fundamental para o estabelecimento destes genes como potenciais novos alvos terapêuticos e/ou marcadores moleculares.

IV) ABSTRACT

Gliomas are among the most frequent and fatal tumors of the central nervous system. Despite the recent and important advances in the diagnostic and therapeutic fields, treatment of these tumors still is, in the vast majority of the cases, palliative. Surgical resection of the tumor remains as the sole potentially curative resource, but only for the low grade gliomas. In the present work, differential gene expression profiles were analyzed between rat glioma cell lines differing in tumorigenic potential (ST1 and P7 cell lines), aimed at identifying genes with potential to become novel molecular markers and therapeutic targets for the human disease.

As a first approach, a commercial macroarray-based screening was undertaken in order to identify differentially expressed genes between ST1 and P7 rat glioma cell lines. Three different sets of commercial membranes comprising 3,000 genes were hybridized against radiolabeled targets that were synthesized from mRNA extracted from both cell lines. As a result, near 2,000 genes were identified as being possibly differentially expressed between ST1 and P7 cell lines. The relative expression levels of 40 genes from this list were analyzed by Northern blot, and six genes were successfully confirmed as being expressed at higher levels in the ST1 cell line, whereas four genes confirmed heightened expression in P7 cells.

As a second approach, a large-scale, Affymetrix™ microarray-based screening was performed, which allowed measuring the relative expression levels of about 24,000 rat transcripts. This analysis led to the identification of 1,300 candidate differentially expressed genes, for which the differential expression ratios ranged from 2 up to >3,000. From these, ~700 genes displayed preferential expression in the ST1 cell line, while around 500 genes were more expressed in P7 cells.

The following step, namely, validation of the differential expression, was achieved through Real-Time PCR (Q-PCR). Expression levels of 49 genes were measured in four independent RNA preparations from ST1 and P7 cell lines. About 27 of these genes were identified as putative differentially expressed, 10 of which had previously been confirmed by Northern blot as differentially expressed and 12 additional genes were also included. From this list, 21 genes were confirmed by Q-PCR as being differentially expressed between the ST1 and P7 cell lines, in addition to those 10 whose differential expression was confirmed by Northern Blot. In total, eight genes were confirmed as being differentially expressed in the ST1 cell line, and 23 genes were confirmed as being expressed at higher levels in the P7 cells.

Many of the genes confirmed as being differentially expressed genes in the ST1 cell line are, directly or indirectly, related to growth arrest and suppression of the malignant phenotype. On the other hand, several of the genes displaying elevated expression in the P7 cell line code for growth factor ligands and receptors related to the PDGFs (platelet-derived growth factors), FGFs (fibroblast growth factors) and PTN/MDK (pleiotrophin/midkine) growth factor families. Many of these genes are already known as being related to neoangiogenesis and to the establishment of autocrine/paracrine loops in human gliomas. In addition, these findings are in keeping with the significantly higher ($p < 0.01$) tumorigenic potential displayed by the P7 cell line ($\sim 2.5\times$), when both cell lines are injected s.c. in the dorsal region of immunodeficient nude mice.

Moreover, ST1 and P7 cell lines were originally isolated as clonal cell lines from the C6 cell line which, in turn, is also a clonal cell line. Therefore, a possible interpretation for the remarkably different gene expression profiles between ST1 and P7 cell lines is that those differences are, most likely, a consequence of a few molecular defects in key/master genes, rather than extensive aberrations of the cellular genome, given that those cell lines have, *a priori*, similar genetic backgrounds. Thus, a limited number of genetic aberrations, characteristic of each cell line, would be sufficient for a substantial modification of the gene expression profiles, provided that the altered genes are able to modulate the expression of each other. In an attempt to investigate this point, the relative expression levels of the same genes were analyzed by Q-PCR, and pairwise correlation tests (Pearson correlation tests) were performed using expression data from the six human glioma cell lines, aimed at identifying gene sets that displayed coordinate expression which would suggest the existence of putative regulatory loops among them. It was possible to identify a cluster of six genes (CHD7, FGF1, PDGFRA, PTN, PTPRZ1, SCG2) that displays co-regulated expression, thus suggesting a possible reciprocal co-regulation among distinct growth factor pathways and a putative chromatin remodeling factor (CHD7). Furthermore, the CHD7 gene was identified as a novel, putative chromatin remodeling factor, and its full-length cDNA could be successfully amplified by means of long RT-PCR.

The expression levels of the same genes was quantified, by Q-PCR, in 64 clinical samples, comprising gliomas and non-tumoral human brain tissue samples. Except for the SCG2 gene, the remaining five genes (CHD7, FGF1, PDGFRA, PTN and PTPRZ1) were expressed at significantly higher levels in glioma samples of all grades, when compared to non-tumoral human brain tissue samples ($p < 0.05$).

Likewise, we were able to verify that expression levels for many of these genes are strictly correlated in those samples. A particularly high level of significance was found for the correlation of expression levels between CHD7×PDGFRA ($p=4.7\times 10^{-17}$) and also for the FGF1×PTN gene pair ($p=1.1\times 10^{-19}$). A strikingly high level of significance ($p=1.6\times 10^{-14}$) was also found for the expression levels between the PTPRZ1 receptor and its PTN ligand. Given that the PTN and PTPRZ1 loci are relatively close to each other (~15 Mb) on the long arm of human chromosome 7, which, in turn, is frequently amplified in human gliomas, the genomic region including these two genes may well constitute a novel amplicon in human gliomas. In addition, several other genes with higher expression in the P7 cell line (ALK, FGFR1, RNF130 and ROBO1) are also expressed at significantly higher levels in certain glioma grades, when compared to non-tumoral human brain tissue samples.

Overall, these data indicate that starting from the rat glioma cell lines model, it was possible to obtain, insights applicable to a better understanding of the biology underlying the pathogenesis of human gliomas. Thus, co-expression of multiple autocrine loops seems to be a commonplace in the rat experimental glioma models as well as in the human glioma cell lines and in clinical samples, where these pathways are potentially interconnected at the transcriptional level. Furthermore, we were able to detect increased mRNA expression levels of a novel putative chromatin remodelling factor (CHD7) in human glioma tissue samples, when compared to non-tumoral human brain tissue samples. Taken together, the results obtained in this work may potentially lead to the rational development of novel therapeutic, diagnostic and prognostic strategies for human gliomas. Functional analysis of these genes in glioma, and the pathways modulated by their products, will be a fundamental step for the establishment of these genes as potentially novel therapeutic targets and/or molecular markers.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gliomas: Classificação e Clínica

A glia, que compreende cerca de 90% do tecido cerebral de um ser humano adulto (Pfrieger & Barres, 1995), é composta por diversos tipos celulares (astrócitos, oligodendrócitos, ependimócitos e microglia), e tem por função, além do suporte estrutural, a manutenção, a nutrição e o suporte para o desenvolvimento e reparo do sistema nervoso central (Gimenez y Ribotta et al., 2001; Noctor et al., 2001; Toresson et al., 1999).

Os tumores derivados da glia, genericamente chamados de gliomas, são os tumores do sistema nervoso central que apresentam maior incidência (Akbasak & Sunar-Akbasak, 1992), representando cerca de 70% de todos os tumores cerebrais (Ohgaki & Kleihues, 2005). De acordo com a OMS, os três tipos mais freqüentes de glioma são os astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas, classificados histologicamente de acordo com o tipo celular predominante na massa tumoral.

Os astrocitomas, em particular, constituem o tipo de glioma mais freqüente na população em geral, totalizando mais de 65% de todos os tumores cerebrais. A Organização Mundial de Saúde classifica os astrocitomas em quatro graus distintos, baseado em critérios histopatológicos que, por sua vez, se correlacionam com a clínica do paciente portador do tumor (Behin et al., 2003; Collins, 2004). Os astrocitomas de grau 1 (astrocitoma pilocítico) e de grau 2 (astrocitoma difuso) são, também, referidos como astrocitomas de baixo grau. Estes tumores são, em geral, de crescimento lento e de baixa malignidade e, entre os astrocitomas, são os únicos passíveis de serem curados através de extirpação cirúrgica do tumor. Os astrocitomas pilocíticos (OMS grau 1), frequentemente são tumores circunscritos, de maior incidência na infância e que apresentam prognóstico muito bom, sobretudo em relação aos demais subtipos. A remoção cirúrgica do tumor é, na maior parte dos casos, curativa, e existem alguns raros relatos de regressão espontânea do tumor. Dinstintamente dos outros graus de glioma, os astrocitomas pilocíticos muito raramente progridem para astrocitomas de outro tipo, sendo considerados, na verdade, uma patologia à parte em relação aos demais astrocitomas. Já os astrocitomas difusos (OMS grau 2), embora passíveis de serem curados por remoção cirúrgica em alguns casos, não se apresentam como estruturas

circunscritas, como os astrocitomas de grau 1. O prognóstico do paciente depende, em grande parte, da manutenção das características diferenciadas do tumor. Embora de crescimento lento, estes tumores podem recidivar, quando não curados por cirurgia, como astrocitomas de grau mais elevado, onde o prognóstico para o portador piora significativamente.

Os astrocitomas de alto grau, compreendem os astrocitomas anaplásicos (grau 3) e o glioblastoma multiforme (grau 4). Esses tumores apresentam prognóstico muito pior em relação aos astrocitomas de baixo grau, e são, até o presente momento, incuráveis pelas modalidades terapêuticas disponíveis. Um achado histopatológico característico dos astrocitomas de alto grau é a intensa neoangiogênese e proliferação endotelial que se observa em meio ao tecido cerebral invadido pelo tumor. No caso do glioblastoma multiforme, a característica diferencial em relação aos astrocitomas anaplásicos é que a vasculogênese induzida pelo tumor é aberrante, onde não se observa, nos novos vasos formados, a presença de lúmen (Lopes, 2003).

A incidência dos gliomas é estimada em sendo por volta de 5 – 10 casos por 100.000 pessoas/ano, sendo que a maioria destes casos corresponde a glioblastoma multiforme, e os pacientes onde a incidência é maior costumam ter por volta de 60 anos ou mais (Burkhard et al., 2003; CBTRUS, 2002; Ohgaki et al., 2004; Okamoto et al., 2004). Apesar de haverem algumas indicações de associação da incidência de gliomas com fatores ocupacionais e de exposição a certos agentes químicos, nenhum agente ambiental ou infeccioso foi comprovadamente associado, até o presente momento, com a etiologia dos gliomas esporádicos (Ohgaki & Kleihues, 2005), ou seja, aqueles casos que não estão associados com síndromes hereditárias de predisposição a neoplasias. Indivíduos portadores destas síndromes, por sua vez, apresentam maior incidência de gliomas em relação a indivíduos não-portadores mas, ainda assim, os gliomas não são os tumores de maior incidência nestes pacientes (Kleihues et al., 2002).

Apesar dos avanços terapêuticos para câncer nas últimas décadas, a taxa de sobrevivência para estes tumores ainda é extremamente baixa, quando comparada com outros tipos de tumores associados a bom prognóstico e responsividade à terapêutica. Num estudo realizado na Suíça, a taxa de sobrevivência estimada para glioblastoma, o tipo mais comum de glioma, foi de 42,4% seis meses após o diagnóstico, 17,1% após doze meses, e apenas 3,3% após cinco anos (Ohgaki et al., 2004). Perspectivas como estas, indicam a necessidade premente de novos desenvolvimentos terapêuticos mais eficazes para o tratamento dos gliomas.

1.2. Biologia molecular de gliomas

Assim como todos os outros tumores, os gliomas são causados, inicialmente, por mutações que levam à perda de função de vias ou genes supressores de tumor e, simultaneamente, ao ganho de função ou aumento da atividade de vias e genes relacionados à regulação positiva da proliferação celular (Rangarajan et al., 2004; Sherr, 2004). Estas alterações iniciais acabam levando, por diferentes mecanismos, à instabilidade genética da célula e, conseqüentemente, ao acúmulo de mutações adicionais que contribuem para a aquisição e progressão do fenótipo maligno (Fukasawa, 2005; Heppner & Miller, 1998; Jackson & Loeb, 2001). Cada vez mais, se fortalece a noção de que cada tipo de tumor é causado por um conjunto distinto de alterações genéticas, e que podem variar, inclusive, individualmente entre os pacientes. Em virtude disto, um dos conceitos modernamente mais bem aceitos em Oncologia, é de que o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento eficaz de tumores malignos vai envolver, cada vez mais, o planejamento de estratégias de intervenção direcionadas a alvos moleculares bastante específicos, racional este denominado “target-oriented approach” (de Bono et al., 2003; Sausville, 2004). Faz-se necessário, portanto, o entendimento e investigação dos alvos moleculares específicos de cada tipo tumor para facultar, numa etapa posterior, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionada contra os defeitos moleculares que são particulares de cada tipo de tumor e de cada paciente.

O estudo de síndromes hereditárias, que predispõe os indivíduos a uma maior incidência de tumores de um dado tipo ou tecido, tem contribuído substancialmente para desvendar novas vias e genes passíveis de se tornarem alvos para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. Nos caso particular dos gliomas, é observado uma maior incidência desses tumores em pessoas portadoras de síndromes familiares que predis põem a neoplasias, fortalecendo a hipótese de predisposição genética. Entretanto, não são conhecidos, até o momento, genes que uma vez mutados, levem a síndromes de predisposição específica a gliomas com alta penetrância (Kleihues et al., 2002), da maneira como mutações do tipo “germline” nos genes BRCA1 ou BRCA2 estão associadas a um risco por volta de 80% de desenvolvimento de câncer de mama até os 70 anos de idade (Arai et al., 2004). Assim, a grande maioria dos casos de gliomas são decorrentes, até onde se sabe, de eventos esporádicos e, portanto, apresentam uma heterogeneidade molecular considerável. No que diz respeito às alterações moleculares

frequentemente encontradas em gliomas, os oncogenes e genes supressores de tumor alterados nesses tumores não são específicos, mas o conjunto de genes que sofrem alterações cumulativas, e que se acredita estar ligado ao desenvolvimento da doença, é característico (Maher et al., 2001; Ohgaki et al., 2004; Ohgaki & Kleihues, 2005).

Do ponto de vista mecanístico, existem, atualmente, duas teorias para explicar a gênese dos glioblastomas, a forma mais comum e mais fatal dos gliomas (~65% dos gliomas), que são apoiadas por achados clínicos e moleculares. A primeira delas, que se acredita ser a da maioria dos casos, leva à formação de glioblastoma como sendo o tumor primário, detectado no ato da apresentação do paciente (*de novo* glioblastoma). Na segunda, o paciente é diagnosticado como sendo portador de glioma de grau mais baixo, mais frequentemente graus 2 ou 3, que representam, respectivamente, 3 e 13% dos casos de gliomas astrocíticos. No decorrer do tempo (10 anos, em média), em cerca de 70% destes pacientes, o tumor evolui paulatinamente até se tornar um glioblastoma multiforme, diagnosticado então como um tumor secundário. Os astrocitomas pilocíticos (OMS grau 1), contudo, muito raramente progridem para gliomas de grau mais alto. As alterações genéticas encontradas em cada um dos casos são distintas, fortalecendo a idéia da existência de pelo menos duas vias de gliomagenese. É possível observar que as alterações moleculares encontradas nos glioblastomas secundários, indicam um acúmulo de alterações genéticas adicionais em relação àquelas observadas para os gliomas de baixo grau, e são ligeiramente distintas daquelas encontradas nos glioblastomas *de novo* (Behin et al., 2003; Ohgaki & Kleihues, 2005).

Dentre as alterações genéticas mais consistentemente encontradas em gliomas de ambos os tipos, estão a perda de função do gene PTEN, através de diferentes mecanismos, frequentemente associado com perdas no braço longo do cromossomo 10 (10q) ou, ainda, do cromossomo 10 inteiro (Behin et al., 2003; Maher et al., 2001). A perda de função de PTEN, que codifica para uma fosfatase de múltipla especificidade (Chu & Tarnawski, 2004), frequentemente perdida em vários tipos de tumores humanos, pode ocorrer por mutação, silenciamento da expressão ou, ainda, por deleção do respectivo *locus* cromossômico (Leslie & Downes, 2004; Sansal & Sellers, 2004). Esta fosfatase tem um papel crucial por promover a regulação negativa da via dos fosfatidil-inositóis, através da qual é transmitido o sinal mitogênico de muitos receptores de fatores de crescimento. PTEN é classicamente conhecida por catalisar a defosforilação de fosfoinositídeos gerados pela ação de quinases da família das PI3K. Entretanto, a descrição recente da atividade proteína

fosfatase de PTEN e, em particular, do fato do receptor de PDGF ser um substrato para PTEN, adicionou um grau adicional de complexidade aos mecanismos de supressão tumoral desempenhados por este produto gênico (Mahimainathan & Choudhury, 2004). Adicionalmente, este achado trouxe implicações específicas para o papel deste gene em gliomas, uma vez que o receptor de PDGF é um dos genes-alvo de ganho de função em gliomas (Hermanson et al., 1992). Apesar da importância crescente desta fosfatase para o desenvolvimento e a progressão dos gliomas, existem fortes evidências de que existem outros prováveis genes supressores de glioma no braço longo do cromossomo 10. Esta região cromossômica (10q) sofre LOH em 80-90% dos casos de glioblastoma, porém alterações estruturais do gene PTEN são encontrados em apenas 20-30% dos glioblastomas, indicando que a perda de função de PTEN não é, portanto, o único alvo das perdas cromossômicas observadas para esta região genômica (Zhou et al., 1999).

A via de p53 é uma outra via de supressão tumoral frequentemente comprometida nos gliomas de vários tipos. A proteína p53 é um gene supressor de tumor mutado em aproximadamente 50% dos tumores humanos (Sherr, 2004), estando envolvida no controle do ciclo celular, na indução de apoptose e na manutenção da integridade do genoma celular, processos estes que estão comprometidos, em maior ou em menor grau, em virtualmente todos os tumores humanos. As alterações de p53 são mais frequentemente encontradas em glioblastomas secundários do que em glioblastomas *de novo* (Behin et al., 2003; Watanabe et al., 1996), apesar destas alterações já serem detectáveis naqueles tumores que acabam progredindo até glioblastoma, indicando que durante a progressão do tumor ocorre seleção daqueles clones em que a função de p53 está comprometida. Entretanto, ainda não está claro qual ou quais dos múltiplos efeitos de p53 contribui, majoritariamente, para o desenvolvimento de gliomas. Interessantemente, em modelos murinos de glioma, p53 parece estar envolvida na regulação negativa do estabelecimento da alça autócrina de PDGF, que é uma característica recorrente numa fração significativa de gliomas humanos (Hesselager et al., 2003). Uma vez que as funções da proteína p53 são desempenhadas através de uma série de efetores diferentes e, além disso, a mesma está profundamente envolvida com o desenvolvimento dos gliomas, é possível se observar, também, comprometimento da função dos efetores mais relevantes de p53. A expressão da proteína p14^{ARF}, que é um dos efetores moleculares de p53, está comprometida em cerca de 76% dos glioblastomas através de diferentes mecanismos (Nakamura et

al., 2001a), o que reforça a idéia de que os genes supressores de tumor e oncogenes, que não raro estão simultaneamente alterados em glioma (e possivelmente em outros tumores) estão, frequentemente, relacionados funcionalmente.

Neste particular, o mesmo tipo de observação pode ser feita para a proteína do retinoblastoma (pRb). A expressão de pRb está comprometida em 43% dos glioblastomas secundários, e em cerca de 14% dos glioblastomas primários (Nakamura et al., 2001b). Esta proteína, que é regulada por fosforilação, está classicamente envolvida na repressão da expressão dos genes envolvidos na transição $G0/G1 \Rightarrow S$ do ciclo celular, no seu estado hipofosforilado. Nesta condição, pRb inibe a função do fator de transcrição E2F que, por sua vez, promove a expressão de genes envolvidos com a progressão no ciclo celular. A proteína p16^{INK4A}, codificada pelo mesmo *locus* gênico que dá origem à proteína p14^{ARF}, é um inibidor do complexo Ciclina D1/CDK4, que cataliza a fosforilação e inativação de pRb. Logo, a função de pRb depende, dentre outros fatores, da expressão da proteína p16^{INK4A} (Sherr & Roberts, 1999). Assim, também é intuitivo que, estando a função de pRb comprometida numa proporção considerável de gliomas, a expressão/função de p16^{INK4A} deve estar, da mesma maneira, comprometida pelo menos numa fração desses tumores. De fato, a expressão de p16^{INK4A} está comprometida em cerca de 50% dos glioblastomas, independentemente de serem primários ou secundários (Behin et al., 2003). A deleção homozigótica deste *locus* é o mecanismo de inativação mais comum nos gliomas, e existem indícios que os tumores onde isto ocorre tenham um prognóstico pior (Kamiryo et al., 2002; Labuhn et al., 2001).

Quanto aos genes envolvidos com regulação positiva da proliferação celular, a co-expressão de fatores de crescimento e de seus respectivos receptores, levando ao estabelecimento de alças autócrinas, é uma característica marcante dos gliomas (Kesari et al., 2005; Newton, 2003; Rao & James, 2004). Neste particular, a superexpressão do receptor de EGF (EGFR) é, provavelmente, a alteração de gene pró-proliferativo mais consistente em glioblastomas primários (>50%), sendo que em cerca de 40% dos tumores a superexpressão de EGFR é devida à amplificação do respectivo *locus* gênico (Ekstrand et al., 1992; Wong et al., 1987). Além disso, existem evidências de que EGF e TGF α , que são ligantes de EGFR, são frequentemente expressos em glioblastomas (Behin et al., 2003), o que é coerente com o estabelecimento de uma alça autócrina de estimulação da proliferação. Além de superexpressão e amplificação do *locus* de EGFR, é comum encontrar, em 40%

dos glioblastomas com amplificação do *locus* de EGFR, o rearranjo do gene com a perda de exons codificantes para o domínio extracelular do receptor, o que leva à expressão de uma forma aberrante de EGFR, a qual é constitutivamente ativada (EGFRvIII) (Wikstrand et al., 1998). Pacientes que expressam esta forma aberrante do receptor de EGF podem ter prognósticos significativamente piores (Heimberger et al., 2005; Liu et al., 2005). Portanto, através de diferentes mecanismos, a ativação exacerbada da sinalização via EGFR é um defeito molecular majoritário na patogênese dos glioblastomas humanos e que está, comprovadamente, envolvida com a proliferação, migração e invasão das células de glioblastoma (Huang et al., 1997; Lal et al., 2002).

Além disso, existem evidências, cada vez maiores, da participação de PDGFs e de seus respectivos receptores como outros fatores contribuintes para o caráter transformado e invasivo dos gliomas (Maher et al., 2001; Ostman, 2004). Existem pelo menos quatro genes que codificam para os ligantes de PDGF (PDGFs A – D), e pelo menos dois genes que codificam para as cadeias polipeptídicas α e β correspondentes aos receptores de PDGF (PDGFRA e PDGFRB) (Claesson-Welsh, 1994; Fredriksson et al., 2004; Heldin & Westermark, 1990; Heldin & Westermark, 1999). A expressão de pelo menos algumas das cadeias de PDGF pode ser detectada na maioria das linhagens e amostras clínicas de glioma, enquanto a cadeia α do receptor de PDGF (PDGFRA) é expressa em virtualmente todas as linhagens de glioma humano e culturas primárias de glioma. A cadeia β do receptor de PDGF (PDGFRB) é expressa frequentemente em gliomas e, também, nas células endoteliais presentes no cérebro (Fredriksson et al., 2004; Kesari et al., 2005; Ostman, 2004). Estas observações são compatíveis com a existência de alças autócrinas envolvendo PDGF, numa proporção significativa dos glioblastomas (Fleming et al., 1992a; Lokker et al., 2002; Maxwell et al., 1990; Ostman, 2004). Modelos experimentais de gliomagenese ortotópica permitiram verificar, *in vivo*, a inibição do crescimento de linhagens de glioblastoma humano, tanto pelo tratamento com inibidores do receptor de PDGF (Kilic et al., 2000), quanto pela super-expressão de construções do tipo dominante negativo (Kaetzel et al., 1998; Shamah et al., 1993; Vassbotn et al., 1993) indicando, portanto, que esta via tem potencial para se tornar um novo alvo terapêutico para gliomas. No caso particular de EGF e PDGF, as observações recorrentes do envolvimento destes fatores em gliomas, recentemente levaram ao desenvolvimento e teste dos primeiros candidatos a “smart drugs” para gliomas humanos, denominação coloquial para as novas gerações de fármacos anti-tumorais direcionados contra defeitos moleculares específicos de cada

tipo de tumor. Neste contexto, encontra-se em teste, atualmente, fármacos inibidores de PDGFR (Imatinib, Gleevec®) ou de EGFR (Gefitinib, Iressa® e Erlotinib, Tarceva®), os quais têm apresentado resultados preliminares bastante satisfatórios para tumores que são, até o presente momento, incuráveis (Kesari et al., 2005).

Existem indícios da participação, através de diferentes mecanismos, de vários outros fatores de crescimento peptídicos na patogênese de gliomas. Alguns trabalhos têm indicado, por exemplo, que fator de crescimento para hepatócitos (HGF), é capaz de estimular o crescimento, angiogênese, invasão e tumorigenicidade de gliomas humanos, além de estar, potencialmente, envolvido na formação de alças autócrinas estimulatórias (Koochekpour et al., 1997; Moriyama et al., 1995; Rosen et al., 1996; Uchinokura et al., 2006; Walter et al., 2002). A inibição da via de HGF, em linhagens de glioma humano, promove inibição de crescimento, redução e tumorigenicidade e, também, radiosensibilização de tumores experimentais (Brockmann et al., 2003a; Cao et al., 2001; Lal et al., 2005). Além disso, já é sabido que os FGFs 1 e 2 são expressos em várias amostras de gliomas humanos (Maxwell et al., 1991; Paulus et al., 1990; Stefanik et al., 1991a; Stefanik et al., 1991b). Em alguns modelos *in vivo* de glioma, a inibição da atividade de receptores de FGF farmacologicamente ou através da superexpressão de dominantes negativos inibiu o crescimento de tumores experimentais humanos (Aoki et al., 2002; Auguste et al., 2001; Kono et al., 2003; Miraux et al., 2004).

Além disso, o fator de crescimento pleiotrofina (PTN), e seus respectivos receptores (ALK e PTPRZ1), têm adquirido uma importância cada vez maior no entendimento da biologia dos gliomas. Este fator de crescimento, que desempenha papéis essenciais no desenvolvimento do sistema nervoso central (Jung et al., 2004; Kovesdi et al., 1990; Silos-Santiago et al., 1996; Wanaka et al., 1993), está, frequentemente, superexpresso em amostras clínicas de gliomas e linhagens celulares estabelecidas (Grzelinski et al., 2005; Mentlein & Held-Feindt, 2002; Ulbricht et al., 2003; Zhang et al., 2004). Da mesma maneira, os genes ALK e PTPRZ1, que codificam, respectivamente, para uma tirosina quinase e uma tirosina fosfatase de membrana, também estão expressos em níveis elevados em tecido gliomatoso e/ou linhagens de glioma humano (Dirks et al., 2002; Lu et al., 2005; Stoica et al., 2002; Ulbricht et al., 2003). Alguns trabalhos funcionais indicaram que a expressão destes genes é limitante para a proliferação e migração de células de glioma (Grzelinski et al., 2005; Muller et al., 2003; Powers et al., 2002). Vale lembrar, contudo, que tanto os fatores de crescimento classicamente relacionados com glioma (como EGF e PGDF), como estes outros fatores de crescimento cuja

importância em gliomas ainda não é tão consolidada, possuem, também, intensa atividade angiogênica (Bian et al., 2000). Como o desenvolvimento dos gliomas depende, em grande parte, da formação de novos vasos, é possível que o papel destes fatores esteja ligado, inclusive, à formação de vasos que promovem o crescimento do tumor ou, ainda, do estroma que suporta a proliferação das células tumorais (Mentlein & Held-Feindt, 2003; Ostman, 2004).

1.3. O modelo celular C6/ST1/P7 de reversão fenotípica tumoral/normal

A linhagem C6 de glioma de rato foi estabelecida a partir de um tumor cerebral induzido quimicamente por etilnitrosouréia (Benda et al., 1968). Após passagens alternadas *in vitro* e *in vivo* da cultura primária derivada do tumor primário, várias linhagens clonais foram selecionadas, e o clone C6, de onde se originou a linhagem, era o que expressava maiores quantidades de proteína S100 que, na época, foi utilizada como um marcador de células gliais (Benda et al., 1968). Por alguns anos, esta linhagem de rato foi uma das poucas opções disponíveis de células gliais em cultura, tendo sido intensamente utilizada como modelo experimental para neurociências, proliferação celular e tumorigênese (Baraldi et al., 1979; Barth, 1998; Cretu et al., 2005; Garberg et al., 2005; Goncharov et al., 2005; Goya, 1997; Grobben et al., 2002; Guidotti et al., 1979; Isenberg et al., 1992; Kempfski et al., 1983).

Enquanto modelo de diferenciação e proliferação celular, a linhagem C6 apresenta inibição de crescimento em resposta ao tratamento com uma variedade de agentes diferenciadores, tais como glicocorticóides (Armelin & Armelin, 1983; Armelin et al., 1983; Grasso et al., 1981), ácido retinóico (Fischer et al., 1987), 1,25-dihidroxivitamina D3 (Baudet et al., 1996a; Baudet et al., 1996b), e dibutiril-AMP cíclico (Braunewell & Gundelfinger, 1997), dentre outros. Além disso, a linhagem C6 leva à formação de tumores similares aos glioblastomas humanos quando injetada no cérebro de ratos neonatos (Auer et al., 1981), e tem sido utilizada extensivamente como um modelo experimental de glioblastoma *in vivo* (Grobben et al., 2002).

Apesar desta linhagem ser de origem clonal, já é conhecido que as sucessivas passagens em cultura leva a uma mudança progressiva de fenótipo e a uma heterogeneidade crescente (Goya et al., 1996; Gubits et al., 1992; Kazazoglou et al., 1996; Lee et al., 1992; Mallorga et al., 1981). Com o objetivo de estudar a

parada de crescimento induzida por glicocorticóides nesta linhagem, foram isoladas, pelo grupo da Dra. Mari Sogayar, linhagens clonais variantes a partir da linhagem C6. Deste isolamento, originaram-se as linhagens tumorais ST1 e P7 (Armelin & Armelin, 1983; Armelin et al., 1983). A linhagem ST1 é hipersensível ao tratamento com glicocorticóides, apresentando uma dramática reversão do fenótipo transformado e tumorigênico, a julgar pela aquisição de morfologia achatada e fusiforme e aumento da aderência, forte inibição do crescimento em substratos sólido e semi-sólido *in vitro* assim como inibição do caráter tumorigênico *in vivo*, quando injetada s.c. em camundongos imunossuprimidos do tipo *nude*. A linhagem P7 é completamente refratária a este tratamento, mantendo suas características de transformação e caráter tumorigênico inalteradas pelo tratamento com glicocorticóides (GC).

A investigação dos mecanismos moleculares associados à reversão fenotípica induzida por GC na linhagem ST1, permitiu verificar, até o momento, a repressão da ligação de NF- κ B à sua respectiva seqüência-consenso (Carvalho, 2002), assim como a indução da expressão de componentes do complexo SWI/SNF de remodelamento de cromatina (Ortis, 2002).

Paralelamente, diversas metodologias de isolamento de genes diferencialmente expressos foram utilizadas por nosso laboratório, visando desvendar novos alvos da ação anti-tumoral de glicocorticóides na linhagem ST1. Foi possível identificar, utilizando hibridização diferencial, os genes correspondentes às metalotioneínas 1 e 2 de rato, o gene *Orosomucoid 1* e a seqüência de *env* de retrovírus endógeno de rato como sendo diferencialmente induzidos pelo tratamento da linhagem ST1 com GC (Valentini, 1993; Valentini & Armelin, 1996). Estes mesmos genes foram novamente identificados quando se utilizou “Differential Display” para a identificação de genes diferencialmente expressos (Sasahara, 1995). Por outro lado, utilizando hibridização subtrativa acoplada a PCR supressivo, foi possível identificar e confirmar, na linhagem ST1, um conjunto de sete novos genes induzidos por GC, os quais não se conhecia, até o momento, como sendo regulados por glicocorticóides (Vedoy & Sogayar, 2002).

Por fim, num esforço paralelo utilizando a linhagem ST1, (Bengtson, 2002) deu início à busca dos alvos moleculares associados à reversão fenotípica induzida por ácido retinóico todo-*trans* (ATRA), através de diferentes tecnologias de construção de bibliotecas subtraídas de cDNA. Neste trabalho, foi possível identificar 11 genes diferencialmente induzidos por ATRA, sendo que alguns deles correspondiam, na época, a genes ainda desconhecidos em todos os organismos.

Interessantemente, neste trabalho de Doutorado, um destes genes regulados por ATRA, além de ser diferencialmente expresso entre as linhagens ST1 e P7, foi, também, confirmado como sendo induzido por GC na linhagem ST1, sugerindo que as vias ativadas por GC e ATRA durante a reversão fenotípica da linhagem ST1 possuem pelo menos algum grau de sobreposição.

O objetivo deste trabalho foi comparar os perfis de expressão gênica entre as linhagens ST1 e P7, na busca das bases moleculares relacionadas aos diferentes fenótipos apresentados por estas células. Além da responsividade a glicocorticóides, foi possível verificar que as duas linhagens diferem uma da outra, inclusive, em potencial tumorigênico. Este estudo comparativo de expressão gênica levou à identificação de vários genes mais expressos na linhagem P7, que apresenta maior caráter tumorigênico. A partir destes resultados obtidos com linhagens de glioma de rato, foi possível verificar que alguns destes genes estão super-expressos em gliomas humanos e, além disso, foi também possível obter incursões sobre possíveis novas interações regulatórias entre genes conhecidamente envolvidos com a patogênese de gliomas humanos. O aprofundamento destes e de outros achados acumulados em nosso grupo, ao longo destes anos de busca dos mecanismos moleculares relacionados à ação de agentes anti-tumorais, pode, num futuro breve, vir a revelar novos alvos potenciais para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para os gliomas humanos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato e, a partir destes, extrair informações relevantes para melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão de gliomas humanos, visando identificar novos alvos moleculares para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato, através da hibridização de “macro” e “microarrays” de DNA;
- Confirmar a expressão diferencial destes genes nas linhagens ST1 e P7 de glioma de rato através de diferentes metodologias;
- Analisar a expressão destes mesmos genes em linhagens de glioma humano e, também, em amostras clínicas de gliomas humanos;
- Analisar o potencial tumorigênico *in vivo* de linhagens humanas de glioma e de rato;
- Identificar e clonar novos genes humanos codificantes para helicases de DNA e analisar a expressão destes genes em linhagens de glioma humano e de rato, e em amostras clínicas de gliomas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Linhagens celulares

- P7: clone derivado da linhagem ST1 de glioma de rato, resistente ao tratamento com hormônio glicocorticóide, obtida em nosso laboratório (Armelin & Armelin, 1983; Armelin et al., 1983).
- ST1: clone derivado da linhagem C6 de glioma de rato, hipersensível ao tratamento com hormônio glicocorticóide, obtida em nosso laboratório (Armelin & Armelin, 1983; Armelin et al., 1983).
- T98G: linhagem de glioblastoma multiforme humano, com crescimento independente de ancoragem e incapaz de formar tumores *in vivo* quando injetados em dorso de camundongos 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 sub-cutaneamente no dorso de camundongos imunodeprimidos do tipo *nude* (astrocitoma anaplásico) (Ponten & Macintyre, 1968).

3.1.2. Soluções e meios de cultura para células de mamífero

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza para Biologia Molecular para análise, seguindo formulações descritas em manuais de laboratório (Ausubel et al., 1998; Sambrook & Russel, 2001).

- Gel de agarose: agarose 0,5 a 2,0%, dependendo da aplicação; TAE 0,5x.
- SSC 20x: NaCl 3 M; citrato trissódico dihidratado 300 mM; pH 7,0.

- Solução de cloreto de cério: cloreto de cério 5,7 M; acetato de sódio 25 mM; pH 5,0.
- Solução I para lavagem de membrana de Northern blot: SSC 2×; SDS 0,1%.
- Solução II para lavagem de membrana de Northern blot: SSC 0,1×; SDS 0,1%.
- Tampão de amostra para DNA: formamida deionizada 98%; EDTA 10 mM; xileno cianol 0,025%; azul de bromofenol 0,025%.
- Tampão de lise para extração de RNA: isotiocianato de guanidina 4M; citrato de sódio 25 mM pH 7,0; β -mercaptoetanol 0,1 M.
- TE: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0.
- Meio de cultura: DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium" - Gibco BRL - Life Technologies)
- Soro fetal bovino (SFB): (Cultilab Materiais para Cultura de Células, Campinas, São Paulo)
- PBS-A ("Phosphate Buffered Saline") - Solução salina tamponada sem cálcio ou magnésio, pH 7,2, composta por 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 .
- Solução de Tripsina: (ICN Pharmaceuticals Inc.; Gibco Limited)
-

3.1.3. Isótopo radioativo

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

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura e manutenção dos estoques celulares

As linhagens celulares utilizadas foram subcultivadas em frascos plásticos de cultura, em meio DMEM, contendo 5 a 10% de soro fetal bovino (SFB). O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica através de incubação em estufa a 37°C com atmosfera de 2% CO_2 . Estoques celulares foram congelados na presença de 10% DMSO e mantidos em nitrogênio líquido.

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

As linhagens celulares foram subcultivadas e tratadas sob diferentes condições (tratadas ou não com GC e/ou soro) em placas P150, a uma densidade da ordem de 10^5 células/cm². Para a lise das células, o meio de cultura foi descartado, a monocamada de células aderida foi lavada com PBS-A, drenadas e lisadas com solução de 4 M de tiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sódio (pH 7,0) e 0,1 M de β -mercaptoetanol. Os lisados foram transferidos para tubos de polialômero contendo solução de 5,7M de cloreto de cézio e 25 mM de acetato de sódio (pH 5,0) e centrifugados a $130.000\times g$, a 20°C por 17h, em rotor SW 50.1 (Beckman Instruments). O RNA, sedimentado no fundo dos tubos, foi ressuspenso em água estéril e a concentração do RNA foi determinada pela absorbância das preparações a 260 nm, 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 a 2,0 para ácidos nucleicos. Tipicamente, o rendimento de RNA total obtido através desta técnica para linhagens celulares é de 5–12 μg RNA total/ 10^6 células, enquanto para tecidos o rendimento é da ordem de 1–8 μg RNA total/mg de tecido (Ausubel et al., 1988).

3.2.3. Northern Blot

3.2.3.1. Fracionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído (Thomas, 1980), e transferência para membrana de nylon.

Alíquotas de 20 μg das diferentes preparações de RNA total foram desnaturadas a 65°C por 15 min em solução de 2,2 M formaldeído e 50% de formamida, para impedir a formação de estruturas secundárias. Após a adição de tampão de amostra, as amostras de RNA foram fracionadas através de eletroforese em gel de 1% de agarose, 2,2 M de formaldeído, em tampão MOPS 1 $\times$. Após a corrida, o gel foi lavado por pelo menos 4 vezes de 10 min cada, com água, para a remoção do excesso de formaldeído, e corado com solução de brometo de etídeo para observação sob luz ultravioleta. A seguir, os RNAs foram transferidos para membranas de nylon em SSC ou SSPE 10 $\times$. Após a transferência, os RNAs foram fixados à membrana através de incubação a 80°C por 2h.

3.2.3.2. Marcação de sonda radioativa

A marcação radioativa da sonda foi realizada utilizando o kit “Ready-To-Go DNA Labeling Beads (-dCTP)” (Amersham Biosciences), por reação de “random-primer extension” (Feinberg & Vogelstein, 1984).

Neste kit, aproximadamente 45 µL de solução contendo 50 ng do fragmento de DNA a ser marcado foram desnaturados e usados para ressupender as “beads”. Estas “beads” contêm todos os componentes necessários para a reação de marcação (nucleotídeos, “random primers”, Klenow e tampão), menos o nucleotídeo marcado com ^{32}P , o qual é adicionado em seguida. Durante a incubação a 37°C os oligonucleotídeos anelam em sítios randômicos no DNA, permitindo que a enzima Klenow sintetize as fitas complementares, incorporando o nucleotídeo marcado durante o processo.

Alternativamente, a marcação da sonda radioativa foi realizada através de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para a sequência a ser marcada ou para o plasmídeo onde a mesma se encontrava clonada, e dCTP marcado radioativamente com ^{32}P . A seguir, as sondas foram então purificadas dos nucleotídeos livres em colunas “MicroSpin” S-300 ou GFX (Amersham Biosciences).

3.2.3.3. Hibridização e lavagem dos filtros

Os filtros foram pré-hibridizados (SSPE 5×, 50% de formamida, Denhardt 5×, 0,1% de SDS e 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado) a 42°C por 1 – 4h. A seguir, os filtros foram hibridizados a 42°C por 16 h (a mistura de hibridização consiste da mistura de pré-hibridização acrescida de 5% de sulfato de dextrana e da sonda radioativa desnaturada). Após a hibridização, os filtros foram lavados 2 vezes em SSC 2×/SDS 0,1 %, à temperatura ambiente, e 4 vezes em SSC 0,1×/SDS 0,1%, a 56°C por 30 min.

3.2.3.4. Revelação por “phosphorimaging”

Os filtros foram envoltos em filme plástico e utilizados para exposição, por diferentes períodos de tempo, de telas para “phosphorimaging”. O princípio desta técnica é que as emissões radioativas são capazes de impressionar telas que contêm sais de európio, que passam para um estado quântico mais excitado. O

equipamento Storm[®] (Molecular Dynamics), tem a capacidade de adquirir imagens das telas PhosphorImager fazendo a varredura das telas com um feixe de laser que promove o decaimento destes íons para um nível de energia mais baixo, quando então um fóton de energia é liberado e captado pelo equipamento. A partir da varredura dos sinais por toda a tela, o programa que acompanha o equipamento gera uma imagem, sendo que a intensidade do sinal em áreas delimitadas da imagem podem ser quantificadas através do programa ImageMaster[®] (Amersham Biosciences).

3.2.4. Quantificação de expressão gênica por “Real Time RT-PCR” (Q-PCR)

A avaliação da expressão de genes de interesse para o presente trabalho foi realizada através de reação de “Real Time-PCR”, utilizando-se o reagente SYBR Green Dye (Applied Biosystems). Esta substância possui afinidade pela “minor groove” da dupla fita de DNA que, sob excitação adequada, emite fluorescência no comprimento de onda de 520 nm. Quando não está ligado ao DNA, esta fluorescência é fraca, mas quando o fluoróforo liga-se à dupla fita de DNA, a intensidade aumenta cerca de 100 vezes, permitindo a detecção do produto formado na reação de PCR em tempo real.

3.2.4.1. Desenho dos oligonucleotídeos para Real Time-PCR

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de Real Time-PCR foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Rozen & Skaletsky, 2000). As principais características destes oligos são: a) amplificação de um fragmento cujo tamanho máximo não exceda 150 pares de base, idealmente em torno de 100 pares de base; b) quantidade moderada de GC, entre 40 e 60%; c) sequência de nucleotídeos que não favoreça o anelamento entre os dois oligonucleotídeos ou a formação de estruturas secundárias; d) temperatura de anelamento entre 58 e 60°C, de acordo com o algoritmo *nearest neighbor* (Breslauer et al., 1986); e) serem complementares a sequências do cDNA codificadas por exons diferentes do transcrito, de forma a evitar eventual contaminação com DNA genômico; f) amplificarem, preferencialmente, a isoforma canônica conhecida para o gene em questão, e que

Gene	Humano		Rato	
	Forward	Reverse	Forward	Reverse
AKT1	AGGCCAAGTCCTTGCCTTCAG	GATGCTGCATGATCTCCTTGG	GCTGCTCAAGGAAGCAACCTACA	CTCATACACATCTGCCACACGA
ALK	TCAAGTCCTTCTCCGAGAGAC	TACTGACAGCCACAGGCAATGT	TGGTGGAGACCTCAAGTCCTTC	GTACTGACAGCCACAGGCAATG
CDKN1A (p21)	GAGACTCTCAGGGTCGAAAAAG	GGATTAGGSCCTCCTTTGGAG	GGAGGCAGACCCAGCTAACAG	CCTGACCCACAGCAGAAAG
CDKN2A (INK4A-p14ARF)	GCTACTGAGGAGCCAGCGTCTA	CGCTGCCATCATCATGAC	GGTGTGAGGCCAGAGAGGAT	AGAGCAGGAGAGCTGCCACTT
CDKN2A (INK4A-p16)	CAACGCCACGAATAGTTACGGT	CGCTGCCATCATCATGAC	CCCGAACACTTTCGTCGTAC	AGAGCAGGAGAGCTGCCACTT
CHD7	TGTGTAGGCGAGTATGTCGAATG	CCTCTGTGATCGGCTCAATTATG	CTCAGCTCCTTCACGAAAGGAC	GGCCATTTCGCTTTTCAGTACAG
CHD8	TGAGGCAGGAGGTATTGGAGAC	CAGTGTATCCACTACTGGGAACC	GTGGCCATGTGTAGCTGAGCTGTG	AGTCCGTGATGCTCTCTCTTCAG
CHD9	AGTAGCTCCTGAATGGGAGATG	CACAACGGGACAGGTGAGAATAC	CCGAAACCCGACAACTAGAC	TTCAGAGGAGGACAAATGCAC
EGFR	TGCAGCGATACAGCTCAGACCC	TTTGGGAACGAGCTGGTTTATG	-	-
ERBB3	GGCTATGAGGCGATCTTGAAC	TGGCCAAAGCTTTGTTAGCCTTC	GGGCTATGAGAGCTACTTGGAG	GCCAAAGCTTTGTTGCTTCTC
FANCM	CATCTGTGAAAAGGATGGCTAACAG	TCTCCTCAGCCTTCTGATGATTAC	GTCCGTGAGAAACATACAGCATG	GCTTCGGCAAGACTCTTCTTCAG
FGF1 (aFGF)	AGCGAGTGTGGAGAGGATACAG	AAGGTGGTGAATTTCCCTTCAG	TTCTTGAGGATTTCTCCCGATG	TTTCGCGACTGAGCTGCAG
FGF2 (bFGF)	GGAAAGATGGAAGATTACTGGCTTCT	CCACATCAACACTGGTATTTCTCT	CCTGGCTATGAAGGAGATGGAC	GGAGTATTTCCGTGACCCGGTAAG
FGFR1	TGAAGATGATCGGGAAGCAATAAG	GAGGCATATCCACGATGACATAC	TCTGGTGTCTTGTGCTATCAG	ACATTCTAGCAGCCAGGTCTC
FGFR3	GGCCTTGTGTTGACCGAGTCTAC	CAGCGTGAAGATCTCCACAGAG	AGGATCTGGTGTCTGTGCTTAC	CTCCAGTCAACGACAGCTTTC
GADD45B	TACGAGTCGGCAAGTTGATG	TCTCTCTCTCTCTGTCATG	GAGGCGGCAAACTGATGAAT	CGATTGGATCAGGGTGAAGTGA
HPRT1	TTGTTGTAGGATATGCCCTTGACT	CTCAACTTGAACCTCTCATCTTGGCTTGT	GGCCTTGACTATAATGAGCACTTCAAG	GTAGATTCAACTTGGCCGTGTCTT
MDK	CCTGCAACTGGAAGAGGAGTT	GCACCCAGTGTCTCAAACTGT	GCAGCACCAGGAATTTCTTCT	GAACACTCGCTGCCCTTCTTC
MGST1	-	-	CCAAGAGTTTCTCTCGAGCTGA	GATACCCGAGAAAGGAGCATGT
MLP1	AGCCAGAGCTCCAAGGCTC	CTTCACCTTGGGGGATAAGTC	CAGCCAGAGCTCCAAGGCT	TAAGTCTCCATTGCTTTTCACGTG
NFKBIA (IkB α)	-	-	AGCTCAGCGGAGGACGAGACT	TCTCCCTTCACCTGACCAATCACT
NP1 (p8)	GCACGAGAGGAAACTGGTGAC	TGGGTGTAGTGTCATGGTCTG	AAGTCTGCTGACCAAGTCCAGA	CCAAGGTCTGTATCCATTGCT
OTX1	CAACCTGCCGAGTCTAGAGTC	GGAGAGGACTTCTTCTGGCTG	AACTGCGCCGAGTCCAGAGT	CCGAGACGAGACTTCTCTTGAC
PDGFA	GCAGTCAGATCCACAGCATCC	CTGGTGTCCAAAGATCTCACTC	ACTGGCTGCAAGTCAGATCCAC	CATGGGCTCTCAGGTTTGTCTC
PDGFB	ACAAGACGGCACTGAAGGAGAC	ATGGGGCAATACAGCAAAATAC	TGAAGGAGATCCCTGGAGCCTAG	GGGAACAACATTATCACTCCAAGG
PDGFC	TGGGGAACCTGTGCTGTTGTC	GACACCGGCTTTGGTCTCAAC	AATGTGAGTGTGCCACGTAAAG	AGCGACTTATGCAATCCCTTGAC
PDGFD	TCGGTATCGAGGACGTCATAC	GACCCAGTAACTCTGGGAGTG	AACTCTCAACTGGAGTCTCTGCAC	TCAAGGCGGTATTGAGGTCAC
PDGFRA	GTGATGTCTGGTCTTATGCAATC	CGGTACCCACTCTGATCTATTG	CCTCTACACCCAGCTGAGTGAC	ATCAACCATCATGCCAGGGTAG
PDGFRB	ATCATCGGGAGCTCGAATTAC	GGTGGTGTAGAGGCTGTTGAAG	AGACATCATGCGGAGCTCAAAAC	CAAGGTGGTGTAGAGGCTGTTG
PTEN	ACAAAGCCAAACGATATTTTCTC	GAACTGCTAGCCTCTGGATTTGAC	AACTGCTAGCCTCTGGATTTGATG	AAAGACAAGGCAACCGATCTTC
PTN	TCTACTCTGCGACGTTGGATAC	GCCATTCTCCACAGTCAAGCTTC	CCTTGCAACTGGAAGAACGAG	TCAAGGCGGTATTGAGGTCAC
PTPRZ1	AATCTGATGAGGCCAGAGTCT	GTCCAGAGAGGTGGATGATTC	ACAGCAGATTCAACGAGGAAC	GTGCTGAATGAAGCATTGCTC
RB1	AATCCCTTGCATGGCTCTCA	ACAAGCAGATTCAAGGTGATCAGT	GATGTGAGCATCGAATCATGGA	CCCATCTTGGACTGCTTTATG
RELN	ACCAAGCCTCTGGATCTCACTC	ACTGTTGCAGCTGTCCGTCTG	CGCTCTACTTCAATGGCTGTCA	CGCAGCAAAACCTCTTTCATC
RHOB	-	-	CAACTGCTGCAAGGTGCTATGAA	GGTCTCCCTTTCTCCCGTTAGT
RNF130	GGGAGCTCACTCCGAGAAGAG	GCAGAGTGTGAGGCGACTGAG	GCTACATGATCATCAGAGCCACAG	CCTTCAAGGCAATCAGTCAAGAAAG
RNF144	ATGATGTGCAAGAACTGCAAGC	GCAGGTCCTCTTATCGTAGTGTATC	CTGCTGGTACTGCTGGAGCTCT	CATGGACACAAGCAGAAAGTGACA
ROBO1	GAAATGCAGGTACTTGGAGGATATG	TCATAAGCCTCTTGGTGTCTTCAG	GGGGGATTTGAAAGAGGAGATG	ATGGGACTCATAGCCCTCTCTG
SCG2	AACGGGGAGGAATATGCTGTG	AAGCCAGTGGGTCTTGTCTTC	CAGAGAGGAGCATGCTTGGAG	GCTCCAAATCGGTAAAGCCTC
SDC4	TACTTCTCCGGAGCCCTACCAAG	CCGATCATGGAGTCTTCCAAAGT	GGACCTTCCCTGAGGTGATTTCT	CTCTTCCAGTTCTCTGGGCTCT
SMARCA2 (BRM - extrem. 3')	AACTGTAGTGAGGCAATTTTGACA	GAGGAAGGAATTCAGTCTACCAA	CGATGAGGAGCGAGTGAAGAC	GAAAGCATTCGGTTTGGCT
SMARCA2 (BRM - full length)	GAGCTGGTGGCTTGGGCTTA	AGGATCTTTTCTCCACGCTGTTC	AGATCGTGGCTGCTTGTGTAAG	GGGAGAACTTTTCTCCCAACACTG
SMARCA2 (BRM - Tr. Alt.)	ATAGCCGGCTGCTGATAGTG	GCTTCTTAAGCCGCTACTTCTCTCTC	TAGCCGGTCTGCTGATAGTGGTAAG	CTTCTCAGCCGCTACCTCCTCTTC
SMARCA4 (BRG-1)	AGGGGCTCGGGGTCGAGACTG	AGCCGGTCTGTGAGTGAGCATGA	AAGCCTGTGCTGAGTGACGAT	CCCATCACTGCTAAGGGTTACT
SMARCC2 (BAF170)	TTGGAGATCAAACTTCGGCACT	CAGGAGCTGCTGCTCTGATAC	ACAGCAGCCACAACAAGCTG	AGGAGTTTGTGTTGGGGAAAC
SMARCD1 (BAF60A)	GCTAGATATCCAAGAGGCTTGAAC	CTGACTTAGCCGGATGAAAGTG	CTATGGCCACAGCAACCTCTG	CAGGACAGTGCAACGCTCATTC
SMARCD2 (BAF60B)	TCTGGCTCTACCAACCAATCAG	GTCTTCAAGCTGGTTGATGGACTC	GGGACTTCACTGCTCAGCTTCAG	CCTCAGGGTTTCCAATCACATC
STAT1	AGTTGGCAGTTTCTCTGTCAAC	ACCTCGTCCACGGAATGAGAC	TCAGTCACCAAGAGAGGTCTCAAC	CCTTGCCATGGAATAAGACCATC
STAT3	GTTGCTGGTCAAAATCCCTGAG	GATCCTCTGAGAGGTGCAACG	GCCCTTAGTCAATCAAGCTGGT	GCAACATCCCAAGAGTCTTATC
STAT5B	GGCTCACTATAACATGTACCCACAGA	TACGTCCATTGTGCTCTCCAGAT	TGTGCGCTCAGGCTCACTATAAC	CGTGTCTCCAGATCGAAATCC
TGFB3	CAGCTCTAAGCGGAATGAGCAG	TATAGCGCTGTTTGGCAATGTG	AGAGTGGCTGTCTCTGATGTC	CTCCATTGGGCTGAAAGGTATG
TP53 (p53)	GGCCATCTACAAGCAGTCACAG	TCCACTCGGATAAGATGCTGAG	CTACCAACCCATTCCCAATC	CAAGACAATGCTAGTCCCTCACTG

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para Q-PCR. Sequências de todos os oligonucleotídeos utilizados para quantificação de expressão gênica por Q-PCR, tanto para genes de rato quanto humanos. As sequências estão apresentadas na direção 5' $\Rightarrow$ 3'. Os amplicons gerados têm um tamanho médio de 100 bp, foram desenhados em exons diferentes para evitar co-amplificação a partir de DNA genômico contaminante e, quando possível, numa região que permitisse amplificação preferencial da isoforma canônica de mRNA conhecida para o gene em questão.

leva à codificação da isoforma de proteína cuja estrutura e função já é conhecida ou descrita. A sequência dos oligonucleotídeos utilizados para Q-PCR neste trabalho está descrita na Tabela 1.

3.2.4.2. Síntese de cDNA

Aproximadamente 3,0 µg de RNA total foi utilizado como molde para a transcrição reversa. Após o anelamento dos oligonucleotídeos – oligo-dT ou “random primers”, a síntese de cDNA foi realizada por 2h a 42°C, utilizando a enzima transcriptase reversa SuperScript III® (Invitrogen). Para a quantificação da expressão gênica através de “Real Time-PCR”, as amostras foram diluídas 50 vezes com água livre de nucleases.

3.2.4.3 Reações de amplificação por Q-PCR

As reações de “Real-time PCR” foram realizadas utilizando-se a tecnologia SYBR Green, em aparelho ABI Prism 5700 (Applied Biosystems). Cada reação foi feita em duplicata, em um poço de uma placa óptica de 96 poços específica para Q-PCR, em volume final de 12 µl, contendo 6 µl de “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) e concentração padrão de 800 nM de oligonucleotídeos (conquanto não houvesse formação de “primer dimers” no controle negativo). Foram realizados controles de amplificação na ausência de “template” NTC, “Non Template Control”). Em cada reação, foram utilizados 3 µl do cDNA sintetizado anteriormente, 3 µl do mix de oligonucleotídeos “forward” e “reverse” (4 vezes concentrado em relação à concentração final de reação) e 6µl do Master Mix PCR (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada utilizando-SE as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 63°C por 60 segundos (anelamento dos oligonucleotídeos e extensão).

3.2.4.4. Cálculo e quantificação de expressão gênica

A análise dos dados foi realizada através da quantificação relativa da expressão gênica em relação a uma amostra calibradora, através do “Método de CT comparativo”, em que os níveis de expressão relativa são calculados a partir da

fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). O ponto de corte ("*threshold*") de 0,1 foi definido manualmente, para determinação do CT de cada reação. A especificidade do sinal obtido foi confirmada através da análise das curvas de dissociação do produto amplificado. A normalização foi realizada através da quantificação do controle interno HPRT1.

3.2.4.5 Amostras Clínicas

Amostras de tecido cerebral humano foram obtidas através de colaboração com o grupo liderado pela Profa. Dra. Suely Marie, da Faculdade de Medicina da USP. As mesmas foram coletadas mediante consentimento informado dos pacientes, após aprovação do Protocolo de Pesquisa no. 830/01 pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde (parecer 373/02). Os dados dos pacientes referentes às amostras clínicas utilizadas constam na Tabela 2. Para a extração de RNA, Fragmentos de tecido, obtidos através de ressecção cirúrgica de gliomas, foram coletados durante a cirurgia e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para preservação da integridade do RNA. Estes fragmentos foram descongelados na presença de *RNA Later*[®] (Ambion Inc., EUA), de acordo com instruções do fabricante, visando inativar as RNases endógenas que podem degradar o RNA durante o processo de extração. Os fragmentos de tecido utilizados para extração de RNA passaram por avaliação anátomo-patológica e microdissecção, sendo que apenas fragmentos contendo 90% ou mais de células tumorais foram utilizados para a extração de RNA.

A seguir, os fragmentos foram macerados em gral de porcelana na presença de nitrogênio líquido e de solução de lise com tiocianato de guanidina e β -mercaptoetanol. A partir da obtenção de um lisado de tecido, o lisado foi clarificado por centrifugação a 18.000×g por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, o RNA foi purificado por ultracentrifugação em colchão de cloreto de cério, de acordo como descrito no item 3.2.2. O RNA total purificado foi utilizado para síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa, diluído e utilizado como "template" para Q-PCR conforme descrito acima.

3.2.4.6. Análises estatísticas

Os testes utilizados para avaliar a significância estatística entre grupos de dados diferentes estão indicados junto aos resultados. Para a maioria dos testes,

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Grau astrocitoma	Sobrevida (meses)
332	F	23	Normal	-
337	M	41	Normal	-
349	M	41	Normal	-
368	M	30	Normal	-
400	M	45	Normal	-
411	F	37	Normal	-
462	F	51	Normal	-
473	F	ND	Normal	-
579	F	ND	Normal	-
646	M	ND	Normal	-
654	F	ND	Normal	-
692	F	ND	Normal	-
693	F	ND	Normal	-
35	M	53	4	45
74	M	75	4	17
89	F	49	4	38
170	M	50	4	8
208	M	63	4	6
256	M	42	4	3
269	F	65	4	0
297	F	79	4	11
317	F	72	4	3
356	M	74	4	12
370	M	45	4	12
380	M	62	4	ND
384	M	45	4	5
391	F	54	4	13
397	F	59	4	5
435	M	35	4	12
440	M	76	4	ND
442	M	69	4	4
450	F	62	4	ND
487	M	69	4	ND
28	M	53	3	ND
34	M	18	3	ND
73	F	24	3	ND
106	M	68	3	7
233	F	58	3	1
338	F	37	3	14
360	F	32	3	ND
428	M	22	3	23
451	M	34	3	ND
478	M	36	3	20
514	M	37	3	ND
101	F	24	2	ND
250	F	31	2	13
341	M	29	2	ND
346	M	23	2	ND
392	F	25	2	ND
452	M	42	2	ND
453	M	29	2	ND
467	F	41	2	ND
490	M	37	2	ND
577	F	35	2	ND
254	F	24	2	ND
352	M	35	1	ND
363	M	13	1	ND
436	M	18	1	ND
495	F	8	1	ND
501	M	32	1	ND
570	F	8	1	ND
594	M	18	1	ND
601	M	21	1	ND
661	F	ND	1	ND

Tabela 2 – Dados clínicos dos pacientes incluídos neste estudo. Identificação, sexo, idade, tipo de tumor e sobrevida dos pacientes dos quais se originaram as amostras clínicas utilizadas neste trabalho. ND = não disponível; F = feminino; M = masculino.

foram considerados valores de $p \leq 0,05$ como sendo estatisticamente significativos. Os cálculos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 3.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

3.2.5. Hibridização do “macroarray” comercial “Atlas Rat Expression Array” com sondas radioativas de cDNA

3.2.5.1. Geração de sondas de cDNA radioativamente marcadas

Foram geradas sondas de cDNA marcadas radioativamente através de transcrição reversa na presença de $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP utilizando-se, como molde, amostras de mRNA derivadas das condições experimentais de interesse. Para tanto, para cada condição foram feitas uma mistura de RNA e uma mistura de marcação. A mistura de RNA se constituiu de:

- mRNA de células tratadas por 5h com 100 ng/mL Hy:	0,5 μg
- mRNA de células tratadas por 24h com 100 ng/mL Hy:	0,5 μg
- Mistura de “primers” para transcrição reversa (10 μM):	2 μL
- H ₂ O q. s. p.:	3,8 μL

A mistura de RNA preparada para cada amostra foi então denaturada em termociclador a 70°C por 2 minutos e, em seguida, a temperatura do termociclador foi ajustada para 50°C. Após incubação por 2 minutos, adicionou-se 7,2 μL da mistura de marcação:

- First Strand Buffer 5×	2 μL
- Mistura de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP) 25 mM	0,2 μL
- $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ (3000 Ci/mmol)	3,5 μL
- DTT 100 mM	0,5 μL
- Transcriptase reversa Superscript II® 200 U/ μL	1 μL

Após a adição da mistura de marcação, a reação foi incubada por aproximadamente 3h e, em seguida, a sonda sintetizada foi purificada para eliminar os nucleotídeos marcados não incorporados através de um kit comercial baseado em colunas de sílica (Qiagen®). Foram feitas duas lavagens adicionais em relação

ao protocolo sugerido pelo fabricante, utilizando-se o tampão apropriado para lavagem da coluna que acompanha o kit. A sonda foi então eluída da coluna, utilizando-se 400 µL de tampão de eluição em ebulição, e prosseguiu-se no protocolo de desnaturação da sonda utilizada. Para tanto, foram adicionados 44 µL de solução desnaturante (1M NaOH, EDTA 10 mM) seguido de incubação a 68°C por 30 minutos. Após este período adicionou-se 100 µL de solução neutralizante (Tris 1M, pH 8,0), seguido de nova incubação a 68°C por mais 30 minutos. Ao término desta incubação, 1/100 do volume total de sonda foi aliquoteado para determinação da intensidade de marcação por cintilação líquida (Cerenkov). A sonda sintetizada e purificada foi mantida a 68°C até o momento da adição às membranas.

3.2.5.2. Pré-hibridização e hibridização das membranas

As membranas foram pré-hibridizadas em garrafas, a 68°C em 5 mL da solução comercial de hibridização (ExpressHyb®, Clontech), em forno de hibridização apropriado durante o período de síntese da sonda radioativa. A esta solução foram adicionadas 500 µg de DNA de espermatozoides de salmão previamente desnaturado. Após a purificação e quantificação da sonda, a mesma foi adicionada à solução de pré-hibridização da membrana. As membranas foram hibridizadas “overnight” a 68°C numa rotação de aproximadamente 5-7 rpm, de acordo com o protocolo do fabricante. No dia seguinte, a solução de hibridização foi adequadamente descartada e as membranas foram lavadas, 3 vezes, com solução de baixa “estringência” (2× SSC, 1% SDS) e 1 vez com solução de alta “estringência” (0,1× SSC, 0,5% SDS), sempre a 68°C e sob rotação constante de 12-15 rpm. Ao término das lavagens, as membranas foram seladas, enquanto úmidas, dentro de sacos plásticos impermeáveis, e expostas a um cassete para “phosphorimaging”.

3.2.5.3. Exposição e revelação das membranas

Após o término do protocolo de lavagem das membranas hibridizadas, as mesmas foram expostas em cassetes para “phosphorimaging” e reveladas após exposição “overnight”, e também após 6 dias. Os cassetes sensibilizados foram revelados com o auxílio de equipamento adequado para “phosphorimaging” (Storm®, Molecular Dynamics), e a análise dos resultados obtidos foi feita em software

adequado para a manipulação destas imagens em ambiente Windows NT (ImageQuant®, Molecular Dynamics). Os cálculos dos resultados obtidos por densitometria foram computados utilizando-se programas de planilhas de dados comuns para microcomputador.

3.2.6. Hibridização dos “microarrays” comerciais Affymetrix®

Neste trabalho, foi utilizado o sistema “Affymetrix GeneChip U34 Rat Genome Set”, que é um conjunto de três “microarrays” que analisam, no total, cerca de 24.000 transcritos, distribuídos ao longo de todo o genoma do rato. O protocolo para a geração das sondas foi feito a partir de RNA total, de acordo com instruções do fabricante, na Microarray Core Facility do Dana-Farber Cancer Institute, Boston, EUA. Sucintamente, 2 µg de RNA total de células ST1 e P7, ambas tratadas por 24h com 100 ng/mL de hidrocortisona em 5% de soro, foram utilizados para a hibridização dos “arrays”. A razão das absorbâncias A_{260}/A_{280} para estes RNAs foi por volta de 2,1, e os mesmos se mostraram intactos quando fracionados em géis desnaturantes de agarose-formaldeído.

Para a síntese das sondas, as amostras de RNA foram processadas separadamente e submetidas à transcrição reversa com um oligonucleotídeo de poli-dT ligado ao promotor da T7 RNA polimerase. Os produtos de síntese da primeira fita foram utilizados como molde para a síntese da segunda fita com um coquetel de enzimas: DNA polimerase I, DNA ligase (ambas de *E. coli*) e RNase H. O cDNA dupla fita sintetizado desta maneira foi utilizado para a síntese de cRNA utilizando-se T7 RNA polimerase, e um nucleotídeo (pseudouridina) biotinilado. A seguir, estes produtos de transcrição *in vitro* foram fragmentados por calor e, em seguida, cada amostra foi hibridizada num “microarray” diferente. Para revelar a hibridização, os “microarrays” foram incubados com estreptavidina (que se liga à biotina das sondas de cRNA) conjugada à ficoeritrina, seguido de incubação com um anticorpo biotinilado anti-estreptavidina, e novamente revelado com estreptavidina conjugada à biotina, com a finalidade de amplificar o sinal. Finalmente, após as lavagens adequadas, os “microarrays” foram “escaneados” com equipamento adequado para geração das imagens finais com o resultado das hibridizações.

As imagens dos “microarrays” hibridizados com RNA correspondente a cada condição experimental foram analisadas através do programa “dCHIP”, um software específico para a análise de imagens provenientes de hibridizações de “arrays”

Affymetrix® desenvolvido por pesquisadores bioestatísticos da Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard (Boston, EUA) (Li & Hung Wong, 2001; Li & Wong, 2001; Schadt et al., 2001).

3.2.7. Amplificação do transcrito completo do gene CHD7 por “Long distance PCR”

Para a amplificação do transcrito completo de CHD7 por LD-PCR, foram feitas reações de PCR de 25 µL contendo, na concentração final: 1× Tuning Buffer® (já contendo 2,5 mM magnésio), 0,5 mM dNTP, 0,5 µM oligonucleotídeos, 0,5 U enzima TripleMaster Taq (Eppendorf), 1 µL de cDNA sintetizado como descrito em 3.2.4.2, com as seguintes modificações: a) foi utilizado 1,0 µg de mRNA ao invés de 3,0 µg de RNA total, para a síntese de cDNA; b) os “random primers” foram omitidos da reação e o respectivo volume substituído por água; c) a reação de síntese de cDNA foi diluída 1:20, previamente ao PCR. Os tubos com as misturas de reação só foram colocados no equipamento termociclador após a temperatura do bloco da máquina atingir pelo menos 80°C (“hot start”).

Para amplificação, foi utilizado um programa de PCR longo de dois passos, a saber: desnaturação inicial a 93°C por 3 minutos; 14 ciclos de: 93°C por 20 segundos, e 68°C por 10 minutos; 21 ciclos de: 93°C por 20 segundos, e 68°C por 11 minutos com 20 segundos de auto-extensão em cada ciclo; extensão final a 68°C por 7 minutos; e finalmente, manutenção do bloco a 12°C. Os produtos de PCR foram analisados por fracionamento lento (2V/cm) através de eletroforese em gel de agarose 0,4%, tipicamente. A sequência dos “primers” utilizados nestas reações de LD-PCR para amplificação do cDNA completo de CHD7 são: CHD7F: 5'–AAAAAGCAGGCTTGGTGGTGCGGACGCGCTCGTGCTCGGGAA–3' e CHD7R: 5'–AGAAAGCTGGGTGGGACATCTCTGCATATCATGGGTCACT–3'.

3.2.8. Ensaio de tumorigênese de linhagens de glioma *in vivo*

Para estes experimentos, 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 12 horas, no Biotério do Conjunto das Químicas da USP. As linhagens celulares a serem ensaiadas foram previamente subcultivadas em meio de

cultura DMEM completo, contendo 5-10% de soro fetal bovino. No dia do experimento de tumorigênese, 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. A densidade da suspensão celular foi ajustada para 2×10^7 células/mL. Cada animal recebeu a injeção s. c. de 0,1 mL da suspensão de células (ou seja, aproximadamente 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, periodicamente, para detecção da formação de tumor. No dia do término do experimento de tumorigênese (30-60 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 pesados em balança analítica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação de genes potencialmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato através de hibridização de "macroarrays" de nylon comerciais.

4.1.1. Extração de RNA e hibridização de "macroarrays" comerciais ("Atlas Expression Arrays Clontech®")

O primeiro passo para analisar perfis de expressão gênica entre as linhagens ST1 e P7, foi definir as condições de tratamento das mesmas linhagens, a fim de se conseguir, com os experimentos de hibridização dos "macroarrays" comerciais, resultados que viessem a evidenciar ao máximo as diferenças moleculares eventualmente ligadas às diferenças fenotípicas.

Neste particular, já era sabido que a concentração de soro bovino fetal no meio de cultura é capaz de modular a responsividade das linhagens ST1 e P7 frente ao tratamento com hidrocortisona (Hy) (Armelin & Armelin, 1983; Armelin et al., 1983). A linhagem ST1, hipenssível ao tratamento com hidrocortisona, apresenta resposta máxima ao hormônio quando tratada em condições de careciamento de soro (0,2% SFB). Por outro lado, a linhagem P7 reverte parcialmente seu fenótipo de resistência a Hy quando o tratamento com o hormônio é feito em 0,2% SFB (Mercado, 1997). Além disto, já é conhecido também que o tratamento com Hy na linhagem ST1, induz, com cinéticas de tempo diferentes, perfis distintos de indução de expressão gênica (Vedoy & Sogayar, 2002).

Assim, em virtude destes dados prévios, foi escolhido hibridizar, contra as membranas de "macroarray" comerciais, um "pool" de RNAs obtidos da linhagem ST1 tratada com Hy em dois tempos diferentes (5 e 24 h) e na presença de 0,2% SFB, e de um outro "pool" de RNA das células P7, igualmente tratadas por 5 e 24 horas porém na presença de 5% SFB, condições estas que maximizariam os respectivos fenótipos de responsividade e resistência a Hy apresentados pelas mesmas linhagens, assim como permitiria, em tese, a identificação de genes modulados por Hy tanto precoce quanto tardiamente.

Uma vez definidas as condições ideais de tratamento das células para obtenção de RNA e hibridização das membranas de “macroarrays”, procedeu-se à preparação de RNA total de alta qualidade a partir de culturas destas linhagens nas condições previamente definidas, sendo que a qualidade do RNA a ser utilizado nesta etapa é crítica para a obtenção de resultados consistentes e reprodutíveis. A qualidade e pureza das preparações de RNA total obtidas foram avaliadas através de três critérios distintos: a) a relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm, que deve estar entre 1,8 e 2,1; b) o perfil de fracionamento de amostras das preparações de RNA total obtido através de géis de agarose-formaldeído, e c) a relação entre as intensidades relativas correspondentes às bandas dos RNAs ribossomais 28 e 18S, que deve ser próxima de 2,0, aproximadamente.

As Figuras 1A e 1B ilustram o perfil de fracionamento em géis desnaturantes de agarose-formaldeído das preparações de RNA total utilizadas para, respectivamente, hibridização dos “macroarrays” de cDNA e validação da expressão diferencial por Northern Blot. A Figura 2 ilustra o perfil de fracionamento de preparações de RNA utilizadas para as análises de expressão gênica por Q-PCR descritas no item 4.2.2., com a diferença de que, para estas amostras, o fracionamento foi feito em géis desnaturantes de agarose-guanidina, ao invés de agarose-formaldeído. O gel desnaturante de agarose-guanidina, para avaliação da qualidade, permite uma visualização mais nítida do perfil de fracionamento do RNA, assim como permite, também, a avaliação da qualidade utilizando-se de massas menores de RNA (Goda & Minton, 1995).

Como pode ser observado nas Figuras 1 e 2, foi possível obter preparações de RNA total livres de degradação, a julgar pela relação de intensidade das bandas 18 e 28S de rRNA e, também, pela presença de um arraste difuso de material, de intensidade baixa e homogênea ao longo de todo o perfil eletroforético, ou seja, não foi observado, em nenhuma das preparações de RNA total utilizadas, um “smearing” de fundo com intensidade maior na região de menor peso molecular, o que indicaria fortemente a presença de RNA degradado. Da mesma maneira, todas as preparações de RNA utilizadas em cada um dos experimentos sempre apresentaram uma relação A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,1, compatível com a ausência de contaminação grosseira por proteínas (que levaria a uma diminuição desta relação para menos que 1,8) ou por DNA genômico, que levaria a um aumento desta relação acima de 2,1. Por último, o método de extração e purificação de RNA total das linhagens celulares utilizadas ainda é, até o momento, a técnica de escolha para

A **B**

Figura 1 – Fracionamento em gel de agarose-formaldeído para verificação da qualidade e integridade de preparações de RNA total. A: Fracionamento de 10 μ g de RNA extraído das linhagens ST1 e P7 em diferentes condições experimentais de tratamento com hidrocortisona (Hy – 100 ng/mL) e soro (SFB), de acordo com indicado. Estas amostras de RNA total foram utilizadas para purificação de mRNA para posterior geração de sondas de cDNA e hibridização de “macroarrays” comerciais de cDNA. **B:** Fracionamento de 20 μ g de RNA total das linhagens ST1 e P7 de glioma de rato e A172 e T98G de glioma humano. Estes géis foram utilizados na preparação de membranas de Northern blot que foram utilizadas posteriormente para validação da expressão diferencial de genes candidatos. As posições referentes aos RNAs ribossomais 18 e 28S estão indicadas na figura.

Figura 2 - Fracionamento em gel de agarose-tiocianato de guanidina para verificação da qualidade e integridade de preparações de RNA total. **A:** Fracionamento de 2 μ g de RNA total de preparações feitas a partir das linhagens ST1 e P7 cultivadas na presença de 5% de SFB e tratadas por 24h com 100 ng/mL de hidrocortisona (+) ou com o veículo etanol (-). Quatro preparações independentes de RNA total foram obtidas para validação de expressão diferencial de genes por ensaios de RT-PCR em tempo real. **B:** Fracionamento de 2 μ g de RNA total obtido de linhagens de glioma humano sub-cultivadas na presença de 10% SFB e sem tratamento com drogas. Três preparações independentes de RNA total foram obtidas para análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real. **C:** Fracionamento de 1 μ g de RNA total ou de 10% v/v de preparações de RNA total obtidas a partir de amostras clínicas de glioma ou de cérebro humano não-tumoral. As posições referentes aos RNAs ribossomais estão indicadas na figura.

purificação de RNA total de alta pureza e integridade (Chirgwin et al., 1979), o que também contribuiu para obtenção de boas preparações de RNA.

Visando maximizar a sensibilidade na detecção de genes diferencialmente expressos, foi utilizado, para os experimentos de hibridização de “macroarrays” de cDNA, mRNA para a síntese de cDNAs marcados radioativamente, ao invés de RNA total. Para tanto, após obtenção de preparações de RNA total adequadas (Figura 1A), o mRNA foi purificado a partir das mesmas, através de enriquecimento de RNA poliadenilado por afinidade e separação magnética, método este previamente estabelecido em nosso grupo como capaz de produzir mRNA de alta qualidade e pureza e livre de contaminação de DNA genômico (Sogayar et al., 2004).

Após purificação de mRNA, foram sintetizadas sondas de cDNA marcadas radioativamente e, as quais foram hibridizadas contra os “macroarrays” comerciais (Figuras 3–5). Foram escolhidos três conjuntos de membranas comerciais contendo cDNAs diversos de rato (Figuras 3 e 4) e, também, um conjunto de “macroarrays” comerciais contendo genes de camundongo especificamente relacionados a câncer e proliferação celular (Figura 5). Este último conjunto de membranas, com sondas de camundongo, foi escolhido devido à inexistência, na época, de “macroarrays” contendo sondas de genes de rato relacionados à proliferação celular, e ao grande interesse em se avaliar níveis de expressão de genes relacionados a proliferação celular. Teoricamente, a alta similaridade entre as seqüências de rato e camundongo, permitiria a detecção de cDNAs de rato utilizando-se as sondas heterólogas de camundongo presentes na membrana.

Como pode ser visto nas Figuras 3 – 5, as sondas geradas a partir das mesmas quantidades de mRNA geraram, também, sinais de hibridização de intensidades comparáveis entre as duas células, levando-se em consideração a intensidade de hibridização dos “spots” correspondentes aos “housekeeping genes”, presentes nas membranas. Também não foi detectado sinal nos “spots” correspondentes aos controles negativos das membranas (vetor M13mp18, vetor pUC18 e DNA do fago lambda), indicando que as condições de hibridização e lavagem das membranas foram suficientemente específicas para favorecer apenas hibridização seqüência-específica.

Os controles de DNA genômico presentes nas membranas de “macroarray”, também não apresentaram sinal de hibridização considerável, mesmo após a exposição das membranas por cerca de 14 dias, o que gerou as imagens das Figuras 3 – 5. Segundo o fabricante, se a contaminação do RNA utilizado para síntese das sondas estiver dentro do recomendado (<0,001% de DNA genômico), os

ST1

P7

Figura 3 - Hibridização da membrana comercial "Atlas Rat" contendo 588 genes conhecidos de rato em duplicata. As membranas foram hibridizadas com sondas marcadas a partir de um "pool" de 1 µg de mRNA de células tratadas com 100 ng/mL de Hy por 5 e 24h, sendo o RNA de ST1 originário de células carenciadas (0,2% SFB) e o de P7 de células crescendo em alto soro (5% SFB). As zonas de cada membrana estão assinaladas (A-F), assim como as coordenadas e os "housekeeping genes": poliubiquitina, hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), ortinina decarboxilase (ODC), β-actina citoplasmática e proteína ribossomal S29 da subunidade 40S. Os controles negativos da membrana (M13mp18, fago lambda, pUC18 e DNA genômico de rato) também estão indicados. As membranas foram expostas por 14 dias, e reveladas por "phosphorimaging".

ST1

P7

Figura 4 - Hibridização de membranas comerciais "Atlas Rat 1.2 II" contendo 1.172 genes conhecidos de rato. As membranas foram hibridizadas com sondas e reveladas conforme descrito para a figura anterior. As zonas de cada membrana estão assinaladas (A-F), assim como as coordenadas e os "housekeeping genes": poliubiquitina, hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), ortinina decarboxilase (ODC), β -actina citoplasmática e proteína ribossomal S29 da subunidade 40S. Os controles negativos da membrana (M13mp18, fago lambda, pUC18 e DNA genômico de rato) também estão indicados.

ST1

P7

Figura 5 - Hibridização de membranas comerciais "Mouse Cancer 1.2" contendo 1.172 genes conhecidos de camundongo. As membranas foram hibridizadas conforme já descrito. As zonas de cada membrana estão assinaladas (A-F), assim como as coordenadas e os "housekeeping genes": poliubiquitina, hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), ortitina decarboxilase (ODC), β-actina citoplasmática e proteína ribossomal S29 da subunidade 40S. Os controles negativos da membrana (M13mp18, fago lambda, pUC18 e DNA genômico de camundongo) também estão indicados.

“spots” com sonda de DNA genômico não devem aparecer nos primeiros 3-6 dias de exposição, indicando que a contaminação por gDNA das preparações de RNA utilizadas para síntese das sondas foi consideravelmente abaixo do limite máximo recomendado.

Entretanto, como também pode ser visto nas mesmas figuras, a hibridização inespecífica e heterogênea de fundo impediu a obtenção de resultados confiáveis através de densitometria das imagens digitais geradas, o que forçou a escolha visual dos “spots” correspondentes a genes a serem analisados posteriormente para confirmação de expressão individual. As listas dos genes escolhidos como sendo, possivelmente, diferencialmente expressos entre as duas condições hibridizadas, encontram-se nos Anexos 1-3. Por fim, as membranas contendo sondas de cDNA de camundongo (Figura 5), foram aquelas em que o número de “spots” que apresentaram sinal de hibridização ficou abaixo do esperado segundo recomendações do fabricante (20-70%), provavelmente devido ao fato das sondas presentes nestas membranas serem heterólogas.

Como pode ser visto nos Anexos 1 – 3, os genes cujas sondas apresentaram indicação de expressão diferencial, pertencem a categorias funcionais diversificadas, que incluem sinalização célula-célula, transdução de sinais, componentes de matriz extracelular, fatores de crescimento, dentre outras. Como dados confirmatórios, foram encontrados, na membrana “Rat 588”, expressão aumentada do transcrito para Ciclina G1 de rato e, na membrana “Mouse Cancer 1.2”, expressão aumentada do transcrito de Trombospondina-1, sendo ambos os genes com maior expressão na linhagem ST1. Estes achados reproduzem resultados anteriormente obtidos em trabalhos anteriores do grupo (Vedoy & Sogayar, 2002), onde estes genes foram identificados como sendo induzidos pelo tratamento com hidrocortisona na linhagem ST1, apresentando níveis de expressão consideravelmente menores na linhagem P7. A reconfirmação destes resultados, indicou que as amostras de RNA utilizadas para síntese das sondas foram representativas dos perfis de expressão já conhecidos para estas células. Desta maneira, os genes adicionalmente identificados nestes experimentos teriam, teoricamente, uma chance significativa de se confirmarem como sendo diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7. Após a hibridização dos “macroarrays” comerciais e análise dos resultados, o passo seguinte foi a confirmação, por Northern Blot, da expressão diferencial de, pelo menos, um subconjunto dos genes possivelmente diferencialmente expressos, identificados neste primeiro “screening”.

4.1.2. Validação da expressão diferencial de genes possivelmente diferencialmente expressos por Northern Blot.

De posse das listas de genes que, visualmente, apresentaram indicação de expressão diferencial entre as linhagens ST1 e P7 nas condições testadas, procedeu-se à validação da expressão diferencial destes mesmos candidatos por Northern Blot. Para tanto, o primeiro passo foi obter novas preparações de RNA, que foram avaliadas quanto à qualidade através dos mesmos critérios descritos acima. A Figura 1B mostra o fracionamento das preparações de RNA que foram utilizadas para preparação das membranas de Northern Blot, onde se verifica, novamente, que foi possível obter preparações de RNA livre de degradação e de boa qualidade.

As sondas hibridizadas contra os "macroarrays" foram sintetizadas a partir de preparações de mRNA obtidas a partir de células submetidas a diferentes condições de soro e de tratamento com hidrocortisona, pelos motivos expostos acima. Desta maneira, os genes que foram identificados nos "macroarrays" como possivelmente diferencialmente expressos poderiam sê-lo em função de mais de uma variável, ou seja, a expressão diferencial dos mesmos poderia ser devida às diferenças entre as linhagens celulares, às diferentes concentrações de soro, ou moduladas pelo tratamento com hidrocortisona, e por diferentes períodos de tempo. Portanto, para a validação da expressão diferencial por Northern Blot, foram obtidas preparações de RNA a partir das duas linhagens tratadas, agora individualmente, em cada uma destas condições (alta [5%] versus baixa [0,2%] concentração de soro; tratamento com veículo, Hy por 5h ou por 24h), visando identificar o efeito de cada uma destas variáveis sobre a expressão dos genes analisados, num total de 12 diferentes condições. Por outro lado, tendo em vista obter, o quanto antes, resultados que pudessem ser aplicados à doença humana, foram preparadas, também, membranas de Northern Blot contendo RNAs de linhagens humanas de glioblastoma, tratadas sob as mesmas condições de soro e droga em que foram obtidas as preparações de RNA das linhagens ST1 e P7 de rato. As linhagens de glioblastoma humano A172 e T98G, foram escolhidas por possuírem características distintas de invasão *in vitro* (Nakagawa et al., 1996). Como pode ser visto ainda na Figura 1B, as preparações de RNA total obtidas destas linhagens humanas tiveram qualidade e integridade comparáveis àquelas obtidas a partir das linhagens ST1 e P7.

Num primeiro momento, a análise confirmatória da expressão diferencial dos genes indentificados como sendo potencialmente diferencialmente expressos nos

"macroarrays", foi condicionada à disponibilidade de sondas para os respectivos genes. A maioria das sondas utilizadas aqui, foram obtidas a partir de bibliotecas organizadas de ESTs de rato, cedida pelo Prof. Dr. Marcelo Bento Soares, da Universidade de Iowa (EUA), e gentilmente disponibilizada pelo Prof. Dr. Hugo Armelin (IQ-USP). Alternativamente, algumas sondas também foram obtidas por RT-PCR utilizando "primers" gene-específicos, quando estes estavam disponíveis. Em cada experimento de hibridização, foram hibridizadas, simultaneamente, uma membrana contendo RNA das linhagens ST1 e P7 juntamente com outra membrana contendo RNA das linhagens A172 e T98G. Devido ao fato das sondas utilizadas serem, na maioria dos casos, originárias de rato, as membranas contendo RNA das linhagens A172 e T98G foram lavadas sob condições de menor rigor, com o objetivo de favorecer a hibridização destas sondas que apresentavam complementaridade parcial. As imagens dos experimentos de Northern Blot correspondentes aos genes que foram confirmados como sendo diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 estão ilustradas nas Figuras 6 – 9, onde também estão ilustrados os resultados de hibridização das membranas contendo RNA das linhagens de glioblastoma humano, obtidos com as mesmas sondas.

As Figuras 6 e 7 ilustram as imagens obtidas por "phosphorimaging" dos experimentos de hibridização das sondas correspondentes aos genes que foram confirmados como sendo diferencialmente expressos na linhagem ST1. São eles:

- BAF60B (*BRG1/brm Associated Factor 60B*, ou *SWI/SNF related, matrix associated, actin-dependent chromatin regulator, subfamily D, member 2* [SMARCD2]), que codifica para uma sub-unidade do complexo remodelador de cromatina SWI/SNF (Wang et al., 1996);
- I κ B α (NFKBIA, *Nuclear Factor - Kappa B Inhibitor, alpha isoform*), codificante de uma proteína inibitória do fator de transcrição NF- κ B (Haskill et al., 1991);
- MGST1, (Glutathione-S-transferase microsomeal 1), que codifica para uma glutathione-S-transferase específica do compartimento microsomeal (DeJong et al., 1988).
- P8 (*P8 Protein, Nuclear Protein 1*, NUPR1), que codifica para uma proteína predominantemente nuclear associada à cromatina (Mallo et al., 1997);
- RhoB (*Ras homolog gene B*, RHOB), que codifica para uma GTPase de membrana homóloga a *ras* (Madaule & Axel, 1985);
- Sindecano-4 (SDC4), que codifica para um proteoglicano de membrana (Kojima et al., 1992);

Figura 6 – Confirmação da expressão diferencial dos genes P8, BAF60B e RhoB na linhagem ST1 por Northern blot. Foram fracionados 20 µg de RNA total de células de glioma de rato (ST1 e P7) ou de glioblastoma humano (A172 e T98G), tratadas ou não com 100 ng/mL de Hy nas condições indicadas de tempo e concentração de soro. As sondas correspondentes a estes genes, cuja expressão foi detectada nos “macroarrays” de cDNA comerciais, foram obtidas de bibliotecas de cDNA organizadas. Membranas representativas hibridizadas com a sonda de GAPDH demonstram fracionamento de quantidades comparáveis de RNA total. A exposição das membranas variou de 3-20 dias, de acordo com a intensidade inicial do sinal de hibridização, e as imagens foram reveladas por “phosphorimaging”.

Figura 7 – Confirmação da expressão diferencial dos genes $\text{IkB}\alpha$, Sindecano 4 (SDC4) e Glutathione-S-transferase microssomal 1 (MGST1) na linhagem ST1 por Northern blot. Foram fracionados 20 μg de RNA total de células de glioma de rato (ST1 e P7) ou de glioblastoma humano (A172 e T98G), tratadas como descrito anteriormente. As sondas correspondentes a estes genes, cuja expressão foi detectada nos “macroarrays” de cDNA comerciais, foram obtidas de bibliotecas organizadas de cDNA de rato. Membranas representativas hibridizadas com a sonda de GAPDH demonstram fracionamento de quantidades comparáveis de RNA total. A exposição e revelação das imagens seguiu o descrito para a figura anterior.

Nas mesmas figuras 6 e 7 são apresentadas, também, imagens representativas resultantes da hibridização das mesmas membranas com sondas do controle interno GAPDH, utilizado nestes experimentos para verificar o fracionamento de quantidades equivalentes de RNA de cada amostra. Desta maneira, pode ser visto nas figuras 6 e 7 que as diferenças de expressão observadas entre as linhagens ST1 e P7 não são devidas a diferenças de carregamento dos géis para preparação das membranas de Northern Blot mas, sim, à expressão diferencial destes genes. Além disto, é possível observar também que todos estes genes apresentam um padrão de expressão recorrente. Todos estes genes são induzidos pelo tratamento com hidrocortisona na linhagem ST1, enquanto na linhagem P7 este efeito não é observado. Por outro lado, nenhum destes genes é de expressão exclusiva (ou muito mais abundante) na linhagem ST1, sendo que todos são também expressos na linhagem P7, embora em níveis menores. Quanto às membranas de Northern Blot contendo RNAs de linhagens humanas de glioma, apenas as hibridizações com as sondas de rato correspondente aos genes RhoB e BAF60B apresentaram algum sinal, ainda assim em níveis bem menos intensos que o sinal observado para as membranas contendo RNAs das linhagens de rato. Neste particular, o gene RhoB, que codifica para uma GTPase de membrana “*ras-like*”, parece ser mais expresso na linhagem A172, e também parece sofrer modulação por soro. Ainda sobre estes dois genes, cuja expressão pode ser detectada nas linhagens humanas, não houve, aparentemente, modulação dos níveis de expressão pelo tratamento com hidrocortisona.

As Figuras 8 e 9 ilustram as imagens obtidas de experimentos de hibridização de membranas de Northern Blot, com sondas de genes que foram identificados como sendo mais expressos na linhagem P7. São eles:

- BAF60A (*BRG1/brm Associated Factor 60A*, ou *SWI/SNF related, matrix associated, actin-dependent chromatin regulator, subfamily D, member 1* [SMARCD1]), que codifica para uma sub-unidade do complexo remodelador de cromatina SWI/SNF (Wang et al., 1996);
- MLP1 (*MARCKS-like protein 1*), que codifica para uma proteína similar à uma proteína que atua como substrato de proteína quinase C rico em alanina e miristoilado (MARCKS) (Umekage & Kato, 1991);
- PTN (*Pleiotrophin*), que codifica para uma citocina/fator de crescimento com efeitos pleiotróficos (Li et al., 1990);

Figura 8 – Confirmação da expressão diferencial dos genes Cromogranina C (SCG2) e BAF60A na linhagem P7 por Northern blot. Foram fracionados 20 µg de RNA total de células de glioma de rato (ST1 e P7) ou de glioblastoma humano (A172 e T98G), tratadas como descrito anteriormente. As sondas correspondentes a estes genes, cuja expressão foi detectada nos “macroarrays” de cDNA comerciais, foram obtidas de bibliotecas organizadas de cDNA de rato. Membranas representativas hibridizadas com a sonda de GAPDH demonstram fracionamento de quantidades comparáveis de RNA total. A exposição e revelação das imagens seguiu conforme já descrito.

Figura 9 – Confirmação da expressão diferencial dos genes codificantes para “MARCKS-like protein” e Pleiotrofina por Northern blot. Foram fracionados 20 µg de RNA total de células de glioma de rato (ST1 e P7) ou de glioblastoma humano (A172 e T98G), tratadas como descrito anteriormente. As sondas correspondentes a estes genes, cuja expressão foi detectada nos “macroarrays” de cDNA comerciais, foram obtidas de bibliotecas organizadas de cDNA de rato. Membranas representativas hibridizadas com a sonda de GAPDH demonstram fracionamento de quantidades comparáveis de RNA total. A exposição e revelação das imagens seguiu conforme já descrito.

- SCG2 (*Secretogranin 2*), que codifica para uma proteína envolvida na formação de grânulos de secreção (Fischer-Colbrie et al., 1987);

Da mesma forma que nas Figuras 6 e 7, também pode ser visto, nas Figuras 8 e 9, imagens representativas indicando que quantidades equivalentes de RNA total foram fracionadas nas respectivas membranas de Northern Blot, tanto das linhagens de glioma de rato, quanto das linhagens de glioblastoma humano. Alguns destes genes (SCG2 e PTN) apresentaram níveis de expressão muito maiores na linhagem P7 em relação à linhagem ST1, ao contrário dos genes confirmados como diferencialmente expressos na linhagem ST1, dos quais nenhum apresentou diferenças marcantes de expressão entre as duas linhagens. Além disso, também ao contrário aos genes mais expressos na linhagem ST1, os genes com maior expressão na linhagem P7 aparentemente não sofrem modulação pelo tratamento com hidrocortisona, ou por diferentes concentrações de soro no meio de cultura. Similarmente aos resultados das Figuras 6 e 7, as sondas de rato nem sempre geraram sinal nas membranas contendo RNAs de linhagens humanas de glioblastoma. Os genes MLP1 e BAF60A, que geraram sinais fracos quando hibridizados contra estas membranas, não apresentaram, também, modulação dos respectivos níveis de expressão por soro ou pelo tratamento com hidrocortisona.

Ao todo, foram realizados cerca de 40 experimentos de hibridização de membranas de Northern Blot, em que membranas contendo RNA tanto de linhagens de glioma de rato quanto humano foram hibridizadas simultaneamente com sondas de rato. A tabela 3 ilustra um resumo dos resultados finais obtidos a partir destes experimentos, onde foram incluídos somente aqueles onde foi obtido sinal de hibridização específica.

Como pode ser visto nesta tabela, cerca de um quarto (25%) dos genes testados tiveram expressão diferencial confirmada entre as linhagens ST1 e P7, que era o primeiro objetivo, neste ponto do trabalho. Uma proporção bem menor destes genes tiveram a sua expressão confirmada entre as linhagens de glioma humano A172 e T98G, sendo o uso de sondas heterólogas, e os padrões de expressão gênica inter-espécie distintos, os motivos mais relevantes que provavelmente levaram a este resultado.

Por outro lado, não condicionar a verificação da expressão gênica à indicação de expressão diferencial através dos “macroarrays”, permitiu identificar o gene BAF60A como sendo diferencialmente expresso na linhagem P7, sendo que este gene não está presente em nenhum dos “macroarrays” hibridizados e, portanto,

Gene	Gene Symbol	Representação nos "Atlas Arrays"	Linhagens de glioma com maior expressão	
			Rato	Humano
Proteína nuclear 1 (p8)	NUPR1	☑	ST1	-
Glutathione-S-transferase microssomal 1	MGST1	☑	ST1	-
RhoB	RHOB	☑	ST1	A172
I Kappa B alfa	NFKBIA	☑	ST1	-
Sindecano-4	SDC4	☑	ST1	-
BAF60B	SMARCD2	☑	ST1	-
BAF60A	SMARCD1		P7	-
Secretogranina 2	SCG2	☑	P7	-
Pleiotrofina	PTN	☑	P7	T98G
"MARCKS-like protein 1"	MLP	☑	P7	-
Proteína 14-3-3 isoforma epsilon	YWHAE		-	-
Proteína 14-3-3 isoforma eta	YWHAH	☑	-	-
Proteína 14-3-3 isoforma gama	YWHAG		-	-
Proteína 14-3-3 subunidade teta	YWHAQ		-	-
Alfa timosina	PTMA	☑	-	-
Biglicano	BGN	☑	-	-
Caseína quinase 2 beta	CKSN2B		-	-
Catalase	CAT		-	-
Corticosteróide 11-beta-desidrogenase	HSD11B1	☑	-	-
Dipeptidase	DPEP1	☑	-	-
"Enhancer of polycomb 1"	EPC1		-	-
"Enhancer of polycomb 2"	EPC2		-	-
Gama glutamil transferase 1	GGT1		-	-
Glutathione peroxidase 1	GPX1		-	-
Glutathione-S-transferase P	GSTP2	☑	-	-
Hexose fosforilase	GMPPA	☑	-	-
"High mobility group" I/Y	HMGA1	☑	-	-
"Proliferating cell nuclear antigen" (PCNA)	PCNA	☑	-	-
PI3 quinase sub-unidade p85 alfa	PIK3R1	☑	-	-
"Zinc finger 46"	ZFP46	☑	-	-
Receptor de benzodiazepina	BZRP	☑	-	-
Receptor de IL-6	IL6R	☑	-	-
SMAD5	SMAD5	☑	-	-
TIMP-3	TIMP3	☑	-	-
Tirosina quinase fyn	FYN	☑	-	-
"TRX domains"	TXNDC4	☑	-	-
Cold shock domain containing E1 (UNR)	CSDE1	☑	-	-

Tabela 3 – Quadro-resumo geral de todos os experimentos de validação de expressão diferencial por Northern blot. Foram realizados diversos experimentos de hibridização simultânea de membranas contendo RNA fracionado das linhagens ST1 e P7 de glioma de rato, e A172 e T98G de glioblastoma humano, com sondas provenientes, na sua maior parte, de bibliotecas de ESTs de rato. Está indicado, na tabela, em quais linhagens foi encontrada expressão diferencial, comparando-se ST1 × P7, ou A172 × T98G, para cada um dos genes analisados. Também está indicado quais sondas correspondem a genes que estão representados nos "macroarrays" e que tiveram indícios de expressão diferencial.

também não tinha indicação de expressão diferencial. Este achado está em contraste com o observado com o gene BAF60B que, sendo um parálogo evolutivamente próximo de BAF60A, apresenta expressão diferencial maior na linhagem ST1. Baseado nestes dados, também é possível inferir que a hibridização cruzada de sondas contra genes parálogos entre si não é, geralmente, um problema quando condições de alto rigor de hibridização são utilizadas.

Em resumo, nesta etapa do trabalho foram analisados, no total, a expressão de aproximadamente 3.000 genes diferentes, através da metodologia de hibridização de “macroarrays” de cDNA comerciais, dos quais uma lista de ~200 genes possivelmente diferencialmente expressos foram selecionados. A expressão de 40 genes, incluindo alguns que não constam na lista acima, foram analisados por Northern Blot, dos quais 10 se confirmaram com sendo diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7.

4.2. Identificação de genes potencialmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato através de hibridização de "microarrays" de alta densidade (GeneChip Affymetrix®).

4.2.1. Análise dos resultados de hibridização dos "microarrays" de alta densidade.

4.2.1.1. Normalização e análise preliminar dos experimentos de hibridização de "microarrays"

Durante um estágio de DR-Sanduiche realizado no laboratório do Dr. Charles Stiles (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, EUA), foi possível realizar experimentos de hibridização de "microarrays" de alta densidade com RNAs oriundos das linhagens ST1 e P7 de glioma de rato, visando expandir o conjunto de genes analisados e, desta maneira, promover incursões mais amplas sobre as diferenças moleculares eventualmente ligadas às diferenças fenotípicas entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato. O sistema utilizado (GeneChip® Rat Genome U34 Set, Affymetrix Inc.) contém, no total, conjuntos de sondas ("Probe Sets") para mais de 24.000 transcritos e ESTs, distribuídas ao longo de todo o genoma do rato. Cada um destes conjuntos de sondas se constitui, em média, de 16 pares de sondas diferentes, sendo que cada par consiste de uma sonda de 25 nucleotídios exatamente complementar ao transcrito de interesse, sendo a outra sonda composta da mesma seqüência de nucleotídios com divergência de seqüência em uma base, para compensação dos sinais de hibridização inespecíficos. O conjunto total de aproximadamente 150.000 sondas, está contido, fisicamente, em três diferentes lâminas ("chips" A, B e C).

Ao contrário dos "microarrays" convencionais, em que o DNA a ser utilizado como sonda é depositado mecanicamente sobre a lâmina de vidro ou plástico, as sondas dos "microarrays" Affymetrix® são sintetizadas quimicamente *in situ*, por um processo industrial em série denominado "fotolitografia" (Fodor et al., 1993; Fodor et al., 1991; Pease et al., 1994). Este processo permite que as moléculas de sondas presentes nas lâminas estejam, de maneira homogênea, numa disposição espacial ótima para a hibridização com o seu respectivo analito e levando, portanto, a um

grande aumento de sensibilidade e homogeneidade de hibridização aliado a uma redução física da área ocupada pelos “spots”, viabilizando, desta maneira, a montagem de “chips” com um conjunto muito maior de sondas.

Os resultados anteriores indicaram que a comparação de perfis de expressão das células ST1 e P7, sob diferentes condições de tratamento, não aumentou substancialmente o número de genes diferencialmente expressos isolados, além de dificultar o processo de confirmação de expressão diferencial. Desta maneira, para a realização de um novo “screening” de genes possivelmente diferencialmente expressos, foi escolhido tratar ambas as linhagens (ST1 e P7) com hidrocortisona por 24h na presença de 5% SFB, para a obtenção do RNA a ser utilizado para a síntese de sondas. Nestas condições, as diferenças fenotípicas entre as mesmas seriam essencialmente mantidas, sem a inclusão de múltiplas variáveis que poderiam aumentar a complexidade do processo de confirmação de expressão diferencial.

Após a síntese de sondas, hibridização e revelação dos “microarrays” segundo instruções do fabricante, foi possível obter imagens digitais semelhantes àquelas ilustradas na Figura 10A, que correspondem ao “Chip A”, hibridizado com RNAs das linhagens ST1 e P7 obtidos como descrito acima. Como pode ser visto, após os procedimentos de hibridização e lavagem dos “microarrays”, foi possível obter imagens nítidas e um padrão de hibridização uniforme, sem manchas ou hibridização inespecífica de fundo (“background”).

A tabela apresentada na Figura 10B, por outro lado, mostra que a análise das imagens digitais revelou que a intensidade média de hibridização dos mesmos “arrays” com sondas diferentes foi equivalente, indicando que, tanto a eficiência de síntese de sondas, quanto a quantidade de sonda hibridizadas, foram equivalentes para as três diferentes lâminas de “microarrays” utilizadas. Da mesma maneira, o número de genes apresentando sinal significativamente maior que o “background”, foi similar para cada par de “microarrays” hibridizados, reforçando a idéia de que a síntese e hibridização de sondas oriundas de RNA da linhagem ST1 foi essencialmente tão bem sucedida quanto para as sondas oriundas de RNA da linhagem P7. Levando-se em consideração que as linhagens ST1 e P7 são subclones derivados da linhagem C6 que, *a priori*, também é de origem clonal, espera-se que, ao nível genômico (“genome-wide”), os perfis de expressão das duas linhagens não seriam diferentes o suficiente para modificar, de maneira significativa, a intensidade média de hibridização dos “arrays” ou o número de sondas com sinal acima do “background”.

A**ST1****P7** **B**

Condição	Intensidade Média			<i>P call %</i>			% Array outlier			% Single outlier			Flags		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
ST1, 24h Hy, 5% SBF	155	123	142	41,8	39,2	52,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-
P7, 24h Hy, 5% SBF	185	169	152	40,8	40,3	50,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-

Figura 10 – Análise preliminar dos resultados de hibridização dos “microarray” Affymetrix®. **A:** Imagens digitalizadas dos sinais de hibridização obtidos para o par de Chips “A”, hibridizados com sondas oriundas das linhagens ST1 ou P7. **B:** Quadro com os resultados referentes às intensidades médias de sinal, percentagem de genes do “array” apresentando sinal significativo (*P-call %*), percentagem de genes ou “spots” com nível de sinal aberrante (“% Array” e “Single Outliers”, respectivamente). A análise dos “arrays” hibridizados não gerou quaisquer indicadores de problemas (“flags”).

Além disso, não foram excluídos conjuntos de sondas de um mesmo gene por apresentarem intensidade de hibridização dispar em relação à intensidade média dos “microarrays” (“Array Outliers”), assim como também não foram detectadas sondas individuais que apresentassem níveis de sinal de hibridização aberrantes (“Single Outliers”), e que, portanto, deveriam ser excluídas de futuras análises. Por fim, a análise global das imagens digitais bem como dos controles internos dos “microarrays”, não gerou “flags” indicadores de problemas nas amostras de RNA, na síntese de sondas ou na hibridização dos “arrays”. Neste caso, o sistema é capaz de detectar, conjuntamente, através da adição de RNAs-controle sintéticos, a síntese ineficiente de sondas, contaminação do RNA de partida com DNA genômico, desuniformidade de hibridização da lâmina, defeitos de fabricação dos “spots” e, ainda, degradação do RNA utilizado para síntese das sondas.

Após a hibridização, lavagem e escaneamento dos “microarrays”, são obtidas imagens digitais correspondentes à intensidade de fluorescência em todos os “spots” presentes nos “arrays”. Para cada gene interrogado existem 16 sondas rigorosamente complementares (“Perfect Match”) à seqüência de interesse, e 16 sondas com seqüências idênticas às primeiras porém com uma mutada para se tornar não-complementar (“Mismatched”). As intensidades relativas de hibridização das sondas “mismatched” é levada em consideração pelo programa de análise (“dCHIP”, www.dchip.org) para compensar o “background” de sinais de hibridização não-específica (Figura 12). O programa “dCHIP” executa um algoritmo que leva em consideração os sinais de hibridização de cada uma das 32 sondas para cada gene, e fornece um resultado ponderado de intensidade de hibridização para o gene interrogado.

Após o cômputo dos sinais de hibridização de todas as sondas relativas a todos os genes presentes nos “arrays” utilizados, o primeiro passo para a extração de informações, com respeito às linhagens ST1 e P7, é a normalização dos sinais de hibridização de cada par de “microarrays”. O método de normalização utilizado pelo programa “dCHIP”, utilizado para análise dos “microarrays”, é baseado na seleção de um conjunto de sondas cujos níveis de expressão, entre as amostras testadas, é invariável, de acordo com certos critérios matemáticos adotados (Schadt et al., 2001). Conforme ilustrado na Figura 11, estes pontos selecionados (em vermelho) são utilizados para gerar uma curva de normalização (em verde). A intensidade relativa de cada uma das sondas é, em seguida, ajustada de maneira a fazer com que a curva de normalização se sobreponha, da melhor maneira possível, à linha diagonal (em azul), que descreve a equação $x = y$. Quanto melhor o ajuste da curva

Figura 11 – Normalização dos resultados de hibridização de “microarrays” Affymetrix®. Gráficos representam as intensidades relativas dos sinais dos “arrays” hibridizados com sondas da linhagem ST1 em função daqueles hibridizados com sondas da linhagem P7. Cada ponto simboliza um gene presente em cada um dos “arrays” (chips A, B e C). Os círculos vermelhos indicam os genes que foram considerados invariantes, e que foram utilizados para normalização dos dados. As linhas azuis representam as linhas diagonais de cada gráfico ($x=y$), e as linhas verdes representam a curva de normalização, que se aproxima muito da linha diagonal após uma normalização bem sucedida. Os valores nos dois eixos dos gráficos representa intensidade relativa de hibridização em unidades arbitrárias.

Figura 12 – Tela de análise dos dados do programa “dCHIP”. A sonda correspondente ao gene de Metalotioneína 1 está em destaque. No primeiro quadrante superior direito, pode-se visualizar a intensidade relativa dos 16 pares de sonda presentes no “array” para este gene (16 sondas “perfect match” e 16 sondas “mismatch” correspondentes), e nos demais quadrantes, representações gráficas dos valores convertidos de intensidade de hibridização.

de normalização à linha diagonal do gráfico, mais perfeita é a sobreposição das duas linhas, partindo-se da premissa de que a maioria dos genes não vão ter sua expressão alterada entre as duas condições estudadas. Portanto, a intersecção entre os níveis de expressão de um gene não-diferencialmente expresso, entre duas amostras, deve coincidir com os pontos da linha diagonal do gráfico.

Como pode ser visto na Figura 11, o procedimento de normalização levou à sobreposição praticamente completa da curva de normalização e da linha diagonal, para os três diferentes “microarrays” hibridizados (“chips” A, B e C). O sucesso do procedimento de normalização dos “arrays” reduz o número de genes falsamente diferencialmente expressos entre as amostras comparadas por aproximar de 1,00 a razão de expressão relativa destes genes e, por consequência, diminuir as chances de que os mesmos passem pela etapa posterior de filtragem dos genes diferencialmente expressos.

4.2.1.2. Geração e re-anotação da lista de genes potencialmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 obtida a partir dos "microarrays"

Após a normalização dos “arrays”, o primeiro passo foi a seleção dos genes possivelmente diferencialmente expressos entre as duas condições estudadas. Para esta etapa, é necessário a escolha de um valor de “cut-off” de expressão diferencial, para gerar a lista dos genes com provável expressão diferencial. Foi utilizado, como critério para estabelecer um valor mínimo de expressão relativa diferencial, o valor mais alto que incluísse todos os genes já confirmados, até o momento, como sendo diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7.

Para tanto, foram localizadas, nas listas de genes potencialmente diferencialmente expressos geradas, as sondas correspondentes àqueles genes que foram identificados nos experimentos anteriores de Northern (Tabela 6). Como pode ser visto nesta tabela, a escolha de uma razão de expressão diferencial maior ou igual a 2,00, permitiu incluir todos os genes diferencialmente expressos, que foram anteriormente confirmados neste trabalho.

Trabalhos anteriores do grupo, em que foram identificados genes induzidos pelo tratamento com glicocorticóides na linhagem ST1 (Valentini & Armelin, 1996; Vedoy & Sogayar, 2002), mostraram, também, que estes mesmos genes são mais expressos na linhagem ST1 quando comparado com a linhagem P7. Logo, os genes identificados nesses trabalhos, como sendo induzidos por glicocorticóides na

Chip	Probe Set	Gene Symbol	Anotação	Razão ST1/P7	Ref.
A	rc_AI102562_at	rMT1A	Metallothionein 1A	15,93	Valentini & Armelin, 1996
A	M11794cds#2_f_at	rMT1A	Metallothionein 1A	4,00	
A	rc_AI176456_at	hMT2A	Rn EST similar to human protein P04732 MT1E_HUMAN METALLOTHIONEIN-IE	4,45	
A	V01216_at	hORM1	Orosomucoid 1 (alpha-1-acid glycoprotein)	56,53	
C	rc_AA818036_at	Seq. retroviral		3,53	
A	U83119_f_at	Seq. retroviral	U83119 RNU83119 Rn L1 retrotransposon ORF2 mRNA (rLOC297970)	2,40	
A	rc_AI175776_s_at	Seq. retroviral	Rn retroviral-like ovarian specific transcript 30-1 mRNA (Rat EST AF159098)	2,55	
A	X17053cds_s_at	rCCL2	small inducible cytokine A2 (JE cytokine)	0,42	
A	X17053mRNA_s_at	rCCL2	small inducible cytokine A2 (JE cytokine)	0,32	Vedoy & Sogayar, 2002
C	rc_AI071307_at	rENC1	ectodermal-neural cortex 1 (NRP/B)	6,02	
C	rc_AI179988_at	rENC1	ectodermal-neural cortex 1 (NRP/B)	4,02	
A	S74351_s_at	rDUSP1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 16 (CL100)	5,69	
A	U02553cds_s_at	rDUSP1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 16 (CL100)	3,17	
A	S81478_s_at	rDUSP1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 16 (CL100)	2,33	
C	rc_AI172612_at	rCYP21A1/rTNXA	cytochrome P450 family 21 subfamily A polypeptide 1/tenascin XA	10,78	
A	U24489_g_at	rTNXA	tenascin XA	7,52	
A	U24489_at	rTNXA	tenascin XA	5,27	
A	rc_AA858520_at	rFST	follicle-stimulating	7,71	
C	rc_AI175575_at	rFST	follicle-stimulating	7,27	
A	rc_AA858520_g_at	rFST	follicle-stimulating	6,63	
C	rc_AI103386_at	rFST	follicle-stimulating	5,44	
B	rc_AA964755_at	rTHBS1	thrombospondin-1	6,58	
A	X70871_at	rCCNG1	cyclin G1	2,12	
B	rc_AA997608_at	rSERPINB6*	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6 (spi3)	2,70	Bengtson, 2002
C	rc_AI104875_at	rEYA2*	eyes absent 2 homolog (Drosophila)	11,30	
A	AF014503_at	rNUPR1	nuclear protein 1 (p8)	8,91	Este trabalho
A	J03752_at	MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	2,59	
A	rc_AI011498_at	rSMARCD2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily D, member 2 (BAF60B)	5,90	
C	rc_AI172447_at	rNFKBIA	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I κ B α)	2,75	
A	X63594cds_at	rNFKBIA	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I κ B α)	2,62	
A	X63594cds_g_at	rNFKBIA	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I κ B α)	2,29	
B	rc_AA998352_s_at	rRHOB	ras homolog gene family, member B	2,66	
A	S61868_at	rSDC4	syndecan 4	2,13	
C	rc_AI172473_at	rSMARCD1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily D, member 1 (BAF60A)	0,42	
C	rc_AI230460_at	rMLP1	MARCKS-like protein 1	0,33	
A	rc_AI102795_at	rPTN	pleiotrophin	0,0083	
A	M93669_at	rSCG2	secretogranin 2	0,0012	

Tabela 6 – Tabela-resumo mostrando a reprodução de resultados anteriormente obtidos nos experimentos com “microarrays”. Genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 que já haviam sido identificados em outros trabalhos do nosso grupo, e que foram também encontrados como diferencialmente expressos no experimento de hibridização de “microarrays” Affymetrix. A razão da expressão relativa encontrada para cada um deles está indicada na tabela. Todos os genes isolados por Valentini, 1993 e Valentini & Armelin (1996) como diferencialmente expressos nas linhagens ST1 e P7, foram também detectados nos “arrays”. Dos 7 genes descritos por Vedoy & Sogayar (2002) como induzidos por glicocorticóides na linhagem ST1 (e menos expressos na linhagem P7), 6 deles também se confirmaram neste experimento. Dois genes identificados como sendo induzidos por ácido retinóico na linhagem ST1 *(Bengtson, 2002), também foram identificados como sendo mais expressos na linhagem ST1. Finalmente, todos os genes diferencialmente expressos previamente confirmados neste trabalho também constam na lista de genes diferencialmente expressos oriunda dos experimentos com “microarrays”. As letras minúsculas precedendo o “Gene Symbol” indica a espécie do ortólogo mais próximo (r = rato, m = camundongo, h = humano).

linhagem ST1, também devem estar, em tese, representados na lista de genes potencialmente diferencialmente expressos obtidas após a análise inicial dos resultados de hibridização dos “microarrays”.

A Tabela 6 resume os resultados que reproduzem achados neste e em trabalhos anteriores do grupo. Dos genes isolados como diferencialmente expressos por hibridização diferencial (Valentini & Armelin, 1996), todos os genes diferencialmente identificados como sendo induzidos por glicocorticóides na linhagem ST1, ou reprimidos por GC na linhagem P7 foram, também, identificados como sendo possivelmente diferencialmente expressos através de hibridização dos “microarrays”. Da mesma maneira, 6 dos 7 genes identificados por hibridização subtrativa (Vedoy & Sogayar, 2002), como sendo induzidos por GC na linhagem ST1, também foram identificados, nestes experimentos, como sendo diferencialmente expressos entre as duas linhagens. Interessantemente, dois dos 11 genes identificados como sendo induzidos por ácido retinóico na linhagem ST1 (Bengtson et al., manuscrito em preparação) são, também, diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7. Estes dados validam tanto a metodologia utilizada para geração dos novos dados obtidos, quando indica que o “cut-off” de expressão gênica escolhido gerou, provavelmente, uma lista de novos genes candidatos com grandes chances de se confirmarem como sendo genes verdadeiramente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7.

Entretanto, a falta de anotação para a maioria dos genes conhecidos é um problema inerente aos “microarrays” de alta densidade para estudos de expressão gênica em mamíferos que não humanos, tendo em vista que o genoma humano é o melhor conhecido, melhor anotado e com maior número de genes conhecidos de mamífero. Devido ao fato da conservação de conteúdo gênico, e da similaridade das seqüências codificantes serem relativamente altas entre os genomas de rato, camundongo e humano, (Gibbs et al., 2004; Lander et al., 2001; Waterston et al., 2002), o número expressivamente menor de genes conhecidos para rato e camundongo se deve, em grande parte, ao não conhecimento e à falta de anotação dos respectivos genes parálogos aos genes humanos, dos quais uma proporção maior do que em outros mamíferos já é conhecida.

Neste caso, dos mais de 24.000 transcritos de rato analisados pelo conjunto de “microarrays” utilizado, menos de 7.000 deles estão apropriadamente anotados e identificados. Utilizando-se um “cut-off” de 2,00, foi obtida uma lista de cerca de 1.300 “probe sets” de genes possivelmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7, sendo que as diferenças relativas de expressão dos genes

contidos nesta lista variaram de 2 a mais 3.000 vezes. Desta lista, cerca de apenas 25% dos genes constam como genes conhecidos, sendo o restante correspondente a transcritos de rato não identificados formalmente até o momento.

Foi feito, então, um esforço no sentido de anotar/re-anotar toda a lista de 1.300 genes possivelmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7. Para tanto, foi utilizada uma abordagem de reanotação baseada em similaridade de seqüência das sondas. Assim, a identidade de seqüência das sondas correspondentes a transcritos possivelmente diferencialmente expressos foi analisada através da busca de similaridade de seqüências num contexto genômico, onde a identidade de seqüências adjacentes à seqüência de interesse também foi levada em consideração. Para tanto, a interface gráfica de genomas da UCSC (genome.ucsc.edu) foi utilizada para o alinhamento das seqüências das sondas diferencialmente expressas contra o genoma de rato, primeiramente e, na ausência de um “match” com um gene conhecido, a mesma interface foi utilizada para analisar o alinhamento da mesma seqüência contra o genoma de camundongo e, por último, contra o genoma humano.

Vários motivos levaram à adoção desta estratégia de anotação, dentre eles: a) a maior parte das sondas de rato deste sistema de “arrays” correspondem a ESTs/cDNAs parciais de genes de rato ainda desconhecidos, mas com um correspondente parálogo conhecido em camundongo e/ou humano; b) o fato da maioria das sondas presentes nos “microarrays” utilizados corresponderem, mais frequentemente, às regiões 3’ e/ou não codificantes dos respectivos genes, onde a similaridade com genes parálogos conhecidos é significativamente baixa, o que não seria levado em consideração se a busca de seqüências similares à seqüência de interesse fosse feita no sentido estrito; c) a análise de seqüências genômicas adjacentes permite visualizar melhor as regiões genômicas compartilhadas entre genes diferentes, o “splicing” alternativo do gene em questão ou da própria seqüência da sonda analisada, e distingüir os múltiplos alinhamentos contra a seqüência genômica, quando for o caso.

A figura 13 ilustra uma tela da interface gráfica do genoma humano (UCSC), onde o processo de reanotação de uma sonda diferencialmente expressa correspondente a um gene não indentificado é demonstrada para exemplificar o racional utilizado. A EST de rato de código de acesso AA850917 consta como sendo 10,6 vezes mais expressa na linhagem ST1; entretanto, não é conhecido, nesta lista, a que gene corresponde o transcrito interrogado por esta sonda, estando a mesma anotada originalmente como “seqüência transcrita de rato”, nos bancos de dados

Figura 13 – Exemplo de re-anotação da EST de rato AA850917. Esta EST, está originalmente anotada nos “microarrays” como “sequência transcrita de rato”, sem nenhuma indicação adicional de função ou identidade. O alinhamento desta sequência contra o genoma do rato, através da interface gráfica BLAT (genome.ucsc.edu), mostra que esta EST, na verdade, corresponde à extremidade 3’ do transcrito de rato para fosfofrutoquinase 3 de rato, baseado no alinhamento com transcritos conhecidos de outros organismos e da sobreposição de ESTs do mesmo “cluster”.

dos “microarrays” Affymetrix®. Nesta interface, é possível verificar o alinhamento de seqüências de cDNA ou ESTs em que os exons são indicados por blocos sólidos, conectados por linhas (introns), simbolizando o alinhamento interrompido entre seqüências transcritas e o DNA genômico. As setas presentes ao longo dos introns apontam para a extremidade 3’ do gene.

O alinhamento da respectiva seqüência contra o genoma de rato (Figura 13), permite verificar que nas vizinhanças genômicas do sítio de alinhamento desta EST (seta vermelha), se encontra o gene da Fosfofructoquinase 3 de rato (PFKFB3, seta azul), que apresenta um último exon curto (seta vermelha vazada, indicando o fim do exon). O alinhamento, no mesmo locus, de seqüências de cDNA conhecidas de PFKFB3 de outros organismos (chave vermelha), une a extremidade 3’ dos transcritos conhecidos de PFKFB3 de rato (chave violeta) com o bloco de ESTs sem “splicing” ao qual a EST AA850917 se alinha (colchete vermelho). Logo, infere-se que a EST de rato AA850917 é, provavelmente, parte do transcrito de rato de PFKFB3. A presença de uma outras ESTs de rato alinhando na mesma região (setas violeta) reforça a idéia de existência de um último exon de PFKFB3 de rato mais longo, do qual a EST AA850917 faz parte. Alternativamente, é razoável interpretar que existem diferentes isoformas da mensagem de PFKFB3 em que o último exon pode ter extensões variáveis. Neste caso, o “probe set” da EST AA850917 interrogaria este transcrito hipotético com uma extremidade 3’UTR mais longa.

Um outro tipo de problema de identificação dos genes potencialmente diferencialmente expressos é a utilização, pelo fabricante, de nomenclatura não convencional para identificação das “probe sets” presentes nos “microarrays”. A Figura 14 ilustra um exemplo típico. A “probe set” derivada da EST de rato AI070068, que apresenta expressão relativa mais de 50 vezes maior na linhagem ST1, está originalmente anotada como sendo o gene “MyD118”, que, a princípio, não corresponde a um gene razoavelmente bem conhecido funcionalmente. Entretanto, utilizando a ferramenta Entrez – Gene do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, EUA, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene), foi possível verificar que este transcrito é, na verdade, GADD45 β , um inibidor de progressão no ciclo celular (Vairapandi et al., 2002) e também um gene-alvo de p53 (Carrier et al., 1999). Assim como este, vários outros genes-alvo de p53 foram caracterizados em outros trabalhos do nosso grupo (Vedoy & Sogayar, 2002), e a identificação de GADD45B na lista de genes diferencialmente expressos entre as

Acc. #	ST1/P7 ratio	Alfymetrix annotation
rc_AA944752_m	12,8	Rattus norvegicus transcribed sequence with weak similarity to protein ref NP_067285.1 (M. musculus) junction-mediating and regulator
rc_A012265_m	14,1	glutamine synthetase 1
rc_A044427_m	15,9	Rattus norvegicus transcribed sequence with moderate similarity to protein p11.49364 (H. sapiens) B49364 protein kinase (EC 2.7.1.3)
rc_AA950505_m	17,6	Rattus norvegicus transcribed sequence with weak similarity to protein ref NP_068564.1 (M. musculus) interferon-inducible GTPase [M
rc_AA925360_m	18,1	rc_AA925360 ULR-A1-ee-c-06-0-U1 s1 Rattus norvegicus cDNA, 3' end/clone=ULR-A1-ee-c-06-0-U1 /done_end=3' /gb=AA925360 /g
rc_A008321_m	18,3	Rattus norvegicus transcribed sequence with moderate similarity to protein p11.455204 (H. sapiens) A55204 transcription factor SOX9
rc_AA926260_m	24,4	Rattus norvegicus transcribed sequences
rc_AA926109_m	24,6	Rattus norvegicus transcribed sequences
rc_AA921119_m	24,7	Rattus norvegicus similar to Protein C20orf160 (LOC311550), mRNA
rc_AA924157_m	35,8	Rattus norvegicus transcribed sequence with weak similarity to protein ref NP_073582.1 (H. sapiens) Fanconi anemia, complementat
rc_AA927330_m	40,1	Rattus norvegicus transcribed sequences
rc_A044631_m	43,3	Rattus norvegicus similar to T-cell surface glycoprotein CD3 gamma chain precursor (T-cell receptor T3 gamma chain) (LOC300678),
rc_A070060_m	51,4	Rattus norvegicus similar to MyD118 (LOC299626), mRNA
rc_A032727_m	77,2	Rattus norvegicus transcribed sequences
rc_A069103_m	81,9	Rattus norvegicus transcribed sequences
rc_A099530_m	122,8	Rattus norvegicus transcribed sequence with weak similarity to protein p11.115963.1 (H. sapiens) ddy-30-like protein [Homo sapiens]
rc_AA927019_m	288,7	Rattus norvegicus transcribed sequences
rc_AA955403_m	527,5	Rattus norvegicus transcribed sequence with moderate similarity to protein p11.455204 (H. sapiens) A55204 transcription factor SOX9
rc_A012922_m	1269,5	peroxisome proliferator activated receptor, gamma

NCBI Entrez Gene

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure

Search for

Display Show Send to

All: 1 Genes Genomes: 1 SNP GeneView: 1

1: GADD45B growth arrest and DNA-damage-inducible, beta [Homo sapiens]
 GeneID: 4616 Locus tag: [HGNC:4096](#); [MIM: 604948](#)

Summary

Official Symbol: GADD45B and Name: growth arrest and DNA-damage-inducible, beta provided by [HUGO](#)
[Committee](#)

Gene type: protein coding
 Gene name: GADD45B
 Gene description: growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
 RefSeq status: Reviewed
 Organism: [Homo sapiens](#)
 Lineage: [Eukaryota](#); [Metazoa](#); [Chordata](#); [Craniata](#); [Vertebrata](#); [Euteleostomi](#); [Mammalia](#); [Eutheria](#); [Primates](#); [Carnivora](#); [Rodentia](#); [Muridae](#); [Homo](#)

Gene aliases: MYD118; GADD45BETA; DKFZP566B133

Summary: This gene is a member of a group of genes whose transcript levels are increased following stressful and treatment with DNA-damaging agents. The genes in this group respond to environmental stresses by mediating p38/JNK pathway. This activation is mediated via their proteins binding and activating MTK1/MEKK4 kinase activators of both p38 and JNK-MAPKs. The function of these genes or their protein products is involved in the

Figura 14 – Exemplo de re-anotação da EST de rato AI070060. Originalmente, esta EST que está super-expressa (>50x) foi anotada como “similar ao cDNA MyD118”, sem nenhum significado aparente. A consulta no da base de dados “Entrez-Gene” do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene) revelou se tratar de um sinônimo para o gene GADD45B, um inibidor de ciclo celular e também um gene-alvo de p53.

linhagens ST1 e P7, reforça a noção de que p53 também deve desempenhar, direta ou indiretamente, um papel relevante durante a reversão fenotípica induzida por GC.

De posse de uma lista de genes candidatos devidamente re-anotada e restringida (expressão diferencial $\geq 2,00$ entre as duas linhagens), a próxima etapa foi analisar a lista de genes buscando a seleção de um conjunto bem mais restrito de genes cuja expressão diferencial seria confirmada por outra metodologia, no caso Q-PCR. Neste contexto, experimentos paralelos, que serão discutidos mais adiante, evidenciaram que as diferenças entre as linhagens ST1 e P7 vão muito além da responsividade a GC, e apresentam, por exemplo, diferentes potenciais tumorigênicos a julgar por ensaios de tumorigenicidade *in vivo*, utilizando camundongos *nude*. Esta outra diferença fenotípica entre as linhagens, aliada ao interesse em se extrair desses dados informações que tivessem aplicabilidade clínica, norteou a escolha do conjunto de genes a serem confirmados por outras metodologias como sendo diferencialmente expressos.

Desta maneira, ao analisar a lista de genes possivelmente diferencialmente expressos obtida, chamou a atenção, inicialmente, a expressão aumentada de diversos receptores de fatores de crescimento peptídicos na linhagem P7, além de vários genes relacionados à migração de células e desenvolvimento do sistema nervoso central. Por outro lado, também se observou, na linhagem ST1, maior expressão de genes relacionados a regulação negativa da proliferação celular e supressão tumoral, assim como genes que são conhecidos alvos de p53, por exemplo, o que novamente reproduz achados anteriores do grupo em que vários genes-alvo de p53 foram isolados como sendo responsivos a GC (Vedoy & Sogayar, 2002).

Interessantemente, vários dos genes relacionados a fatores de crescimento, com expressão marcadamente maior na linhagem P7, correspondem a genes já conhecidos como estando envolvidos no desenvolvimento e progressão de gliomas humanos através de mutações do tipo ganho de função, amplificação ou superexpressão. Em contrapartida, vários dos genes com expressão maior na linhagem ST1 correspondem a genes supressores de tumor cuja função está frequentemente comprometida em gliomas humanos, seja por mutação do tipo perda de função, deleção ou repressão de expressão. Por outro lado, as linhagens ST1 e P7 são linhagens originadas de subclones isolados a partir da linhagem C6 que, *a priori*, foi descrita como uma linhagem clonal (Benda et al., 1968). Desta maneira, inferiu-se que os grandes contrastes nos perfis de expressão gênica observados entre as duas linhagens sejam, mais provavelmente, consequência de um conjunto

limitado de alterações genéticas. Estas alterações, eventualmente circunscritas a alguns genes, teriam levado à mudança do perfil transcricional entre as duas linhagens, através de múltiplas interações regulatórias dos produtos gênicos e em diversos níveis.

Assim, a análise comparativa dos perfis de expressão gênica entre as linhagens poderia, então, se constituir de um modelo para o estudo de novas interações funcionais entre genes conhecidamente já envolvidos com o desenvolvimento de gliomas, uma vez que vários destes estão potencialmente diferencialmente expressos entre as duas linhagens. Baseado neste racional é que foram escolhidos uma grande parcela dos genes a serem estudados em maior detalhe, começando pela validação da expressão diferencial entre as linhagens ST1 e P7 através de Q-PCR.

A Tabela 7 sumariza os genes que foram selecionados para esta finalidade. Nesta tabela, constam os genes escolhidos para posterior validação com base na expressão diferencial indicada através dos experimentos de hibridização de “microarrays”, como de outros genes que foram selecionados para análise de expressão nas linhagens ST1 e P7 independentemente da presença dos mesmos na lista de genes diferencialmente expressos obtida dos “arrays”. Para os genes com indicação de expressão diferencial nos “arrays”, estão indicados na tabela os números de acesso e localização dos diferentes “probe sets” que apresentaram expressão diferencial entre as duas condições hibridizadas, assim como o nível de expressão diferencial de cada um deles.

Na mesma tabela, constam os outros genes que foram escolhidos para análise de expressão gênica por Q-PCR e que foram escolhidos, ou por estarem funcionalmente relacionados aos genes que de fato são diferencialmente expressos (ALK, AKT1, FGFs 1 e 2, PDGFs A – D, PDGFRB, MDK); ou por já terem sido identificados como sendo diferencialmente expressos por outras metodologias (STATs 1 e 5B, Brm, BRG1, BAF170); ou, ainda, por serem genes conhecidamente envolvidos com o desenvolvimento e progressão de gliomas (CDKN1A, CDKN2A, RB1, TP53), ainda que os mesmos não tivessem evidência de expressão diferencial entre as linhagens ST1 e P7. Foram ainda incluídos, na lista de genes a serem analisados por Q-PCR, alguns genes novos codificantes para helicases de DNA (CHDs 7 – 9, FANCM), para os quais não se possui, até o momento, informações a respeito do possível papel dos mesmos em proliferação e transformação celular. Por último, também foram desenhados “primers” para análise, por Q-PCR, dos genes que foram previamente confirmados por Northern Blot, neste trabalho, como sendo

NOVOS GENES SELECIONADOS PARA VALIDAÇÃO A PARTIR DOS EXPERIMENTOS COM "MICROARRAYS"						
Chip	Probe Set	Gene Symbol	Anotação	Dados dos "microarrays"		Razão ST1/P7
				Representação	Exp. Diferencial	
C	rc_AI104875_at	EYA2	eyes absent homolog 2 (Drosophila)	☑	☑	11,30
B	rc_AI070068_at	rGADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	☑	☑	51,39
A	rc_AA963447_at	rPTEN	phosphatase and tensin homolog	☑	☑	4,50
B	rc_AA850872_at					2,39
A	X91810_at	rSTAT3	signal transducer and activator of transcription 3	☑	☑	2,30
B	rc_AI012356_at					2,09
A	rc_AA891810_g_at	rRNF130	ring finger protein 130	☑	☑	0,000
A	rc_AA891810_at					0,002
C	rc_AI170244_at					0,017
A	rc_AA891884_at	rERBB3	avian erythroblastosis oncogene B 3	☑	☑	0,068
B	rc_AA924236_at					0,128
A	U52530_s_at					0,196
C	rc_AI235915_at	rFGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1	☑	☑	0,001
A	S54008_i_at					0,001
A	D12498_s_at					0,019
C	rc_AI145424_at	rFGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3	☑	☑	0,005
C	rc_AI145424_at					0,005
A	L32602_at	rOTX1	orthodenticle homolog 1 (Drosophila)	☑	☑	0,005
A	rc_AI232379_at	rPDGFRA	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	☑	☑	0,233
C	AA944099_s_at					0,255
A	Z14118cds_g_at					0,395
A	U04998_at	rPTPRZ1	protein tyrosine phosphatase, receptor type, Z polypeptide 1	☑	☑	0,019
A	U09357_at					0,022
B	rc_AA963664_at	rRELN	reelin	☑	☑	0,046
C	rc_AI112802_at					0,278
A	rc_AA893471_s_at					0,317
B	rc_AI044699_at	rRNF144	ring finger protein 144	☑	☑	0,037
A	AF041082_at	rROBO1	roundabout homolog 1 (Drosophila)	☑	☑	0,008
A	rc_AA860017_at					0,085
A	M93669_at	rSCG2	secretogranin 2	☑	☑	0,001
A	rU03491_at	rTGFB3	transforming growth factor, beta 3	☑	☑	0,110
A	U03491_g_at					0,297
Genes adicionais não filtrados como sendo diferencialmente expressos nos "microarrays"						
	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	☑			
	ALK	anaplastic lymphoma kinase (Ki-1)				
	BAF170	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2 (SMARCC2)	☑			
	BRG1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 (SMARCA4)	☑			
	BRM	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2 (SMARCA2)	☑			
	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	☑			
	CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16INK4, p14ARF)	☑			
	CHD7	chromodomain helicase DNA binding protein 7	☑			
	CHD8	chromodomain helicase DNA binding protein 8	☑			
	CHD9	chromodomain helicase DNA binding protein 9	☑			
	FANCM	Fanconi anemia, complementation group M	☑			
	FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)	☑			
	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	☑			
	MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	☑			
	PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	☑			
	PDGFB	platelet derived growth factor, B polypeptide (c-sis)	☑			
	PDGFC	platelet derived growth factor C	☑			
	PDGFD	platelet derived growth factor D	☑			
	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	☑			
	RB1	retinoblastoma 1	☑			
	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1	☑			
	STAT5B	signal transducer and activator of transcription 5B	☑			
	TP53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	☑			
"Housekeeping Genes"						
	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	☑		☑	
	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	☑			

Tabela 7 – Genes adicionais escolhidos para quantificação de expressão por Q-PCR nas linhagens ST1 e P7. Além dos genes previamente confirmados como sendo diferencialmente expressos por Northern Blot, um conjunto de novos genes foi escolhido para validação por Q-PCR, com base em indicação de expressão diferencial pelos experimentos com "microarrays" ou por possível relação funcional, independentemente de indicação de expressão diferencial. Os "housekeeping genes" utilizados nas análises por Q-PCR também estão indicados. Para os genes com indicação de expressão diferencial nos "arrays", o valor de expressão relativa, o "probe set" e a localização nos "chips" está apresentada.

diferencialmente expressos (BAF60A, BAF60B, I κ B α , MGST1, PTN, PTPRZ1, RhoB, SCG2).

Uma vez definido o conjunto de genes a serem analisados nas próximas etapas, foram desenhados “primers” para os mesmos para quantificação por Q-PCR, de acordo com o descrito no Item 3.2.4.1.

4.2.1.3. Análise global dos perfis de expressão gênica entre as linhagens ST1 e P7

A análise de expressão gênica em alta escala, viabilizada por avanços recentes nas tecnologias de construção e análise de “microarrays”, tem permitido o monitoramento da modulação dos níveis de expressão gênica em nível genômico. Paralelamente, novas metodologias têm sido desenvolvidas visando aprimorar e refinar a extração de significado biológico dos experimentos de expressão gênica “genome-wide”, como por exemplo a metodologia de GSEA [*Gene Set Enrichment Analysis*] (Subramanian et al., 2005), que permite a correlação de perfis de expressão gênica com o enriquecimento de categorias gênicas funcionais.

Neste particular, o programa “dCHIP”, utilizado para a análise dos resultados de hibridização de “microarrays” Affymetrix®, analisa o enriquecimento estatisticamente significativo de categorias gênicas funcionais dentro do conjunto de genes selecionado como sendo potencialmente diferencialmente expressos. Após detecção dos sinais de hibridização, e posterior normalização dos dados de expressão dos “microarrays”, os genes são filtrados de acordo com um “cut-off” estabelecido. Em seguida, o programa compara a representação de genes de categorias específicas na lista de genes filtrados, em comparação com a proporção original dos mesmos genes levando em conta todos os genes anotados dos “arrays”. A significância deste enriquecimento para categorias específicas é, então, calculada através da distribuição hipergeométrica (Cho et al., 2001; Tavazoie et al., 1999). Este tipo de análise, a partir dos dados de expressão das células ST1 e P7, gerou os dados apresentados nas Tabelas 4 e 5. Apesar da significância de testes deste tipo ser limitada pelo reduzido número de amostras comparadas (no caso, somente duas linhagens diferentes), foi possível verificar o enriquecimento de categorias de genes que coincidem tanto com os dados obtidos aqui por outras metodologias, como, também, é coerente com dados da literatura a respeito de genes transcricional e estruturalmente alterados em gliomas.

Na Tabela 4, estão apresentados os resultados para categorias gênicas funcionais, vias e domínios protéicos significativamente enriquecidos dentre os genes possivelmente diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7, onde podem ser vistos as frequências esperada e observada para cada um dos “clusters” funcionais, assim como o valor de significância estatística (*P-value*). É possível verificar, nesta tabela, que vários dos genes previamente identificados como sendo diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7, podem ser enquadrados em diversas categorias que se apresentam significativamente enriquecidas entre as duas linhagens.

Como será discutido mais adiante, foi dado maior ênfase, em análises posteriores em outras linhagens e tecidos, para genes codificantes de fatores de crescimento e seus receptores, que apresentaram expressão marcadamente maior na linhagem P7 e que, sabidamente, desempenham papel essencial no desenvolvimento dos gliomas. Estes genes se enquadram, direta e indiretamente, com diversas categorias funcionais e estruturais relacionadas na Tabela 4, como “enzyme-linked receptor protein signaling pathway”, “growth factor, receptor”, “intracellular signaling cascade”, etc. Estes resultados indicam que, pelo menos em parte, as categorias gênicas funcionais significativamente enriquecidas entre as linhagens ST1 e P7 são coerentes com os genes diferencialmente expressos identificados até então e, mais interessantemente, podem, também, refletir facetas biológicas potencialmente relevantes para o entendimento da doença humana.

Na Tabela 5, o mesmo tipo de resultado é mostrado para as regiões cromossômicas de rato, cujos genes estão significativamente enriquecidos na lista de genes diferencialmente expressos. Através da interface gráfica de genomas da Universidade da Califórnia em Santa Cruz - UCSC (genome.ucsc.edu), foram obtidas as coordenadas de cromossomos humanos sintênicas às regiões dos cromossomos de rato transcricionalmente enriquecidas nos “arrays”. A análise de regiões cromossômicas, transcricionalmente enriquecidas nos “arrays”, pode indicar a presença de aberrações cromossômicas (amplificações, deleções e translocações de trechos cromossômicos), quando os perfis de expressão analisados são oriundos de células ou tecidos tumorais.

Neste particular, é interessante destacar o enriquecimento de alguns segmentos de cromossomo de rato, que são sintênicos a regiões do cromossomo 7 humano que, frequentemente, é um alvo recorrente de aberrações cromossômicas em gliomas humanos (Liu et al., 1998a; Rossi et al., 2005; Suzuki et al., 2004). Em especial, o gene do receptor de EGF, na banda 7p12, é um dos genes mais

Ontologia Gênica				
Chip	Categoria	Freq. esperada	Freq. Observada	P-value
A	glutamate-ammonia ligase activity	4/3930	4/207	0,000007
A	acute-phase response	11/3930	4/93	0,000085
A	protein binding	125/3930	7/35	0,000089
A	enzyme linked receptor protein signaling pathway	34/3930	6/93	0,000118
A	defense response	98/3930	6/36	0,000219
A	ammonia ligase activity	7/3930	4/207	0,000224
A	acid-ammonia (or amide) ligase activity	7/3930	4/207	0,000231
A	signal transduction	349/3930	4/5	0,000285
A	response to biotic stimulus	105/3930	6/36	0,000320
A	intracellular signaling cascade	187/3930	5/14	0,000326
A	cell adhesion	58/3930	7/93	0,000372
A	response to pest/pathogen/parasite	38/3930	6/93	0,000391
A	immune response	80/3930	7/71	0,000518
A	ligase activity	43/3930	5/66	0,000674
A	extracellular	65/3930	7/93	0,000753
A	response to stress	62/3930	6/71	0,000777
A	binding	1269/3930	45/93	0,000788
A	carbon-carbon lyase activity	24/3930	4/71	0,000791
A	lyase activity	66/3930	7/93	0,000827
A	cell communication	468/3930	7/15	0,000886
A	cell communication	468/3930	4/5	0,000900
A	ligase activity, forming carbon-nitrogen bonds	27/3930	5/114	0,000911
B	protein binding	28/550	7/24	0,000078
B	biosynthesis	14/550	5/24	0,000158
B	metalloendopeptidase inhibitor activity	6/550	45/49	0,000735
B	endopeptidase inhibitor activity	11/550	4/24	0,000755
B	protease inhibitor activity	11/550	4/24	0,000755
C	calmodulin binding	9/640	4/20	0,000080
C	transcription factor activity	21/640	5/23	0,000529
C	transcription regulator activity	23/640	5/23	0,000834
Vias				
A	Glutamate_Metabolism	21/951	4/15	0,000206
A	Inflammatory_Response_Pathway	34/951	4/12	0,000552
B	Matrix_Metalloproteinases	6/96	4/10	0,000852
Domínios Protéicos				
A	Fibronectin, type III-like fold	81/4683	11/124	0,000007
A	Fibronectin, type III	83/4683	11/124	0,000009
A	Glutamine synthetase, catalytic domain	4/4683	4/260	0,000009
A	Glutamine synthetase, beta-Grasp domain	4/4683	4/260	0,000009
A	Dual specificity protein phosphatase	8/4683	5/260	0,000025
A	MAP kinase phosphatase	8/4683	5/260	0,000025
A	Rhodanese-like	14/4683	6/260	0,000057
A	Type II fibronectin collagen-binding domain	11/4683	4/124	0,000134
A	Aldehyde dehydrogenase	30/4683	8/260	0,000163
A	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor	31/4683	6/136	0,000217
A	Fibronectin, type I	8/4683	4/260	0,000544
A	Plexin/semaphorin/integrin	8/4683	4/260	0,000544
A	EGF-like domain	129/4683	17/260	0,000681
A	Growth factor, receptor	22/4683	4/91	0,000747
A	Basic helix-loop-helix dimerization domain bHLH	75/4683	5/48	0,000922
A	WW/Rsp5/WWP domain	9/4683	4/260	0,000937
B	Tissue inhibitor of metalloproteinase	6/849	4/71	0,000595
B	TIMP-like OB-fold	6/849	4/71	0,000595
C	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate MARCKS	6/1027	4/69	0,000254
C	Zn-finger, C2H2 type	23/1027	5/35	0,000742

Tabela 4 – Resultados de categorias gênicas enriquecidas nos experimentos de hibridização dos "microarrays" Affymetrix®. Esta tabela indica diversas categorias funcionais, bioquímicas e estruturais que foram significativamente enriquecidas na lista final de genes diferencialmente expressos. O nível de significância estatística para esta análise (*P-value*), está indicado na tabela, assim como as frequências esperada e observada de enriquecimento, e o "chip" que contém cada uma das categorias significativamente enriquecidas.

Chip	Cromossomo Rato	Cromossomo Humano	Freq. esperada	Freq. observada	P-value
A	10q12	16 (p13.3-p13.2) 5 (q34-q35.2)	53/5554	14/316	0,000757
A	13q22	1 (q24.2-q25.2)	21/5554	4/97	0,000417
A	5q34	1 (p32.3-p32.1)	9/5554	4/157	0,000069
A	chr 10	16 (p13.3-p13.11) 5 (q23.3-q33.2) 17 (p13.3-p12)	451/5554	28/159	0,000063
A	10q	16 (p13.3-p13.11) 5 (q23.3-q33.2) 17 (p13.3-p12)	443/5554	28/159	0,000046
A	10q22	17p11.2 5 (q33.1-q33.2) 5q35.3 1q42.13	55/5554	14/316	0,000001
B	chr 4	7 (q11.23-q36.1) 4 (q22.1-q22.3) 2 (p13.3-p11.2) 3 (p26.3-p25.2) 10q11.21 12 (p13.2-p11.22)	100/1741	4/8	0,000601
B	4q	7 (q11.23-q36.1) 4 (q22.1-q22.3) 2 (p13.3-p11.2) 3 (p26.3-p25.2) 10q11.21 12 (p13.2-p11.22)	98/1741	4/8	0,000555
B	chr 7	12 (q13.3-q23.3) 8 (q22.1-q24.3) 19p13.2 22 (q12.3-13.33) 12 (q12-q13.2)	98/1741	4/8	0,000555
B	7q	12 (q13.3-q23.3) 8 (q22.1-q24.3) 19p13.2 22 (q12.3-13.33) 12 (q12-q13.2)	98/1741	4/8	0,000555
B	7q13	12 (q21.31-23.3)	20/1741	5/43	0,000085
C	7q13	12 (q21.31-23.3)	15/2058	5/108	0,000715
C	10q22	17p11.2 5 (q33.1-q33.2) 5q35.3 1q42.13	28/2058	5/54	0,000640
C	chr 6	2 (q25.3-q22.3) 7 (p21.3-p21.1) 14 (q11.2-q32.33) 7q36.3	97/2058	10/54	0,000144

Tabela 5 – Resultados de regiões cromossômicas transcricionalmente ativas enriquecidas nos experimentos de hibridização dos "microarrays" Affymetrix®. Esta tabela indica regiões cromossômicas de rato significativamente enriquecidas ($p \leq 0,001$) para genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7. As frequências esperadas e observadas estão apresentadas na tabela, assim como o nível de significância estatística (*P-value*), as regiões sintênicas correspondentes nos cromossomos humanos e o "chip" que contém o "cluster" genômico enriquecido.

comumente amplificados em gliomas humanos, tanto em linhagens celulares quanto em amostras clínicas de DNA tumoral (Bigner et al., 1990; Bigner et al., 1987; Henn et al., 1986; Lopez-Gines et al., 2005; Schrock et al., 1994). Segmentos da banda 22q do cromossomo humano, por outro lado, são, também, frequentemente deletados em gliomas humanos (Hartmann et al., 2004; Ino et al., 1999; Roversi et al., 2005; Schrock et al., 1994; Seng et al., 2005), embora o(s) gene(s) alvo desta região em gliomas ainda seja controverso. Ainda que de significância estatística discutível, o fato destas categorias gênicas enriquecidas corroborarem informações independentemente descritas para gliomas humanos, sugere que as múltiplas diferenças moleculares entre as linhagens ST1 e P7, assim como a metodologia utilizada, pode fornecer novas informações eventualmente relevantes para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese de gliomas.

4.2.2. Quantificação de expressão gênica relativa por Q-PCR

4.2.2.1. Validação por Q-PCR de expressão gênica diferencial entre as linhagens ST1 e P7 de glioma de rato

Para a confirmação da expressão diferencial por Q-PCR dos genes escolhidos no item 4.2.1.2, foram obtidas quatro amostras independentes de RNA total das linhagens ST1 e P7 tratadas (ou não) com hidrocortisona por 24 horas, em meio de cultura contendo 5% SFB. Estas condições permitem verificar quais genes têm a sua expressão modulada pelo tratamento com hidrocortisona, assim como permite verificar, simultaneamente, quais genes são diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7, lembrando que as amostras de RNA utilizadas para realização dos experimentos de hibridização dos "microarrays" foram obtidos de ambas as linhagens celulares tratadas com Hy por 24h na presença de 5% SFB. A verificação da qualidade e integridade das preparações de RNA total utilizadas nesta etapa está ilustrada na Figura 2 e foi discutida no item 4.1.1.

Dados oriundos dos experimentos de hibridização de "microarrays" indicam que GAPDH é, também, um gene mais expresso na linhagem P7 em relação à linhagem ST1, o que dificulta a comparação de resultados de Q-PCR entre as duas linhagens celulares. O transcrito de HPRT1 foi, então, o escolhido como o controle interno mais próximo do ideal para quantificação de expressão gênica em amostras tumorais dentre vários outros "housekeeping genes" (de Kok et al., 2005), sendo que este resultado se reproduziu também nas nossas amostras. No cálculo final dos

resultados apresentados, o cDNA preparado a partir da condição ST1 – Controle foi adotado como amostra calibradora (expressão relativa média = 1,00).

Na figura 15 estão apresentados os resultados de expressão relativa obtidos para 6 dos 10 genes anteriormente confirmados, por Northern Blot, como sendo diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7. Como pode ser visto nesta figura, foi possível confirmar, quantitativamente, a expressão diferencial de todos estes genes, e verificar que o padrão de expressão observado através de Northern Blots se manteve, ou seja, que os genes mais expressos na linhagem ST1 ($\text{IkB}\alpha$, MGST1, RhoB, SDC4) são moduláveis pelo tratamento com hidrocortisona ao passo que os genes mais expressos na linhagem P7 (MLP1, SCG2) não parecem sofrer alteração significativa pelo mesmo tratamento.

Na Figura 16, estão apresentados os resultados de análise de expressão dos genes relacionados com os PDGFs, sendo que dos seis genes apresentados, apenas o gene PDGFRA (cadeia α do receptor de PDGF) foi filtrado como tendo expressão maior na linhagem P7. Entretanto, foi possível verificar que tanto os genes codificantes para PDGF (PDGFs A – C), como o gene da cadeia β do receptor de PDGF são, também, mais expressos na linhagem P7 em relação à linhagem ST1. O gene codificante para a quinase AKT1, importante para a transdução de sinais mitogênicos de receptores de membrana via PI3K (Newton, 2004), também está mais expresso na linhagem P7 quando comparado com a linhagem ST1, o que é coerente com as diversas alças autócrinas de fatores de crescimento que estão, muito provavelmente, ativadas na linhagem P7. É interessante notar também que os genes de PDGFB e PDGFC, além de serem mais expressos na linhagem P7, independentemente do tratamento com Hy, são reprimidos por Hy na linhagem ST1, o que pode contribuir, ao menos em parte, para a parada de crescimento observada durante a reversão fenotípica induzida pelo tratamento com Hy. Na linhagem P7, o gene de PDGFC também parece sofrer uma ligeira repressão pelo tratamento com Hy. Além disso, não foi possível detectar a expressão do gene de PDGFD em nenhuma das linhagens analisadas.

Na Figura 17, estão apresentados os resultados de expressão relativa relacionados aos FGFs. Neste caso, os receptores 1 e 3 de FGF, tiveram indicação de expressão intensamente maior na linhagem P7, o que se confirmou quando analisado por Q-PCR. Os transcritos de FGF 1 e 2, também selecionados para quantificação de expressão por representarem uma família de mais de 20 genes diferentes (Eswarakumar et al., 2005), apresentaram expressão relativa ligeiramente superior na linhagem P7, apesar de também serem detectados na linhagem ST1.

Figura 15 – Reconfirmação, por Q-PCR, de genes previamente identificados como diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7. Gráficos correspondentes aos níveis relativos de expressão dos genes previamente confirmados como sendo diferencialmente expressos na linhagem ST1 (IkB α , MGST1, RhoB, SDC4) ou na linhagem P7 (MLP1 e SCG2). As linhagens foram tratadas por 24h com 100 ng/mL de hidrocortisona (+Hy) ou com o veículo etanol 0,02% v/v (C), ambos na presença de 5% SFB. Os valores correspondem à média de quantificações realizadas em duplicata a partir de quatro preparações independentes de RNA. A condição ST1 (C) foi utilizada como calibrador, e o gene HPRT1 de rato foi adotado como controle interno.

Figura 16 – Expressão diferencial de genes relacionados a PDGF nas linhagens ST1 e P7. Gráficos correspondentes aos níveis relativos de expressão dos genes codificantes para os ligantes (PDGFA, B e C) e receptores (PDGFRA e B) de PDGF. A quantificação do gene AKT1, envolvido na transdução do sinal de PDGF, também está apresentada na figura. Não foi possível detectar, nestas condições, a expressão do transcrito relativo ao gene PDGFD. As amostras de RNA foram obtidas conforme descrito anteriormente. A condição ST1 (C) foi utilizada como calibrador, e o gene HPRT1 de rato foi adotado como controle interno.

FGF1 **FGF2** **FGFR1** **FGFR3**

Figura 17 – Expressão diferencial de genes relacionados a FGF nas linhagens ST1 e P7. Gráficos correspondentes aos níveis relativos de expressão dos genes codificantes para os ligantes (FGF1 e 2) e receptores (FGFR1 e 3) de FGF. Os FGFs 1 e 2 foram escolhidos por serem os mais conhecidamente envolvidos em tumores dentre os 22 genes codificantes para FGFs conhecidos. Os genes FGFR1 e 3 foram escolhidos dentre os 5 genes que codificam para receptores de FGF por serem os que apresentaram, nos “microarrays”, as diferenças de expressão mais significativas nas linhagens ST1 e P7. As amostras de RNA foram obtidas conforme descrito anteriormente. A condição ST1 (C) foi utilizada como calibrador, e o gene HPRT1 de rato foi adotado como controle interno.

Apesar de poder ser observado uma ligeira repressão da expressão por Hy destes fatores de crescimento na linhagem P7, é possível que a expressão dos respectivos receptores de fator de crescimento seja o fator limitante para a manutenção das alças autócrinas possivelmente presentes na linhagem P7. Como estes genes são abundantemente expressos nestas células, e não sofrem modulação significativa pelo tratamento com Hy, a ligeira repressão dos respectivos ligantes, provavelmente não é suficiente para promover a parada de crescimento da linhagem P7.

A Figura 18 mostra os resultados de expressão relativa de genes para os fatores de crescimento pleiotrofina e midquina (PTN e MDK), assim como dos seus respectivos receptores de membrana putativos (ALK e PTPRZ1). A quantificação de expressão do receptor de fator de crescimento ERBB3 e do fator de crescimento TGFB3, que apresentaram expressão diferencial nos “arrays”, está ilustrada na mesma figura. De um modo geral, assim como para os PDGFs e FGFs, foi possível verificar que a linhagem P7 expressa, também, quantidades bem maiores de todos estes fatores de crescimento e de seus respectivos receptores, sendo que as diferenças mais marcantes foram observadas para PTN e ALK. O gene ALK, em particular, foi incluído nestas análises por ter sido descrito como um dos receptores para PTN e MDK (Stoica et al., 2001; Stoica et al., 2002), apesar de não se ter encontrado, até então, indícios de expressão diferencial de ALK entre as linhagens ST1 e P7, uma vez que o mesmo gene não está representado nos “microarrays” utilizados. Além disso, a expressão diferencial dos genes TGFB3 e ERBB3 na linhagem P7 também foi confirmada por Q-PCR, expandindo ainda mais o grupo de alças autócrinas/parácrinas que podem estar em atividade sobretudo na linhagem P7.

Nas figuras 19 e 20, são apresentados os resultados relativos à quantificação da expressão de genes diversos relacionados ao remodelamento de cromatina. O gene Brm, que codifica para a subunidade catalítica do complexo remodelador de cromatina SWI/SNF, tem sido descrito, com uma frequência cada vez maior, como sendo um gene supressor de tumor em diversos tipos de tumores humanos (Lualdi et al., 2004; Medina et al., 2004; Modena et al., 2005; Reisman et al., 2005; Reisman et al., 2003; Roberts & Orkin, 2004; Savarese et al., 2005; Wang et al., 2004). Trabalhos anteriores do grupo (Ortis, 2002) demonstraram que Brm teria um papel funcional na reversão fenotípica induzida por GC na linhagem ST1, embora não tenha sido possível comprovar na época, devido a limitações técnicas de sensibilidade, que o transcrito de Brm de rato era regulado por hidrocortisona, ou diferencialmente expresso entre as linhagens ST1 e P7. Assim, a expressão do

Figura 18 – Expressão diferencial de outros receptores e fatores de crescimento nas linhagens ST1 e P7. Níveis relativos de expressão dos genes codificantes para os fatores de crescimento homólogos PTN e MDK, e seus respectivos receptores de membrana, ALK e PTPRZ1. Os níveis de expressão quantificados para o fator de crescimento TGFB3, e para o receptor da família do EGF, ERBB3, que também têm indicação de expressão diferencial, estão apresentados na mesma figura. A condição ST1 (C) foi utilizada como calibrador, e o gene HPRT1 de rato foi adotado como controle interno.

Figura 19 – Expressão diferencial de genes codificantes para sub-unidades do complexo remodelador de cromatina SWI/SNF nas linhagens ST1 e P7. Níveis relativos de expressão dos genes codificantes para as sub-unidades acessórias BAF60A, BAF60B e BAF170 e para diferentes regiões do gene codificante para a subunidade catalítica BRM do complexo SWI/SNF. A quantificação de expressão em pontos diferentes do gene BRM foi feita devido ao grande tamanho do mesmo e às evidências de existência de múltiplas isoformas de RNA geradas por “splicing” alternativo. A condição ST1 (C) foi utilizada como calibrador, e o gene HPRT1 de rato foi adotado como controle interno.

Figura 20 – Análise de expressão de genes diversos relacionados a estrutura e remodelamento de cromatina nas linhagens ST1 e P7. São apresentados os níveis relativos de expressão do gene BRG1, que codifica para uma outra subunidade catalítica do complexo SWI/SNF, dos novos fatores remodeladores de cromatina FANCM e CHD 7, 8 e 9, e também para o gene codificante para a proteína p8 (NUPR1), já confirmado anteriormente como sendo diferencialmente expresso entre as linhagens ST1 e P7. A condição ST1 (C) foi utilizada como calibrador, e o gene HPRT1 de rato foi adotado como controle interno.

transcrito de Brm de rato também foi quantificada nas linhagens ST1 e P7 através de Q-PCR, que possibilita a análise quantitativa de expressão de transcritos raros como este. Apesar deste gene estar representado nos “arrays” por cinco “probe sets” independentes, o sinal de hibridização obtido para cada uma destas sondas não foi intenso o suficiente para gerar resultados confiáveis de níveis de expressão. É possível que a representação relativamente alta deste gene de rato no “array” utilizado possivelmente esteja ligada ao fato de este ser um gene relativamente grande (~170 kb), contendo 34 exons e com uma forte indícios de transcrição de múltiplas isoformas diferentes de mRNA por efeito de *splicing* alternativo e por utilização de sítios alternativos de iniciação e terminação ao longo do gene (Colin et al., manuscrito em preparação; o transcrito completo de rBrm foi clonado e depositado sob o no. de acesso AY643746). Para a análise de expressão deste gene, foram desenhados, três diferentes pares de “primers”, em que seriam analisados, separadamente, os níveis de expressão relativos da isoforma canônica (*full length*) de Brm, de um transcrito alternativo truncado na região 5’ em relação ao transcrito canônico e, finalmente, de um par de primers que analisaria a região 3’ do gene, a qual é compartilhada por múltiplas isoformas de transcritos.

Como pode ser visto na Figura 19, os “primers” que amplificam preferencialmente o transcrito completo (*full length*) de Brm de rato revelaram tanto uma maior expressão deste gene na linhagem ST1, como uma indução dos seus níveis relativos pelo tratamento com hidrocortisona. Um outro par de “primers” que amplificam especificamente um transcrito alternativo de Brm truncado na região 5’, ao contrário, demonstrou modulação marginal de seus níveis relativos em relação ao tratamento com hidrocortisona mas, ainda assim, sendo preferencialmente expresso na linhagem ST1. Por fim, o par de “primers” desenhado na região 3’UTR comum do gene apresentou um resultado intermediário, muito provavelmente devido à região amplificada ser comum a diversos transcritos alternativos, os quais podem apresentar padrões de regulação bastante distintos. Além disto, o gene BRG-1, que codifica para uma proteína paróloga a Brm, também não apresentou evidências de expressão diferencial (Figura 20) o que, por outro, lado, também indica que a quantificação do transcrito de Brm foi bastante específica, apesar do alto grau de homologia entre os dois genes.

Outros genes relacionados a remodelamento de cromatina já tinham sido previamente confirmados, por “macroarrays” e Northern Blots, como sendo diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7; dentre eles o gene codificante para a proteína P8 e as subunidades BAF60A e BAF60B do complexo

SWI/SNF de mamífero. Estes genes apareceram, também, na lista de genes potencialmente diferencialmente expressos obtidas a partir dos “microarrays” e foram re-analizados por Q-PCR da mesma maneira que os demais genes. Como pode ser visto nas Figuras 19 e 20, o mesmo padrão de expressão observado por Northern Blot se reproduziu, novamente, nos experimentos de Q-PCR. Os genes P8 e BAF60B são mais expressos na linhagem ST1 e são, também, induzidos pelo tratamento com hidrocortisona, enquanto este mesmo efeito não é observado na linhagem P7. O transcrito correspondente ao gene BAF60A, por sua vez, foi reconfirmado como sendo mais expresso na linhagem P7 e não modulado pelo tratamento com hidrocortisona. Interessantemente, a proteína codificada pelo gene BAF60A parece atuar como um adaptador, conectando fisicamente o complexo remodelador de cromatina SWI/SNF aos proto-oncogenes c-Fos e c-Jun, os quais, por sua vez, são fatores de transcrição que dependem, ao menos em parte, do complexo SWI/SNF para modular a transcrição dos seus genes-alvo (Ito et al., 2001). Assim, a maior expressão de BAF60A na linhagem P7 potencialmente contribui para o maior potencial tumorigênico apresentado por esta linhagem.

Em virtude do possível envolvimento do gene Brm, e do complexo SWI/SNF com a reversão fenotípica tumoral-normal da linhagem ST1 (Ortis, 2002), e das relações cada vez mais descobertas deste complexo com os processos de proliferação e transformação celulares, foi iniciado um esforço no sentido de identificar novos genes humanos codificantes para domínios SNF2 de helicases de DNA e que teriam, em tese, potencial de estarem envolvidos em processos biológicos similares. Este trabalho, desenvolvido em paralelo com o projeto de doutoramento, levou à indentificação dos genes CHDs 7 – 9 e do gene FANCM que, na época, ainda não tinham eram conhecidos funcionalmente, nem tinham a seqüência completa dos respectivos transcritos. Sendo as linhagens C6/ST1/P7 um modelo experimental para o estudo da proliferação e transformação celular, foram desenhados, também, “primers” de Q-PCR para quantificação dos ortólogos putativos de rato desses mesmos genes. Para tanto, seqüências transcritas parciais dos ortólogos de rato foram identificadas através do alinhamento, contra o genoma de rato, de seqüências de cDNAs correspondentes aos respectivos genes humanos. Entretanto, como pode ser visto na Figura 20, nenhum destes genes apresentou diferença de expressão significativa entre as diferentes condições testadas com as linhagens de rato. Na mesma figura, também foi possível reconfirmar a expressão preferencial, na linhagem ST1, do gene codificante para a proteína associada à

cromatina P8 que, além disso, também é induzida por hidrocortisona na linhagem ST1, reproduzindo o que foi visto previamente nos experimentos de Northern Blot.

Por último, na Figura 21, estão apresentados os resultados de expressão diferencial obtidos por Q-PCR relativos a genes funcionalmente diversos. O gene EYA2, por exemplo, foi identificado por Bengtson (2002), como sendo induzido na linhagem ST1 durante a reversão fenotípica induzida por ácido retinóico. Interessantemente, foi possível verificar que EYA2 tem um nível basal de expressão na linhagem ST1 bem maior que na linhagem P7, enquanto que o tratamento com hidrocortisona aumenta ainda mais os níveis de expressão deste gene, enquanto o mesmo efeito não é observado na linhagem P7. A regulação de EYA2 por dois agentes diferentes, sugere a existência de um ponto comum nas vias que, uma vez ativadas, levam à reversão fenotípica da linhagem ST1.

Além disso, é possível verificar que os genes RELN e ROBO1, que são genes relacionados à migração e “homing” de células progenitoras neurais durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (Brose et al., 1999; Rice & Curran, 2001), também são mais expressos, de maneira exuberante, na linhagem P7. Adicionalmente, foi possível confirmar, também, a superexpressão do gene RNF130 (*RING Finger Protein 130*) na linhagem P7. Este gene codifica para uma proteína com provável atividade de E3-ubiquitina ligase, que foi identificada como sendo um gene induzido pelo hormônio LH em células de Leydig de rato (Guais et al., 2004). O gene parálogo em camundongo foi identificado como sendo diferencialmente expresso pela privação de Interleucina-3 em células dependentes desta citocina (Baker & Reddy, 2000), enquanto o parálogo em *Xenopus laevis* possui atividade de indução de diferenciação para a linhagem neural (Borchers et al., 2002), sendo que a atividade de ubiquitina ligase da respectiva proteína é essencial para este efeito. Entretanto, com exceção destes poucos trabalhos, o papel funcional deste gene ainda continua, em grande parte, desconhecido.

A Tabela 8 sumariza os resultados de expressão obtidos para todos os genes cuja expressão foi analisada nas linhagens ST1 e P7, onde pode ser visto o valor médio de expressão relativa, dado por $2^{-\Delta\Delta CT \pm \sigma}$ (Livak & Schmittgen, 2001), juntamente com a faixa de expressão diferencial calculada em função do desvio padrão propagado (σ), levando em consideração todas as quantificações em duplicata de cada uma das amostras, tanto do gene de interesse quanto do respectivo controle interno, que no caso foi o HPRT1 de rato. De um modo geral, vários dos genes para os quais foram desenhados “primers” puderam ter a sua expressão diferencial confirmada entre as linhagens ST1 e P7, conforme descrito

EYA2 **RELN** **RNF130** **ROBO1**

Figura 21 – Expressão diferencial de genes diversos nas linhagens ST1 e P7. São apresentados os níveis relativos de expressão dos genes: EYA2 que, além de apresentar indicação de expressão diferencial pelos experimentos com “microarrays”, também foi previamente identificado como sendo induzido por ácido retinóico na linhagem ST1 (Bengtson, 2002); RELN e ROBO1, que codificam para proteínas envolvidas com migração celular; e RNF130, que codifica para uma “RING finger protein”. A condição ST1 (C) foi utilizada como calibrador, e o gene HPRT1 de rato foi adotado como controle interno.

Gene	ST1		P7	
	Controle	+Hy (24h)	Controle	+Hy (24h)
AKT1	1,00 (0,79 ~ 1,27)	1,11 (0,94 ~ 1,32)	2,34 (1,73 ~ 3,15)	2,52 (2,10 ~ 3,03)
ALK	1,00 (0,92 ~ 1,08)	0,85 (0,81 ~ 0,89)	3,027 (2,627 ~ 3,487)	2,626 (2,393 ~ 2,881)
BAF170	1,00 (0,89 ~ 1,13)	1,22 (1,14 ~ 1,30)	1,05 (0,90 ~ 1,22)	1,09 (0,98 ~ 1,20)
BAF60A	1,00 (0,86 ~ 1,17)	1,00 (0,91 ~ 1,10)	2,27 (1,97 ~ 2,63)	2,56 (2,33 ~ 2,82)
BAF60B	1,00 (0,90 ~ 1,11)	2,75 (2,48 ~ 3,05)	0,40 (0,35 ~ 0,45)	0,57 (0,51 ~ 0,63)
BRG-1	1,00 (0,92 ~ 1,09)	1,04 (0,99 ~ 1,10)	1,32 (1,18 ~ 1,48)	1,17 (1,06 ~ 1,29)
BRM (ext. 3')	1,00 (0,90 ~ 1,12)	1,93 (1,79 ~ 2,07)	0,25 (0,21 ~ 0,31)	0,35 (0,30 ~ 0,40)
BRM (full length)	1,00 (0,74 ~ 1,35)	2,90 (2,33 ~ 3,60)	0,31 (0,25 ~ 0,38)	0,49 (0,37 ~ 0,64)
BRM (tr. alt.)	1,00 (0,78 ~ 1,29)	1,54 (1,21 ~ 1,95)	0,40 (0,30 ~ 0,54)	0,48 (0,37 ~ 0,62)
CDKN1A (p21)	1,00 (0,83 ~ 1,21)	1,57 (1,29 ~ 1,90)	1,73 (1,39 ~ 2,15)	1,76 (1,45 ~ 2,15)
CDKN2A (p14 ^{ARF})	ND	ND	ND	ND
CDKN2A (p16 ^{INK4})	ND	ND	ND	ND
CHD7	1,00 (0,90 ~ 1,11)	0,72 (0,67 ~ 0,78)	0,56 (0,48 ~ 0,66)	0,73 (0,62 ~ 0,87)
CHD8	1,00 (0,89 ~ 1,13)	1,07 (0,98 ~ 1,17)	1,38 (1,21 ~ 1,58)	1,21 (1,07 ~ 1,36)
CHD9	1,00 (0,84 ~ 1,19)	1,41 (1,16 ~ 1,71)	1,07 (0,95 ~ 1,20)	1,42 (1,28 ~ 1,58)
ERBB3	1,00 (0,82 ~ 1,22)	1,08 (0,93 ~ 1,26)	10,57 (9,13 ~ 12,23)	12,17 (10,57 ~ 14,01)
EYA2	1,00 (0,84 ~ 1,20)	2,65 (2,38 ~ 2,96)	0,13 (0,11 ~ 0,15)	0,12 (0,10 ~ 0,13)
FANCM	1,00 (0,82 ~ 1,22)	0,89 (0,72 ~ 1,10)	1,47 (1,11 ~ 1,95)	1,76 (1,50 ~ 2,07)
FGF1	1,00 (0,87 ~ 1,15)	1,24 (1,15 ~ 1,34)	2,42 (2,13 ~ 2,74)	1,19 (1,04 ~ 1,36)
FGF2	1,00 (0,88 ~ 1,14)	1,19 (1,08 ~ 1,31)	1,71 (1,49 ~ 1,97)	1,08 (0,96 ~ 1,21)
FGFR1	1,00 (0,74 ~ 1,34)	0,97 (0,72 ~ 1,30)	1,352 (1,087 ~ 1,681)	1,746 (1,498 ~ 2,024)
FGFR3	1,00 (0,73 ~ 1,37)	1,25 (0,89 ~ 1,75)	508 (434 ~ 593)	704 (639 ~ 777)
GADD45B	1,00 (0,91 ~ 1,10)	1,25 (1,13 ~ 1,39)	0,80 (0,68 ~ 0,94)	0,77 (0,67 ~ 0,87)
GAPDH	1,00 (0,90 ~ 1,11)	0,78 (0,74 ~ 0,83)	1,10 (0,97 ~ 1,25)	0,86 (0,77 ~ 0,96)
HPRT1	1,00 (0,89 ~ 1,12)	1,00 (0,94 ~ 1,07)	1,00 (0,86 ~ 1,16)	1,00 (0,89 ~ 1,12)
IKBA (NFKBIA)	1,00 (0,91 ~ 1,10)	2,61 (2,47 ~ 2,77)	0,59 (0,51 ~ 0,68)	0,94 (0,85 ~ 1,04)
MDK	1,00 (0,78 ~ 1,28)	0,79 (0,53 ~ 1,16)	2,29 (1,48 ~ 3,56)	3,36 (2,54 ~ 4,44)
MGST1	1,00 (0,85 ~ 1,18)	1,39 (1,15 ~ 1,68)	0,43 (0,34 ~ 0,54)	0,39 (0,33 ~ 0,47)
MLP1	1,00 (0,74 ~ 1,35)	1,60 (1,41 ~ 1,82)	9,63 (8,00 ~ 11,60)	8,72 (7,70 ~ 9,89)
OTX1	1,00 (0,85 ~ 1,18)	1,74 (1,62 ~ 1,87)	0,98 (0,79 ~ 1,22)	1,19 (1,07 ~ 1,32)
P8 (NUPR1)	1,00 (0,84 ~ 1,19)	2,62 (2,22 ~ 3,08)	0,25 (0,20 ~ 0,30)	0,20 (0,17 ~ 0,24)
PDGFA	1,00 (0,87 ~ 1,15)	1,07 (0,94 ~ 1,23)	2,55 (2,17 ~ 2,99)	2,31 (1,98 ~ 2,69)
PDGFB	1,00 (0,71 ~ 1,41)	0,38 (0,32 ~ 0,45)	4,17 (3,12 ~ 5,59)	2,72 (2,43 ~ 3,05)
PDGFC	1,00 (0,80 ~ 1,25)	0,12 (0,11 ~ 0,13)	1,84 (1,60 ~ 2,10)	2,02 (1,78 ~ 2,28)
PDGFD	ND	ND	ND	ND
PDGFRA	1,00 (0,85 ~ 1,18)	1,08 (0,97 ~ 1,21)	4,50 (3,90 ~ 5,19)	4,02 (3,56 ~ 4,53)
PDGFRB	1,00 (0,91 ~ 1,10)	1,40 (1,28 ~ 1,53)	8,08 (7,20 ~ 9,07)	6,49 (5,78 ~ 7,29)
PTEN	1,00 (0,90 ~ 1,11)	1,61 (1,44 ~ 1,81)	1,16 (1,03 ~ 1,31)	1,12 (1,00 ~ 1,27)
PTN	1,00 (0,83 ~ 1,20)	0,66 (0,55 ~ 0,78)	6,972 (5,872 ~ 8,278)	7,113 (6,027 ~ 8,394)
PTPRZ1	1,00 (0,90 ~ 1,11)	0,70 (0,63 ~ 0,77)	6,90 (6,19 ~ 7,69)	6,22 (5,32 ~ 7,26)
RB1	1,00 (0,89 ~ 1,12)	1,33 (1,26 ~ 1,40)	1,29 (1,12 ~ 1,48)	1,31 (1,15 ~ 1,48)
RELN	1,00 (0,92 ~ 1,08)	0,85 (0,81 ~ 0,89)	5,792 (4,998 ~ 6,712)	4,462 (4,061 ~ 4,903)
RHOB	1,00 (0,85 ~ 1,18)	6,10 (5,42 ~ 6,87)	1,98 (1,63 ~ 2,42)	2,02 (1,68 ~ 2,42)
RNF130	1,00 (0,71 ~ 1,41)	0,94 (0,84 ~ 1,04)	3,183 (2,527 ~ 4,009)	3,150 (2,734 ~ 3,629)
RNF144	ND	ND	ND	ND
ROBO1	1,00 (0,71 ~ 1,40)	0,72 (0,65 ~ 0,79)	1,623 (1,361 ~ 1,936)	1,701 (1,478 ~ 1,957)
SCG2	1,00 (0,65 ~ 1,53)	0,88 (0,73 ~ 1,05)	4,078 (3,320 ~ 5,009)	2,721 (2,275 ~ 3,253)
SDC4	1,00 (0,86 ~ 1,16)	4,61 (3,93 ~ 5,41)	1,25 (1,05 ~ 1,48)	2,26 (1,95 ~ 2,61)
STAT1	1,00 (0,80 ~ 1,25)	1,14 (0,98 ~ 1,33)	0,77 (0,65 ~ 0,91)	0,98 (0,82 ~ 1,17)
STAT3	1,00 (0,90 ~ 1,11)	1,37 (1,27 ~ 1,47)	0,70 (0,62 ~ 0,80)	0,82 (0,73 ~ 0,93)
STAT5B	1,00 (0,83 ~ 1,20)	1,02 (0,93 ~ 1,11)	0,82 (0,71 ~ 0,95)	0,71 (0,63 ~ 0,80)
TGFB3	1,00 (0,79 ~ 1,26)	0,78 (0,62 ~ 0,97)	4,17 (3,35 ~ 5,18)	6,21 (5,04 ~ 7,64)
TP53	1,00 (0,87 ~ 1,15)	0,91 (0,84 ~ 0,99)	1,10 (0,91 ~ 1,33)	0,88 (0,77 ~ 1,01)

Tabela 8 – Tabela-resumo dos níveis de expressão gênica relativos quantificados por Q-PCR nas linhagens ST1 e P7 de glioma de rato. Foram analisados os níveis de expressão gênica de todos os genes escolhidos para validação, em células tratadas com veículo etanol (Controle) ou com 100 ng/mL de hidrocortisona, por 24h e em 5% de SFB. Os resultados apresentados referem-se ao níveis médios de expressão de quatro amostras independentes de RNA em duplicata e, entre parênteses, está apresentada a faixa de expressão correspondente ao desvio padrão de expressão relativa. O desvio de expressão relativa foi calculado propagando-se o erro obtido em todas as quantificações realizadas. Os valores foram normalizados para o gene HPRT1, e a condição "ST1 - Controle" foi utilizada como amostra calibradora (ND = não detectado).

acima, independente de terem indicação de expressão diferencial. Além disso, foi possível verificar, para os genes diferencialmente expressos, a reprodução do mesmo padrão observado anteriormente. Para a maioria dos genes, o tratamento com glicocorticóides parece não interferir de maneira expressiva sobre os padrões de expressão gênica da linhagem P7, ao passo que todos os genes com expressão maior na linhagem ST1 também são regulados pelo tratamento com hidrocortisona.

Dentre os genes escolhidos para validação de expressão diferencial por Q-PCR, foram escolhidos, também, genes supressores de tumor cuja função está freqüentemente comprometida em gliomas humanos (Behin et al., 2003), como a fosfatase PTEN, e os supressores de tumor p14^{ARF}/p16^{INK4A} (CDKN2A), p21^{CIP1/WAF1} (CDKN1A), p53 (TP53) e pRb (RB1). Com as diversas amostras testadas, não foi possível detectar expressão dos transcritos correspondentes aos inibidores de ciclo celular p14^{ARF} e p16^{INK4A}, ao passo que só foram observadas diferenças marginais ou eventualmente desprezíveis nos níveis de expressão dos demais genes, o que sugere que as diferenças fenotípicas entre as linhagens ST1 e P7 não podem ser atribuídas à expressão diferencial de genes supressores de glioma clássicos, pelo menos no que diz respeito aos níveis "steady-state" dos transcritos relativos aos referidos genes, nestas linhagens. Interessantemente, (Savarese et al., 2005) descreve o estabelecimento de linhagens imortalizadas de cérebro de roedor através de indução com etilnitrosouréia, obtendo, recorrentemente, a geração de linhagens estabelecidas em que não se detecta a expressão de p14^{ARF} e p16^{INK4A}. Como a linhagem C6 também foi gerada através de indução de tumor *in vivo* com o carcinógeno etilnitrosouréia (Benda et al., 1968), é possível que a perda de expressão de p14^{ARF} e p16^{INK4A}, também detectada nas linhagens ST1 e P7, seja uma etapa fundamental dentro dos mecanismos moleculares de ação deste tipo de agente genotóxico.

Da mesma maneira, também não foram encontradas diferenças significativas para outros genes apontados como sendo potencialmente diferencialmente expressos na linhagem ST1 pelos experimentos de "microarrays", como o gene regulado por p53 GADD45B e os membros 1, 3 e 5B da família dos STATs (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Adicionalmente, também não se encontrou diferenças substanciais nos níveis de expressão do fator de transcrição OTX1 e da "RING finger protein" RNF144, constante na lista de genes com expressão diferencial na linhagem P7, de acordo com os experimentos de "microarrays".

Para verificar a relevância para a doença humana, tanto dos genes identificados como sendo diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7,

quanto para testar a validade destas possíveis novas interações gênicas, o próximo passo foi a análise, de vários destes mesmos genes, em linhagens humanas de glioma.

4.2.2.2. Análise de expressão gênica em linhagens de glioma humano.

Na busca de se estabelecer um paralelo entre o perfil de expressão gênica das linhagens de glioma de rato com os gliomas humanos, foram desenhados “primers” para analisar, em tecidos humanos, os mesmos genes isolados e confirmados quantitativamente nas linhagens de glioma de rato.

Para a análise de expressão gênica nas linhagens humanas, não se utilizou tratamento com glicocorticóides, uma vez que experimentos anteriormente realizados no laboratório demonstraram que as linhagens humanas são refratárias ao tratamento com estes hormônios. Vale ressaltar, neste ponto, que a maioria das linhagens de glioma humano, senão todas, não respondem, *in vitro*, ao tratamento com glicocorticóides (Nestler et al., 2002), como fazem a linhagem de glioma de rato ST1 e a respectiva linhagem parental, C6. A resposta a glicocorticóides é, sabidamente, um fenômeno tecido- e tipo celular-específico, e portanto, também não é desarrazoado postular que os mesmos tecidos (e seus respectivos tumores) também devem, provavelmente, responder de maneira diversa ao hormônio, variando de acordo com a espécie. Estas são, provavelmente, algumas justificativas para explicar a diferença de resposta a glicocorticóides que existe entre as linhagens de glioma de rato e as linhagens de glioma humano. Um outro fator ao qual também se atribui tal divergência, são as origens muito diferentes de todas estas linhagens. Enquanto as linhagens humanas de glioma se originaram de culturas primárias derivadas de peças cirúrgicas de tumores gerados naturalmente, a linhagem C6, que deu origem às linhagens ST1 e P7, foi induzida quimicamente, pela ação de um agente mutagênico (etilnitrosouréia) em animais, e sofreu sucessivas passagens alternadas de expansão *in vitro* e *in vivo* até adquirir pleno caráter transformado e tumorigênico. Neste processo, é provável que tenham sido selecionadas células com características moleculares distintas em relação àquelas obtidas a partir de culturas primárias de tumor.

Nestas análises, foram utilizadas três amostras independentes de RNA total extraídas de culturas em crescimento exponencial de linhagens de glioma humano, sem qualquer tipo de tratamento. A qualidade dos RNAs utilizados nesta etapa foi

Gene	Linhagens de glioma humano					
	A172	HOG	T98G	U343MG	U373MG	U87MG
AKT1	1,00 (0,82 ~ 1,22)	0,19 (0,15 ~ 0,25)	0,48 (0,35 ~ 0,65)	0,23 (0,18 ~ 0,29)	0,34 (0,27 ~ 0,41)	0,44 (0,31 ~ 0,62)
ALK	1,00 (0,59 ~ 1,69)	0,02 (0,02 ~ 0,03)	0,07 (0,05 ~ 0,09)	0,99 (0,74 ~ 1,33)	1,98 (1,40 ~ 2,82)	21,68 (13,80 ~ 34,07)
ARF (p14)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BAF170	1,00 (0,78 ~ 1,29)	0,10 (0,07 ~ 0,13)	0,21 (0,15 ~ 0,29)	0,21 (0,17 ~ 0,27)	0,22 (0,18 ~ 0,27)	0,28 (0,20 ~ 0,40)
BAF60A	1,00 (0,81 ~ 1,24)	0,14 (0,11 ~ 0,19)	0,25 (0,18 ~ 0,35)	0,28 (0,21 ~ 0,37)	0,31 (0,25 ~ 0,39)	0,23 (0,16 ~ 0,33)
BAF60B	1,00 (0,80 ~ 1,25)	0,08 (0,06 ~ 0,10)	0,26 (0,19 ~ 0,35)	0,27 (0,21 ~ 0,35)	0,09 (0,07 ~ 0,11)	0,19 (0,13 ~ 0,27)
BRG-1	1,00 (0,80 ~ 1,25)	0,10 (0,08 ~ 0,13)	0,21 (0,15 ~ 0,28)	0,32 (0,26 ~ 0,41)	0,31 (0,25 ~ 0,38)	0,28 (0,20 ~ 0,40)
BRM (extr. 3')	1,00 (0,82 ~ 1,22)	0,10 (0,07 ~ 0,13)	0,21 (0,14 ~ 0,31)	0,32 (0,25 ~ 0,42)	0,45 (0,34 ~ 0,59)	0,24 (0,17 ~ 0,33)
BRM (full length)	1,00 (0,80 ~ 1,26)	0,08 (0,06 ~ 0,12)	0,22 (0,15 ~ 0,32)	0,47 (0,34 ~ 0,64)	0,39 (0,31 ~ 0,50)	0,36 (0,25 ~ 0,52)
BRM (tr. alt.)	1,00 (0,80 ~ 1,24)	0,02 (0,01 ~ 0,02)	0,02 (0,01 ~ 0,03)	0,46 (0,37 ~ 0,58)	0,23 (0,18 ~ 0,28)	0,05 (0,04 ~ 0,07)
CD44	1,00 (0,78 ~ 1,27)	0,40 (0,31 ~ 0,53)	0,98 (0,73 ~ 1,31)	0,65 (0,51 ~ 0,84)	0,56 (0,45 ~ 0,69)	1,40 (0,98 ~ 2,01)
CDKN1A	1,00 (0,81 ~ 1,23)	0,03 (0,02 ~ 0,03)	0,02 (0,01 ~ 0,02)	0,11 (0,09 ~ 0,14)	0,07 (0,06 ~ 0,09)	0,43 (0,31 ~ 0,60)
CHD7	1,00 (0,82 ~ 1,22)	133,4 (103,0 ~ 172,9)	132,1 (95,4 ~ 182,7)	118,9 (93,5 ~ 151,1)	1.406 (1.136 ~ 1.742)	129,6 (91,3 ~ 184,2)
CHD8	1,00 (0,75 ~ 1,33)	0,31 (0,24 ~ 0,40)	0,45 (0,33 ~ 0,61)	0,28 (0,22 ~ 0,36)	0,60 (0,48 ~ 0,74)	0,38 (0,27 ~ 0,53)
CHD9	1,00 (0,81 ~ 1,24)	0,19 (0,14 ~ 0,26)	0,23 (0,17 ~ 0,32)	0,19 (0,15 ~ 0,25)	0,43 (0,34 ~ 0,54)	0,27 (0,19 ~ 0,38)
EGFR	1,00 (0,81 ~ 1,23)	0,18 (0,14 ~ 0,23)	0,43 (0,32 ~ 0,58)	0,79 (0,62 ~ 1,01)	0,17 (0,14 ~ 0,21)	0,31 (0,22 ~ 0,43)
ERBB3	1,00 (0,70 ~ 1,43)	14,89 (10,69 ~ 20,74)	0,03 (0,03 ~ 0,05)	0,09 (0,04 ~ 0,19)	0,80 (0,61 ~ 1,04)	0,03 (0,02 ~ 0,04)
FANCM	1,00 (0,82 ~ 1,22)	0,22 (0,17 ~ 0,29)	0,23 (0,17 ~ 0,31)	0,14 (0,10 ~ 0,20)	0,24 (0,19 ~ 0,31)	0,30 (0,21 ~ 0,42)
FGF1	1,00 (0,69 ~ 1,44)	0,01 (0,01 ~ 0,01)	0,54 (0,35 ~ 0,84)	0,21 (0,15 ~ 0,29)	13,52 (10,72 ~ 17,05)	5,22 (3,75 ~ 7,26)
FGF2	1,00 (0,81 ~ 1,24)	0,26 (0,20 ~ 0,33)	0,11 (0,08 ~ 0,15)	0,09 (0,07 ~ 0,11)	0,04 (0,03 ~ 0,05)	0,36 (0,26 ~ 0,51)
FGFR1	1,00 (0,82 ~ 1,22)	0,02 (0,01 ~ 0,02)	0,06 (0,04 ~ 0,10)	0,24 (0,18 ~ 0,31)	0,03 (0,02 ~ 0,03)	0,22 (0,15 ~ 0,33)
FGFR3	1,00 (0,81 ~ 1,24)	0,12 (0,09 ~ 0,15)	0,09 (0,06 ~ 0,13)	1,98 (1,56 ~ 2,50)	0,07 (0,05 ~ 0,09)	0,00 (0,00 ~ 0,00)
GADD45B	1,00 (0,78 ~ 1,28)	0,12 (0,09 ~ 0,16)	0,10 (0,07 ~ 0,15)	0,09 (0,07 ~ 0,12)	0,13 (0,11 ~ 0,16)	0,09 (0,07 ~ 0,13)
HPRT1	1,00 (0,82 ~ 1,22)	1,00 (0,76 ~ 1,32)	1,00 (0,73 ~ 1,36)	1,00 (0,78 ~ 1,28)	1,00 (0,81 ~ 1,23)	1,00 (0,70 ~ 1,43)
INK4A (p16)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MDK	1,00 (0,80 ~ 1,25)	8,24 (6,37 ~ 10,67)	25,78 (19,31 ~ 34,43)	0,02 (0,02 ~ 0,04)	5,10 (4,15 ~ 6,28)	0,43 (0,31 ~ 0,61)
MLP1	1,00 (0,79 ~ 1,27)	0,10 (0,08 ~ 0,13)	0,18 (0,13 ~ 0,25)	0,13 (0,11 ~ 0,17)	0,03 (0,03 ~ 0,04)	0,10 (0,07 ~ 0,14)
OTX1	1,00 (0,77 ~ 1,31)	0,26 (0,20 ~ 0,34)	0,26 (0,19 ~ 0,37)	0,68 (0,53 ~ 0,88)	0,12 (0,10 ~ 0,15)	0,21 (0,15 ~ 0,30)
P8	1,00 (0,79 ~ 1,26)	0,00 (0,00 ~ 0,00)	0,21 (0,16 ~ 0,28)	0,12 (0,09 ~ 0,15)	0,01 (0,01 ~ 0,01)	0,05 (0,04 ~ 0,07)
PDGFA	1,00 (0,80 ~ 1,25)	0,24 (0,18 ~ 0,31)	0,21 (0,15 ~ 0,30)	1,26 (0,96 ~ 1,64)	0,03 (0,02 ~ 0,04)	0,06 (0,04 ~ 0,09)
PDGFB	1,00 (0,81 ~ 1,24)	0,08 (0,06 ~ 0,10)	0,01 (0,01 ~ 0,01)	0,25 (0,19 ~ 0,31)	0,06 (0,05 ~ 0,07)	0,00 (0,00 ~ 0,00)
PDGFC	1,00 (0,79 ~ 1,26)	0,15 (0,11 ~ 0,20)	0,10 (0,07 ~ 0,15)	0,13 (0,10 ~ 0,17)	1,17 (0,89 ~ 1,54)	0,23 (0,16 ~ 0,34)
PDGFD	1,00 (0,79 ~ 1,27)	0,00 (0,00 ~ 0,00)	0,95 (0,70 ~ 1,28)	0,00 (0,00 ~ 0,00)	0,20 (0,16 ~ 0,24)	0,00 (0,00 ~ 0,00)
PDGFRA	1,00 (0,78 ~ 1,29)	0,03 (0,02 ~ 0,04)	1,58 (1,11 ~ 2,26)	0,16 (0,09 ~ 0,27)	37,84 (30,97 ~ 46,22)	0,35 (0,24 ~ 0,50)
PDGFRB	1,00 (0,80 ~ 1,25)	0,00 (0,00 ~ 0,00)	0,23 (0,17 ~ 0,31)	0,00 (0,00 ~ 0,01)	0,00 (0,00 ~ 0,00)	0,11 (0,08 ~ 0,16)
PTEN	1,00 (0,64 ~ 1,57)	68,28 (52,81 ~ 88,28)	129,0 (95,9 ~ 173,6)	16,72 (12,87 ~ 21,71)	16,72 (13,46 ~ 20,76)	156,9 (111,3 ~ 221,1)
PTN	1,00 (0,79 ~ 1,27)	0,00 (0,00 ~ 0,00)	1,54 (1,09 ~ 2,17)	8,14 (6,07 ~ 10,91)	32,11 (25,58 ~ 40,32)	4,30 (3,03 ~ 6,10)
PTPRZ1	1,00 (0,82 ~ 1,22)	0,12 (0,09 ~ 0,16)	0,33 (0,25 ~ 0,43)	13,86 (8,75 ~ 21,96)	7.795 (6.346 ~ 9.576)	0,26 (0,19 ~ 0,36)
RB1	1,00 (0,61 ~ 1,63)	0,07 (0,06 ~ 0,09)	0,38 (0,28 ~ 0,51)	0,49 (0,39 ~ 0,62)	0,38 (0,31 ~ 0,48)	0,17 (0,11 ~ 0,24)
RELN	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RNF130	1,00 (0,82 ~ 1,22)	0,22 (0,17 ~ 0,29)	0,14 (0,10 ~ 0,18)	0,18 (0,14 ~ 0,22)	0,27 (0,22 ~ 0,33)	0,00 (0,00 ~ 0,01)
RNF144	1,00 (0,81 ~ 1,24)	0,16 (0,11 ~ 0,21)	0,10 (0,08 ~ 0,14)	0,40 (0,29 ~ 0,53)	0,09 (0,07 ~ 0,13)	0,38 (0,27 ~ 0,54)
ROBO1	1,00 (0,70 ~ 1,42)	0,08 (0,06 ~ 0,12)	0,56 (0,40 ~ 0,80)	0,11 (0,08 ~ 0,14)	0,69 (0,54 ~ 0,88)	0,69 (0,45 ~ 1,06)
SCG2	1,00 (0,73 ~ 1,37)	0,00 (0,00 ~ 0,00)	0,13 (0,09 ~ 0,17)	0,06 (0,05 ~ 0,08)	9,38 (7,62 ~ 11,56)	0,03 (0,02 ~ 0,04)
SDC4	1,00 (0,82 ~ 1,23)	0,15 (0,12 ~ 0,19)	0,34 (0,25 ~ 0,45)	0,13 (0,10 ~ 0,17)	0,13 (0,10 ~ 0,17)	0,81 (0,58 ~ 1,13)
STAT1	1,00 (0,81 ~ 1,23)	0,12 (0,08 ~ 0,16)	0,27 (0,18 ~ 0,41)	0,17 (0,12 ~ 0,23)	0,17 (0,13 ~ 0,22)	0,95 (0,67 ~ 1,35)
STAT3	1,00 (0,79 ~ 1,27)	0,09 (0,07 ~ 0,12)	0,21 (0,15 ~ 0,28)	0,28 (0,22 ~ 0,36)	0,33 (0,27 ~ 0,40)	0,13 (0,09 ~ 0,18)
STAT5B	1,00 (0,79 ~ 1,26)	0,15 (0,12 ~ 0,21)	0,34 (0,23 ~ 0,50)	0,30 (0,23 ~ 0,39)	0,22 (0,17 ~ 0,30)	0,27 (0,19 ~ 0,38)
TGFB3	1,00 (0,80 ~ 1,25)	0,07 (0,05 ~ 0,10)	0,02 (0,01 ~ 0,03)	0,52 (0,41 ~ 0,66)	0,62 (0,50 ~ 0,77)	0,33 (0,23 ~ 0,48)
TP53	1,00 (0,74 ~ 1,36)	0,03 (0,02 ~ 0,04)	0,14 (0,10 ~ 0,19)	0,08 (0,06 ~ 0,11)	0,14 (0,11 ~ 0,19)	0,02 (0,01 ~ 0,03)

Tabela 9 – Tabela-resumo dos níveis de expressão gênica relativos quantificados por Q-PCR nas linhagens de glioma humano. Os resultados apresentados referem-se ao níveis médios de expressão para cada gene e linhagem e, entre parênteses, está apresentada a faixa de expressão correspondente ao desvio padrão de expressão relativa. Estão apresentados os dados finais referentes às quantificações de cada gene em duplicata, a partir de três amostras de RNA independentes. O desvio de expressão relativa foi calculado propagando-se o erro obtido em todas as quantificações realizadas. Os valores foram normalizados para o gene HPRT1, e a linhagem A172 foi utilizada como amostra calibradora (ND = não detectado).

verificada por fracionamento em gel desnaturante de agarose-guanidina (Figura 2), e seguiu os mesmos critérios descritos anteriormente (item 4.1.1).

Na Tabela 9, pode-se observar os valores médios de expressão gênica relativa e normalizada de cada um dos genes para cada uma das mesmas seis linhagens, a partir de três amostras independentes de RNA, quantificadas em duplicata. A faixa de expressão relativa, entre parênteses, representa, como na Tabela 8, o desvio padrão médio propagado de todas as quantificações realizadas para um mesmo gene e seu respectivo "housekeeping gene" que, no caso, foi o transcrito de HPRT1 humano, pelos mesmos motivos discutidos no item anterior. A linhagem A172 foi adotada como amostra calibradora para os cálculos de níveis relativos de expressão gênica. É possível observar, nesta tabela, que os níveis de expressão gênica variam intensamente entre as diferentes linhagens de glioma humano.

Assim como no caso das linhagens ST1 e P7, não foi possível detectar expressão dos transcritos codificantes para as proteínas inibidoras de ciclo celular p14^{ARF} e p16^{INK4A}, os quais, muito freqüentemente, estão deletados ou inibidos numa grande proporção de tumores, tanto de origem humana quanto murina (Sharpless, 2005). Da mesma maneira, não foi possível detectar expressão do gene RELN nas linhagens de glioma humano.

Além disso, não foi possível correlacionar os dados de expressão gênica obtidos a partir destas linhagens humanas com características fenotípicas das células, uma vez que as mesmas não respondem a glicocorticóides (Nestler et al., 2002) e, como será discutido adiante, também não se encontrou correlação dos níveis de expressão destes genes com o caráter tumorigênico das linhagens.

Conforme mencionado anteriormente, as linhagens ST1 e P7, por terem uma origem comum na linhagem clonal C6, podem se constituir em um modelo para a investigação de interações regulatórias entre genes relacionados a glioma. Se as correlações de níveis relativos de expressão gênica, primeiramente observadas nas linhagens de glioma de rato, também se verificarem nas linhagens humanas de glioma, um novo dado acerca da regulação de fatores envolvidos na patogênese de gliomas seria obtido e, assim, reforçar-se-ia a validade do modelo de rato para obter incursões acerca da doença humana e de novos alvos para o desenvolvimento terapêutico.

Em particular, buscamos verificar, nas linhagens humanas, a expressão dos genes que codificam para os fatores de crescimento/receptores, e que fossem membros das mesmas famílias nas quais observamos superexpressão na linhagem

P7, no caso: PDGF, FGF e pleiotrofina/midiquina (PTN/MK). Interessantemente, todas as linhagens estudadas expressam, simultaneamente, diversos fatores de crescimento e seus respectivos receptores, o que sugere a existência de uma gama de vias autócrinas de estimulação do crescimento potencialmente ativas nestas células.

Após quantificação da expressão de vários destes genes (Tabela 9), analisamos os resultados obtidos através de regressão linear entre os valores relativos de expressão obtidos para cada linhagem. Para tanto, foi aplicado o teste de correlação estatística de Pearson, em que foi testada a correlação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão relativa de todos os genes aos pares.

Desta análise, 6 dos 44 genes comparados entre si, apresentaram correlações recíprocas e positivas, formando um “cluster” que não apresentou correlação com quaisquer outros genes testados, como pode ser visto na Tabela 10 onde estão apresentados os valores de significância estatística de correlação de Pearson (p) entre as múltiplas comparações realizadas. Dentre estes genes, estão o fator de crescimento pleiotrofina (PTN), a proteína tirosina fosfatase do tipo receptor zeta 1 (PTPRZ1), que é um dos receptores de PTN, o transcrito codificante para a cadeia α do receptor de PDGF (PDGFRA), e por fim o fator de crescimento de fibroblastos ácido (FGF1). Este achado, é coerente com os resultados de expressão maior de todos estes mesmos genes na linhagem P7, e reforça a proposta de uma possível co-regulação entre diferentes alças autócrinas envolvendo fatores de crescimento peptídicos já relacionados aos gliomas humanos. Alternativamente, estes mesmos genes poderiam estar sendo regulados de forma independente através de um fator regulatório comum. Além disso, foram encontrados, também, valores de correlação positiva e significativa para o gene SCG2, que codifica para uma proteína que faz parte de grânulos de secreção de neurotransmissores em tecidos neuroendócrinos (Ozawa & Takata, 1995). Inesperadamente, o mesmo tipo de correlação foi também encontrada para o gene CHD7, uma nova helicase de DNA que foi descrita recentemente como um gene que, uma vez mutado, leva a uma síndrome de malformação hereditária (Vissers et al., 2004).

Conforme mencionado anteriormente, o gene CHD7 foi independentemente identificado como um novo gene de helicase com domínios SNF2 de DNA helicase. Visando a busca de indicações, através de expressão diferencial, de um possível papel do mesmo em proliferação e transformação celular, este gene foi incluído,

Figura 22 – Análise de expressão de genes com expressão coordenada em linhagens de glioma humano. Os gráficos representam os níveis relativos de expressão de genes que apresentaram co-expressão estatisticamente significativa entre si (CHD7, FGF1, PDGFRA, PTN, PTPRZ1 e SCG2). Para estas quantificações, foi utilizado RNA extraído de três coletas independentes de subculturas todas as linhagens em crescimento exponencial. A linhagem A172 foi utilizada como amostra calibradora, e o transcrito de HPRT1 humano foi adotado como controle interno.

	CHD7	FGF1	PDGFRA	PTN	PTPRZ1	SCG2
ALK	0,835	0,655	0,789	0,897	0,802	0,766
BAF170	0,611	0,778	0,763	0,668	0,742	0,889
BAF60A	0,725	0,828	0,885	0,788	0,864	0,985
BAF60B	0,423	0,520	0,558	0,488	0,537	0,672
BRG1	0,725	0,868	0,880	0,821	0,862	0,990
BRM (ext. 3')	0,998	0,897	0,838	0,909	0,856	0,712
BRM-TA	0,741	0,767	0,881	0,899	0,874	0,991
CDKN1A	0,502	0,790	0,626	0,568	0,615	0,742
CHD7	***	0,007	6,13E-05	0,001	3,15E-05	0,001
CHD8	0,873	0,775	0,711	0,894	0,739	0,600
CHD9	0,963	0,911	0,875	0,980	0,896	0,747
EGFR	0,300	0,315	0,388	0,472	0,378	0,468
ERBB3	0,788	0,580	0,727	0,580	0,753	0,717
FANCM	0,609	0,771	0,758	0,609	0,738	0,884
FGF1	0,007	***	0,007	0,010	0,007	0,009
FGF2	0,370	0,564	0,481	0,371	0,471	0,591
FGFR1	0,442	0,599	0,571	0,534	0,559	0,692
FGFR3	0,537	0,417	0,564	0,814	0,578	0,611
FL-BRM	0,797	0,957	0,944	0,958	0,931	0,931
GADD45B	0,618	0,706	0,769	0,635	0,750	0,899
MDK	0,928	0,704	0,916	0,725	0,875	0,842
MLP1	0,443	0,525	0,580	0,468	0,560	0,698
OTX1	0,307	0,303	0,399	0,447	0,395	0,494
P8	0,469	0,544	0,612	0,506	0,587	0,727
PDGFA	0,368	0,276	0,419	0,585	0,426	0,483
PDGFB	0,548	0,586	0,687	0,627	0,676	0,816
PDGFC	0,169	0,149	0,108	0,174	0,113	0,069
PDGFD	0,680	0,643	0,813	0,606	0,761	0,868
PDGFRA	6,13E-05	0,007	***	0,002	8,68E-07	2,72E-05
PDGFRB	0,475	0,595	0,618	0,480	0,591	0,730
PTEN	0,563	0,821	0,491	0,463	0,482	0,415
PTN	0,001	0,010	0,002	***	0,001	0,003
PTPRZ1	3,15E-05	0,007	8,68E-07	0,001	***	4,04E-05
RB1	0,791	0,798	0,947	0,922	0,921	0,939
RNF130	0,796	0,776	0,951	0,804	0,934	0,918
RNF144	0,359	0,535	0,466	0,471	0,461	0,577
ROBO1	0,759	0,469	0,631	0,777	0,664	0,561
SCG2	0,001	0,009	2,72E-05	0,003	4,04E-05	***
SDC4	0,383	0,774	0,474	0,408	0,458	0,550
STAT1	0,453	0,902	0,535	0,504	0,524	0,609
STAT3	0,836	0,890	0,999	0,909	0,978	0,872
STAT5B	0,507	0,617	0,654	0,564	0,629	0,772
TGFB3	0,744	0,628	0,622	0,579	0,622	0,511
TP53	0,680	0,745	0,840	0,705	0,816	0,967
Peso tumor	0,684	0,842	0,621	0,695	0,638	0,591

Tabela 10 – Correlação em pares de níveis relativos de expressão gênica em linhagens de glioma humano. Os níveis de expressão gênica relativos dos genes CHD7, FGF1, PDGFRA, PTN, PTPRZ1 e SCG2 foram determinados nas seis linhagens de glioma humano (A172, HOG, T98G, U87MG, U343MG e U373MG) utilizando-se Q-PCR e normalização pelo controle HPRT1. A seguir, foi realizado teste estatístico de correlação de Pearson entre todas as combinações de dados aos pares. O valor de significância de correlação (p), de cada uma das comparações, está apresentado na tabela. São considerados significantes valores de $p \leq 0,05$. O coeficiente quadrático de correlação de Pearson (R^2) foi superior a 0,85, para os pares que apresentaram correlação estatisticamente significativa.

também, nestas análises. Na Figura 22, os dados de expressão relativa para cada um destes 6 genes está apresentado graficamente, o que permite visualizar que a expressão dos mesmos, entre as diferentes linhagens, segue uma proporção direta. De fato, o coeficiente de correlação de Pearson (r) foi superior a 0,92 para as análises de correlação deste grupo de genes em particular.

Tendo em vista os resultados obtidos até o momento, de identificação de genes diferencialmente expressos em linhagens de glioma de rato e humano, assim como possíveis indícios de co-regulação entre genes importantes para o desenvolvimento de gliomas, o próximo passo foi a análise de expressão, destes mesmos genes, em amostras clínicas de tecido cerebral humano acometido por glioma. O racional aqui é que estas amostras reproduziriam, mas fidedignamente, os padrões de expressão gênica relacionados ao desenvolvimento e/ou progressão da doença humana *in vivo*, sem as modificações introduzidas pela adaptação ao cultivo *in vitro*, para o caso de linhagens celulares de um modo geral e, ainda mais, eliminando variáveis relativas à diferenças biológicas inter-espécies, no caso da linhagens de glioma de rato.

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

Dentro da perspectiva de se buscar, a partir dos resultados obtidos a partir de modelos *in vitro*, informações que se constituíssem em novas possibilidades de intervenção clínica em gliomas humanos, foram realizadas, também, análises de expressão, em amostras clínicas de glioma. Estas amostras foram obtidas em colaboração com o LIM-15 da Faculdade de Medicina da USP, liderado pela Profa. Dra. Suely Marie. Para tanto, foram utilizadas 9 amostras de astrocitoma pilocítico (OMS grau 1), 11 amostras de astrocitoma difuso (OMS grau 2), 11 amostras de astrocitoma anaplásico (OMS grau 3), 20 amostras de glioblastoma multiforme (OMS grau 4) e 13 amostras de cérebro humano não-tumoral, obtido a partir de cirurgias terapêuticas para epilepsia, num total de 64 amostras (Tabela 2). A classificação histopatológica destas amostras foi confirmada por patologistas especializados, previamente à extração de RNA total das mesmas, conforme descrito no Item 2. As preparações de RNA utilizadas nesta etapa foram analisadas conforme descrito no item 4.1.1.

Num primeiro momento, os primeiros genes cuja expressão relativa foi quantificada nestas amostras, foram aqueles que apresentaram correlação recíproca dos respectivos níveis de expressão em linhagens de glioma humano (Tabela 10).

CHD7 **PTPRZ1** **PDGFRA**

Figura 23 - Quantificação da expressão relativa dos genes CHD7, PTPTZ1 e PDGFRA em amostras clínicas de gliomas humanos e controles de cérebro não-tumoral. O transcrito de HPRT1 foi utilizado como controle interno, e a média da expressão relativa dos controles normais foi utilizada como amostra calibradora. Os asteriscos referem-se à significância estatística (teste ANOVA) dos níveis de expressão relativos quantificados nas amostras tumorais comparados com as amostras normais (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

FGF1

PTN

SCG2

Figura 24 - Quantificação da expressão relativa dos genes FGF1, PTN e SCG2 em amostras clínicas de gliomas humanos e controles de cérebro não-tumoral. O transcrito de HPRT1 foi utilizado como controle interno, e a média da expressão relativa dos controles normais foi utilizada como amostra calibradora. Os asteriscos referem-se à significância estatística (teste ANOVA) dos níveis de expressão relativos quantificados nas amostras tumorais comparados com as amostras normais (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Os gráficos ilustrados nas Figuras 23 e 24 se referem aos níveis de expressão relativa de cada um dos genes analisados para cada um dos pacientes, de acordo com o grau do respectivo tumor. O valor médio de expressão relativa dos controles não-tumorais (“Normais”) foi utilizado como amostra calibradora (expressão relativa = 1,00). A partir destes dados de expressão relativa, foi feita a análise estatística, utilizando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn, uma vez que alguns grupos de dados não apresentaram distribuição normal, de acordo com o teste de Kolmogorov e Smirnov. A significância estatística, indicada nas figuras, refere-se à comparação dos níveis de expressão relativa em cada um dos diferentes graus de tumor em relação às respectivas amostras não-tumorais.

Como pode ser visto nas Figuras 23 e 24, com exceção do gene SCG2, todos os outros genes testados apresentaram, nos gliomas, níveis relativos de expressão significativamente superiores em relação às amostras de tecido não-tumoral, com alta significância estatística na maioria dos casos. Não foram encontradas diferenças significativas de expressão gênica quando tumores de diferentes graus foram comparados entre si, o que indica que o grande aumento de expressão destes genes é, provavelmente, relacionado mais à condição tumoral do que ao estadiamento ou tipo histológico do tumor.

De posse dos dados de expressão relativa destes genes, cujos níveis se correlacionam reciprocamente nas linhagens de glioma humano, foi analisado, também, se as mesmas correlações entre níveis de expressão gênica se mantinham nas amostras clínicas. Os resultados destes estudos de correlação estão apresentados na Tabela 11. Como pode ser visto nesta tabela, várias das correlações testadas se mantiveram, sendo que para algumas em particular foram obtidos níveis de significância estatística muito altos, sugerindo, de fato, a existência de elos regulatórios e/ou funcionais entre estes genes.

Adicionalmente, os níveis de expressão relativa de outros genes também foram analisados nas amostras clínicas de glioma humano. Dentre estes genes, foi analisada a expressão dos genes Brm e BRG-1, codificantes para subunidades mutuamente exclusivas do complexo SWI/SNF de mamífero que, conhecidamente, tem atividade de supressão tumoral e cuja função está comprometida numa variedade de tumores humanos, conforme citado acima.

Como pode ser visto na Figura 25, a análise da expressão do gene Brm, utilizando diferentes “primers” que analisam regiões diferentes do mesmo gene, demonstrou que este gene não tem expressão significativamente diferente em

A) Teste de correlação de Pearson (p)

	FGF1	PDGFRA	PTN	PTPRZ1	SCG2
CHD7	0,0411	$4,66 \times 10^{-17}$	0,00969	$5,92 \times 10^{-9}$	ns
FGF1	-	0,0734	$1,11 \times 10^{-19}$	$3,02 \times 10^{-9}$	$1,54 \times 10^{-8}$
PDGFRA	-	-	0,0211	$5,25 \times 10^{-8}$	ns
PTN	-	-	-	$1,57 \times 10^{-14}$	$1,76 \times 10^{-10}$
PTPRZ1	-	-	-	-	$2,22 \times 10^{-6}$

B) Teste de correlação de Pearson (R²)

	FGF1	PDGFRA	PTN	PTPRZ1	SCG2
CHD7	0,066	0,682	0,103	0,423	0,012
FGF1	-	0,051	0,738	0,435	0,406
PDGFRA	-	-	0,083	0,382	0,035
PTN	-	-	-	0,617	0,484
PTPRZ1	-	-	-	-	0,305

Tabela 11 – Correlação em pares entre níveis relativos de expressão gênica em amostras clínicas de glioma. Os níveis de expressão gênica relativos dos genes CHD7, FGF1, PDGFRA, PTN, PTPRZ1 e SCG2 foram determinados para as 64 amostras clínicas utilizando Q-PCR e normalização pelo controle HPRT1. A seguir, foi realizado teste estatístico de correlação de Pearson entre todas as combinações de genes aos pares. Na tabela A, estão apresentados os valores de significância estatística de correlação de Pearson (p), de cada uma das comparações. São considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. Na tabela B, estão apresentados os coeficientes de correlação de Pearson elevados ao quadrado (R²), para os respectivos pares.

BRG1 **BRM***(full length)* **BRM***(extrem. 3')* **BRM***(transcrito alternativo)*

Figura 25 - Quantificação da expressão relativa dos genes BRG1 e Brm, utilizando diferentes pares de "primers", em amostras clínicas de gliomas humanos e controles de cérebro não-tumoral. O transcrito de HPRT1 foi utilizado como controle interno, e a média da expressão relativa dos controles normais foi utilizada como amostra calibradora. Os asteriscos referem-se à significância estatística (teste ANOVA) dos níveis de expressão nas amostras tumorais comparados com as amostras normais. Nenhuma significância estatística foi encontrada nestes testes. Os gráficos da esquerda apresentam os dados separados de acordo com a classificação OMS, e nos gráficos da direita os mesmos dados foram agrupados como gliomas de alto (graus 3 + 4) ou baixo grau (graus 1 + 2).

amostras de glioma humano, apesar dos níveis de expressão deste gene serem substancialmente modulados durante a reversão fenotípica tumoral-normal induzida por glicocorticóides na linhagem ST1, conforme foi apresentado no item 4.2.2.1. Da mesma maneira, não foi possível detectar expressão diferencial do gene BRG-1, nas mesmas condições. Os dados de expressão relativa em amostras clínicas estão apresentados tanto agrupados em gliomas de baixo e alto grau (Baixo grau = Graus 1+2; Alto grau = 3+4), como na forma de grupos contendo amostras de um único grau de tumor (Normal e Graus 1 a 4). Apesar de estes genes terem sido caracterizados como genes supressores de tumor que perdem função ou expressão em vários tipos de tumores, é possível estes genes não sejam, em gliomas, um alvo freqüente de mutações ou aberrações genéticas, o que contribuiria, ao menos em parte, para se obter resultados semelhantes aos apresentados.

Os genes apresentados nas figuras 23 e 24, com exceção do gene CHD7, são genes que foram originalmente identificados como sendo mais expressos na linhagem P7. Além de apresentarem correlação entre os níveis de expressão relativos, quando os mesmos foram analisados em linhagens de glioma humano, cinco dos seis genes são, também, mais expressos em gliomas humanos, quando comparado com cérebro humano não-tumoral. Assim, é possível inferir que, por este ponto de vista, a lista dos genes mais expressos na linhagem P7 de glioma de rato, comparada com a linhagem ST1, esteja enriquecida para outros genes com expressão aumentada em gliomas humanos.

Neste particular, alguns genes que têm expressão maior na linhagem P7 foram selecionados para análise de expressão, por Q-PCR, nas amostras clínicas de glioma humano, dentre eles: o gene ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), que é um dos receptores do fator de crescimento pleiotrofina, os receptores 1 e 3 de FGF (FGFR1 e FGFR3), o gene RNF130 (RING Finger Protein 130), que é uma ubiquitina ligase, o gene ROBO1 (*Roundabout 1*) e o gene RELN (*Reelin*), sendo estes últimos genes ligados à migração e “homing” de progenitores neurais durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (Long et al., 2004; Rice & Curran, 2001). Além disso, o gene codificante para o receptor de EGF foi quantificado, também, nas mesmas amostras, uma vez que o mesmo é classicamente superexpresso e amplificado em gliomas (Wong et al., 1987). Os resultados destas análises estão mostrados nas Figuras 26 e 27, em que os resultados das amostras clínicas estão agrupados conforme descrito para a Figura 25.

Como pode ser visto na Figura 26, a expressão de EGFR aumenta progressivamente de acordo com o aumento do grau de malignidade dos gliomas,

ALK **EGFR** **FGFR1** **FGFR3**

Figura 26 - Quantificação da expressão relativa dos genes ALK, EGFR, FGFR1 e FGFR3 em amostras clínicas de gliomas humanos e controles de cérebro não-tumoral. O transcrito de HPRT1 foi utilizado como controle interno, e a média da expressão relativa dos controles normais foi utilizado como amostra calibradora. Os asteriscos referem-se à significância estatística (teste ANOVA) dos níveis de expressão relativos quantificados nas amostras tumorais comparados com as amostras normais (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Os gráficos da esquerda apresentam os dados separados de acordo com a classificação OMS, e nos gráficos da direita os mesmos dados foram agrupados como gliomas de alto (graus 3 + 4) ou baixo grau (graus 1 + 2).

embora esta diferença seja estatisticamente significativa somente para os gliomas de alto grau. Este achado reproduz aquilo que já é conhecido na literatura, que é o envolvimento de EGFR no desenvolvimento e progressão de gliomas e, por outro lado, valida as amostras clínicas aqui utilizadas como sendo representativas daquilo que já é conhecido para a doença em questão. Na mesma figura, é possível verificar que o gene ALK, apesar de ser mais expresso nos gliomas em relação a cérebro normal, só apresenta expressão significativamente maior nos gliomas de grau 1 e 4 ou, então, nos gliomas de alto grau, quando os dados são agrupados. Já o receptor 1 para FGF (FGFR1) só é significativamente mais expresso nos astrocitomas pilocíticos (OMS grau 1), enquanto o transcrito do gene do receptor 3 para FGF (FGFR3) não apresentou expressão significativamente diferente em nenhuma das comparações.

Na Figura 27, é possível verificar que o transcrito da ubiquitina ligase RNF130 apresenta expressão significativamente maior nos gliomas de grau 1 e 4, ou em todos os gliomas quando os mesmos são agrupados em baixo e alto grau. O gene ROBO1 é, também, mais expresso em gliomas, mas esta diferença só é estatisticamente significativa para os glioblastomas (OMS grau 4) ou para todos os gliomas, quando os tumores são agrupados. Finalmente, o gene codificante para a proteína Reelina (RELN), apesar de ser bem mais expresso na linhagem P7, apresentou uma tendência a ser menos expresso de acordo com o grau de malignidade dos gliomas. Para os glioblastomas, esta menor expressão foi estatisticamente significativa.

RNF130

ROBO1

RELN

Figura 27 - Quantificação da expressão relativa dos genes RNF130, ROBO1 e RELN em amostras clínicas de gliomas humanos e controles de cérebro não-tumoral. O transcrito de HPRT1 foi utilizado como controle interno, e a média da expressão relativa dos controles normais foi utilizado como amostra calibradora. Os asteriscos referem-se à significância estatística (teste ANOVA) dos níveis de expressão relativos quantificados nas amostras tumorais comparados com as amostras normais (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Os dados foram analisados tanto separadamente por graus quanto agrupados em alto (graus 3 e 4) ou baixo grau (graus 1 e 2). Os gráficos da esquerda apresentam os dados separados de acordo com a classificação OMS, e nos gráficos da direita os mesmos dados foram agrupados como gliomas de alto (graus 3 + 4) ou baixo grau (graus 1 + 2).

4.3. Identificação e análise de expressão de novas helicases de DNA com domínios SNF2

O gene *Brm* codifica para uma helicase de DNA conservada desde leveduras (Laurent et al., 1993a; Laurent et al., 1993b). Esta helicase, é a sub-unidade catalítica de um complexo multiprotéico de alto peso molecular (~2 MDa) que participa de processos envolvendo remodelamento de cromatina e controle global de transcrição gênica (Cairns et al., 1994; Peterson et al., 1994). Os genes que codificam para as múltiplas subunidades deste complexo foram originalmente identificados em levedura por complementarem o fenótipo de leveduras mutantes incapazes de fermentar sacarose ou em induzir o fenótipo de acasalamento, o que levou à denominação do complexo SWI/SNF (Mating-Type SWItch/Sucrose Non-Fermenting) (Peterson et al., 1994).

Este complexo foi identificado originalmente em levedura e, em seguida, ortólogos foram identificados em *Drosophila* e em mamíferos, onde o papel do mesmo em remodelamento de cromatina e modulação de expressão gênica é conservado (Muchardt & Yaniv, 1993; Tamkun et al., 1992). Em mamíferos, um número crescente de trabalhos indica um envolvimento profundo do complexo SWI/SNF e dos genes codificantes para suas subunidades no controle de proliferação celular e oncogênese (Fribourg et al., 2000; Grand et al., 1999; Gunduz et al., 2005; Isakoff et al., 2005; Link et al., 2005; Medina et al., 2004; Muchardt et al., 1998; Nagl et al., 2005; Strobeck et al., 2000; Trouche et al., 1997; Wang et al., 2005).

O possível papel do gene *Brm* na reversão fenotípica tumoral-normal induzida por glicocorticóides na linhagem ST1 (Ortis, 2002), associado com a importância crescente do complexo SWI/SNF de mamífero, assim como outros complexos remodeladores de cromatina compostos por helicases com domínios SNF2 no controle da proliferação celular (Hamai et al., 2003; Leung et al., 2003; Moinova et al., 2002; Raabe et al., 2001; Stopka et al., 2000; Yano et al., 2004; Zhou et al., 2005), motivou a busca, num esforço paralelo, de identificação de novos genes codificantes para helicases com domínios SNF2.

Esta busca começou, inicialmente, pelo rastreamento de uma base de dados de sequenciamento em larga escala de cDNAs longos, pertencente ao “Kazusa DNA Research Institute” do Japão (www.kazusa.or.jp/huge/index.html). Esta iniciativa visa o isolamento, sequenciamento e catalogação de cDNAs humanos longos,

preferencialmente correspondentes a genes ainda não conhecidos (Kikuno et al., 2004; Ohara et al., 1997). Neste caso, foram buscados cDNAs que codificassem proteínas com domínios SNF2 e que correspondessem a genes ainda não conhecidos, o que levou à identificação, na época, dos cDNAs parciais KIAA0308, KIAA1416, KIAA1564 e KIAA1596, previamente isolados e sequenciados dentro do respectivo projeto de clonagem e caracterização de novos cDNAs humanos longos.

Paralelamente, foi descrito uma proteína de alto peso molecular em *Drosophila* denominada Kismet, que apresenta domínios semelhantes tanto a Brm de mamíferos quanto de *Drosophila* (Daubresse et al., 1999) (Figura 28A). Esta proteína foi, também, caracterizada em *Drosophila* como sendo uma grande subunidade com atividade de helicase dependente de ATP, que faz parte de um outro complexo multiprotéico com atividade remodeladora de cromatina (Daubresse et al., 1999; Therrien et al., 2000). Visando utilizar esta proteína como ponto de partida para a identificação de novas helicases humanas, a seqüência descrita desta proteína foi, então, alinhada contra o genoma humano, na busca dos respectivos ortólogos. Este alinhamento revelou quatro regiões genômicas com similaridade significativa, em diferentes cromossomos humanos (Figura 28B), sugerindo que este gene pode ter sofrido duplicações ao longo da evolução, que levaram à geração de diferentes parálogos.

Interessantemente, três destes quatro possíveis *loci* coincidem com as regiões genômicas onde se alinham três dos cDNAs parciais identificados acima (KIAAs 0308, 1416 e 1564), sendo que o alinhamento no cromossomo 20 humano corresponde a um gene codificante para uma nova helicase da família CHD (*Chromodomain helicase-DNA-binding proteins*) que, na época, havia sido recentemente descrito (Schuster & Stoger, 2002). Ao longo destes dois últimos anos, os mesmos *loci* foram anotados como correspondendo a novas helicases humanas da família CHD (CHDs 7–9) devido ao fato das seqüências completas dos respectivos transcritos terem sido isoladas independentemente por outros grupos ou, ainda, por terem sido geradas predições das seqüências para os respectivos mRNAs.

Para exemplificar, a Figura 28C ilustra o alinhamento do cDNA parcial KIAA1416 e da proteína Kismet de *Drosophila* no *locus* que foi, posteriormente, anotado como sendo o gene CHD7, o qual compreende uma região de aproximadamente 180 Kb no braço longo do cromossomo 8 humano. O gene CHD7 foi recentemente identificado, por clonagem posicional, como sendo causador da síndrome de CHARGE (Vissers et al., 2004), que é uma síndrome de malformação

hereditária. Contudo, neste trabalho não foi realizada a clonagem do cDNA completo correspondente a este gene, sendo baseado apenas em resultados de predições gênicas por Bioinformática. O grande tamanho da isoforma canônica de mRNA deste gene, excedendo 10 Kb, certamente representou um obstáculo técnico para o isolamento do respectivo cDNA completo.

A clonagem dos transcritos completos correspondentes aos cDNAs parciais "KIAA" supra citados, fez parte de um projeto paralelo (Colin & Sogayar, manuscrito em preparação) que, posteriormente, foi agregado ao tema deste trabalho de Doutorado. Tendo em vista a escassez de evidências funcionais para estes novos genes, foram desenhados "primers" para analisar a expressão dos mesmos por Q-PCR, visando encontrar, por meio da busca de sua expressão diferencial em diferentes linhagens e tecidos, indícios dos processos biológicos com os quais estes genes poderiam potencialmente estar envolvidos.

Desta maneira semi-empírica, foi possível observar que o transcrito de CHD7 apresentou, inesperadamente, níveis de expressão significativamente correlacionados com os níveis de FGF1, PDGFRA, PTN, PTPRZ1 e SCG2 (item 4.2.3) em linhagens de glioma humano e, ainda, foi detectado como sendo superexpresso em gliomas humanos, além de apresentar expressão significativamente correlacionada com genes conhecidamente envolvidos com gliomas, como PDGFRA, PTN e PTPRZ1 (item 4.2.4).

Para elucidar a estrutura completa dos transcritos correspondentes às novas helicases, foi adotado uma abordagem experimental utilizando RT-PCR longo. Para tanto, foram obtidas seqüências-consenso a partir da sobreposição dos clones de cDNA parciais presentes no loco em questão. Quando disponível, essas seqüências-consenso montadas foram comparadas com predições de estrutura de transcrito obtidas por bioinformática. Uma vez definidas quais seriam as seqüências mais prováveis das extremidades correspondentes aos transcritos completos, foram desenhados "primers" que permitissem a amplificação do transcrito completo correspondente ao gene em questão, usando condições especiais (Figura 28D).

A análise de expressão desses quatro novos genes, revelou que o gene CHD7 é o que apresenta resultados de expressão mais interessantes em tumores e linhagens de glioma humano. A amplificação do transcrito completo correspondente a este gene está ilustrada na Figura 29A. Como pode ser visto no fracionamento dos produtos de PCR apresentados, foi possível amplificar, reprodutivelmente e a partir de diferentes tipos celulares, uma banda de tamanho compatível com a seqüência predita para o transcrito deste gene, estimada em torno de 10,5 Kb.

Figura 29 – Amplificação do cDNA completo de CHD7 e análise da sequência de proteína codificada pelo transcrito canônico predito. A: Fracionamento em géis de agarose dos produtos de LD-PCR obtido a partir do cDNA de diversas linhagens de células humanas. O tamanho das bandas dos padrões de peso molecular estão indicados, assim como o cDNA utilizado como “template” e o respectivo controle negativo das reações [C(-)]. **B:** Análise dos domínios protéicos conservados da proteína CHD7 predita. O “p-value” para os domínios identificados estão indicados na figura. **C:** Cladograma mostrando que a proteína hipotética codificada pelo gene CHD7 faz parte, de fato, da subfamília 3 de helicases CHD humanas, que apresenta similaridade maior com a proteína Kis-L de *Drosophila*.

As bandas de tamanho menor que aparecem no gel, baseado na experiência com a clonagem dos outros genes, correspondem, provavelmente, a isoformas de mRNA geradas por “splicing” alternativo, o que requer que o produto amplificado seja clonado previamente ao sequenciamento. Isto foi observado durante o processo de amplificação, clonagem e sequenciamento do transcrito completo de CHD9, em que um dos diversos transcritos alternativos encontrados foi depositado sob o número de acesso AY647157 do GeneBank. A clonagem dos múltiplos transcritos de CHD7 se encontra, atualmente, em andamento.

Como pode ser visto na Figura 29A, diferentes padrões e tamanhos destas bandas são obtidas de fontes diferentes de cDNA, sugerindo que a expressão destas possíveis diferentes isoformas de RNA tem um padrão de expressão célula-ou tecido-específico. Por último, as duas figuras de fracionamento em géis de agarose mostradas correspondem a produtos de PCR longo obtidos em diferentes condições de termociclagem. É possível verificar que estas diferentes condições promovem a amplificação preferencial de distintas faixas de tamanho de produto.

A seqüência-consenso montada manualmente para CHD7, a partir dos cDNAs parciais presentes no mesmo locus, foi idêntica à seqüência da predição de Bioinformática para o mesmo locus. A tradução conceitual desta seqüência de cDNA no programa “ORF Finder” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), resulta numa proteína de 2.997 aminoácidos (Figura 29B), com um peso molecular predito de aproximadamente 336 kDa, com ponto isoelétrico de 5,95, de acordo com o programa EXPASY (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). Utilizando o programa PSORT II (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl>), foi possível verificar que esta proteína hipotética tem 78,5% de probabilidade de apresentar localização exclusivamente nuclear, o que é compatível com a atividade de DNA helicase esperada para esta proteína.

Por último, a análise de domínios conservados na seqüência conceitual da proteína traduzida (Figura 29B), analisada pelo programa Blast-CD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), revelou características estruturais que caracterizam a proteína CHD7 como um novo membro da família de DNA helicases CHD (Delmas et al., 1993). Dentre os domínios que definem esta proteína como uma nova helicase desta família, estão o domínio SNF2 (CDD 7.500, $E\text{-value} = 5 \times 10^{-77}$), o domínio conservado em C-terminal da superfamília de helicases (CDD 14813, $E\text{-value} = 6 \times 10^{-22}$) e os duplos cromodomínios presentes (CDD 22747, $E\text{-value} = 2 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-5}$). Além disso, a presença de duplos domínios do tipo BRK (*Brahma and Kismet Related*, CDD 9008, $E\text{-value} = 2 \times 10^{-8} - 8 \times 10^{-13}$),

que é um outro domínio típico de certas proteínas envolvidas com transcrição e remodelamento de cromatina, define este gene como um membro da subfamília III de DNA helicases do tipo CHD.

Recentemente, com a identificação de um número relativamente alto de DNA helicases do tipo CHD em mamíferos, estas proteínas foram subdivididas em três subfamílias (Schuster & Stoger, 2002; Shur & Benayahu, 2005; Tajul-Arifin et al., 2003). A subfamília III das CHDs é a subfamília cujos membros apresentam domínios BRK, e maior similaridade de sequência com a proteína *Kismet* de *Drosophila*, sendo que os CHDs 7, 8 e 9 consistem de novos membros desta família. O cladograma apresentado na Figura 29C, em que foram alinhadas as seqüências de todas as helicases humanas do tipo CHD, juntamente com a seqüência da proteína *Kismet* de *Drosophila*, confirma a maior similaridade das CHDs 7, 8 e 9 humanas com a proteína de *Drosophila*, reafirmando a classificação destas proteínas humanas como sendo membros da subfamília III de DNA helicases do tipo CHD.

4.4. Ensaio de tumorigênese *in vivo* de linhagens de glioma

Experimentos prévios de tumorigênese para as células ST1 e P7, indicaram que estas linhagens possuem, além da sensibilidade diferencial à ação de glicocorticóides, diferentes potenciais tumorigênicos *in vivo*, quando injetadas s. c. no dorso de camundongos *nude*, seguindo o ensaio clássico de tumorigênese *in vivo*. Paralelamente, os resultados obtidos através de diferentes técnicas e, sobretudo, através de hibridização de “microarrays”, indicaram maior expressão de genes pró-proliferativos na linhagem P7 e de genes anti-proliferativos na linhagem ST1. Assim, foram realizados experimentos quantitativos de tumorigênese, visando verificar a existência de uma diferença real no caráter tumorigênico destas linhagens, e que seria coerente com os dados de expressão gênica obtidos até então.

Os resultados apresentados na Figura 30 correspondem ao agrupamento dos dados de três experimentos independentes de tumorigênese realizados com as linhagens ST1 e P7. Como pode ser visto no gráfico, os tumores gerados pela linhagem P7 são, em média, cerca de duas e meia vezes maiores que a média de peso dos tumores gerados pela linhagem ST1. Como indicado nesta figura, esta diferença foi estatisticamente significativa, de acordo com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Este achado corrobora os resultados obtidos nos experimentos de identificação de genes potencialmente diferencialmente expressos entre as duas linhagens, em que um número expressivo de oncogenes tem expressão muito maior na linhagem P7 em relação à linhagem ST1. Além disto, esta diferença estatisticamente significativa reforça a hipótese de que as linhagens ST1 e P7 diferem uma da outra em vários aspectos que não só a responsividade diferencial à hidrocortisona.

Paralelamente, com o objetivo de iniciar o estudo de linhagens de glioma humano, e comparar com o modelo de glioma de rato, foram realizados, também, experimentos de tumorigênese *in vivo*, com seis diferentes linhagens estabelecidas de glioma humano. Como pode ser observado na Figura 31, as diferentes linhagens testadas apresentam diferenças marcantes de capacidade tumorigênica quando injetadas s. c. em camundongos do tipo *nude*. Embora todas elas tenham sido derivadas de culturas primárias de gliomas humanos altamente invasivos, as linhagens T98G, A172 e U373MG não foram capazes de desenvolver tumores em nenhum dos animais injetados, ao passo que a linhagem U343MG desenvolveu apenas tumores bastante pequenos. Somente as linhagens U87MG e HOG exibiram caráter francamente tumorigênico neste ensaio.

Figura 30 – Tumorigênese *in vivo* (sc) das linhagens ST1 e P7 de glioma de rato. **A:** Peso do tumor extraído aproximadamente 45 dias após injeção sc de 2×10^6 células no dorso de camundongos Balb-c/*nude* com 4 a 8 semanas de vida. O peso dos tumores gerados pela linhagem P7 é estatisticamente maior que os tumores gerados pela linhagem ST1 (** $p \leq 0,01$). **B:** Fotos dos animais com tumor sc gerado pelas linhagens ST1 e P7 no dia do sacrifício.

Figura 31 – Tumorigênese *in vivo* (sc) de linhagens de glioma humano. A: Peso do tumor extraído aproximadamente 50 dias após injeção sc de 2×10^6 células no dorso de camundongos Balb-c/*nude* com 4 a 8 semanas de vida. **B:** Fotos dos animais com tumor sc gerado pelas linhagens U87MG, HOG e U343MG, e dos camundongos onde foram injetadas as linhagens A172, T98G e U373MG, que se mostraram não-tumorigênicas para este tipo de ensaio.

5. DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1. Expressão gênica e características fenotípicas diferenciais entre as linhagens de glioma.

Em linhas gerais, o início deste trabalho focalizou a análise comparativa, por diferentes técnicas, dos perfis de expressão gênica de duas linhagens de glioma de rato (ST1 e P7), que são fenotipicamente diferentes. As diversas metodologias utilizadas com este sistema modelo, tanto para identificação de genes potencialmente expressos de maneira diferencial, quanto para confirmação de expressão gênica diferencial, se mostraram, ao mesmo tempo, complementares e reprodutíveis. Determinados subgrupos de genes foram repetidamente identificados/confirmados por diferentes técnicas: uma parcela significativa dos genes identificados como sendo possivelmente diferencialmente expressos utilizando “macroarrays” comerciais de nylon também foram identificados como tal utilizando “microarrays”, apesar de terem sido utilizadas diferentes condições de tratamento das células em cada um dos casos para a síntese de sondas. Da mesma maneira, os resultados de Q-PCR reproduziram, para 100% dos genes analisados, os resultados obtidos previamente com Northern Blot. Os resultados obtidos previamente aos experimentos de hibridização de “microarrays” de alta densidade também nortearam a análise eficiente dos mesmos, visando extrair, com o máximo de eficiência, a maior quantidade possível de informação confiável.

Foi possível concluir, contudo, que cada técnica de identificação de genes diferencialmente expressos analisa apenas uma subpopulação de todos os genes que efetivamente apresentam expressão diferencial entre amostras biológicas diferentes sendo que nenhuma delas é exaustiva no sentido de revelar o perfil completo de expressão diferencial. Desta maneira, os “microarrays” de alta densidade parecem ser, no presente momento, a técnica de escolha para a identificação de genes diferencialmente expressos em processos biológicos específicos para organismos para os quais já se dispõe desta tecnologia.

Ao todo, utilizando diferentes técnicas, foi possível, até o presente momento, identificar e confirmar 8 genes com expressão diferencial na linhagem ST1, e 23 genes com expressão maior na linhagem P7. No que diz respeito à eficiência de validação de expressão diferencial, na primeira etapa do trabalho, foram rastreados

cerca de 3.000 genes para obtenção de uma lista de aproximadamente 200 genes com potencial de serem diferencialmente expressos (~ 6,7 % de genes com indicação de expressão diferencial). Destes 200 genes, 27 foram escolhidos da lista para validação da expressão diferencial, sendo que 9 foram confirmados como sendo diferencialmente expressos, ou seja, ~ 33,3 % de eficiência de confirmação. Quanto aos “microarrays”, dos aproximadamente 24.000 “probe sets” presentes, cerca de 1.300 foram filtrados como prováveis genes diferencialmente expressos (~ 5,4 % de genes com indicação de expressão diferencial). Desta lista de 1.300 genes, 27 genes foram escolhidos para confirmação por Q-PCR, dos quais 18 (67%) foram confirmados como sendo diferencialmente expressos. A partir destas estimativas, é possível concluir que a identificação de genes diferencialmente expressos por “microarrays” de alta densidade, seguida de confirmação por Q-PCR oferece a melhor eficiência de confirmação de expressão diferencial, com uma redução significativa no número de falsos positivos.

Estes dados contrastam significativamente quando comparados com outras metodologias de isolamento de genes diferencialmente expressos, como a construção de bibliotecas subtrativas de cDNA e validação por Northern Blot ou RT-PCR semiquantitativo, onde eficiências de validação de expressão diferencial inferiores a 1%, foram algumas vezes obtidas em trabalhos anteriores do grupo. Ainda no contexto de identificação de genes diferencialmente expressos por GC na linhagem ST1 em trabalhos anteriores do grupo, Valentini & Armelin (1996) demonstraram, através da metodologia de hibridização diferencial, o isolamento e confirmação de expressão diferencial de quatro genes a partir de um “screening” de um total de cerca de 300.000 clones, o que resulta numa eficiência de validação de expressão diferencial de aproximadamente 0,0013%. Desta maneira, pode-se observar que a metodologia escolhida tem uma importância seminal para o sucesso na identificação de genes diferencialmente expressos, influenciando, portanto, diretamente na quantidade e qualidade da informação obtida acerca do sistema biológico em questão.

Ainda assim, a utilização desta modalidade metodológica não deve restringir a análise, em paralelo, de genes funcionalmente relacionados, mas cuja expressão diferencial não pôde ser inicialmente detectada. Neste trabalho, exemplos deste tipo são os fatores de crescimento PDGFA, -B e -C, a citocina/fator de crescimento MDK e o gene remodelador de cromatina Brm, os quais não passaram pelo filtro de expressão diferencial dos experimentos de “microarray”, apesar de serem, de fato, diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7. Similarmente, foi possível

confirmar a expressão diferencial marcante, na linhagem P7, do gene ALK, apesar do mesmo não estar representado nos “arrays” de rato utilizados. Este gene foi incluído nas análises de expressão diferencial por Q-PCR por ser o receptor do fator de crescimento PTN, que foi confirmado antecipadamente como sendo mais expresso na linhagem P7. A confirmação da expressão diferencial destes genes adicionalmente incluídos é, contudo, coerente com o painel de genes constantes na lista de genes filtrados como sendo potencialmente diferencialmente expressos, assim como se correlaciona com o fenótipo apresentado pelas linhagens ST1 e P7. Estes achados reafirmam a importância de se considerar, dentro do contexto de busca de um significado biológico, a relação funcional entre diferentes genes como critério de inclusão para análises posteriores, e não apenas a indicação de expressão diferencial no senso estrito. Ainda nesta linha de raciocínio, o gene CHD7, empiricamente incluído neste trabalho, se mostrou como um novo gene super-expresso, tanto em amostras clínicas de glioma humano, como em linhagens humanas de glioma, apesar de não ser diferencialmente expresso entre as linhagens ST1 e P7, quando analisado pelos “microarrays” e também por Q-PCR.

Assim, alguns dos genes confirmados como sendo diferencialmente expressos, particularmente os genes para os quais foi encontrado maior expressão na linhagem P7, já são conhecidos por participar no desenvolvimento e progressão de gliomas humanos. Em particular, foi confirmado, na linhagem P7, a expressão maior de um grande número de genes de fatores de crescimento e de seus respectivos receptores, sugerindo a existência de múltiplas alças autócrinas de fatores de crescimento nesta linhagem. A etapa que sucedeu esta foi, portanto, avaliar os níveis de expressão destes mesmos genes em linhagens humanas de glioma e, em seguida, em amostras clínicas de tumores humanos, visando extrair, a partir dos dados de expressão em linhagens de rato, informações que viessem a ser úteis para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na doença humana.

Paralelamente, foram realizados ensaios de tumorigênese *in vivo*, tanto das linhagens de glioma de rato, quanto das linhagens de glioma humano, visando traçar paralelos entre os perfis de expressão gênica e características fenotípicas relacionadas ao caráter tumorigênico. Nestes experimentos, foi possível verificar que a maior expressão de fatores de crescimento e receptores, na linhagem P7, se correlaciona com um caráter tumorigênico maior, que se refletiu na formação de tumores subcutâneos significativamente maiores quando comparados com os tumores gerados pela linhagem ST1. Quanto às linhagens humanas de glioma, não

se observou correlação entre os perfis de expressão gênica e o caráter tumorigênico destas células, que variou grandemente entre as seis linhagens testadas.

Diversos são os motivos pelos quais determinadas linhagens humanas de glioblastomas podem não ter dado origem a tumores neste tipo de ensaio. Uma das alternativas mais prováveis, é o fato do experimento de tumorigênese *in vivo*, realizado através de injeção s. c. de células, não ser adequado para todos os tipos de tumor, devido às grandes diferenças de microambiente celular proporcionadas pelos diferentes sítios de implantação do xenoimplante de células tumorais. Para a linhagem T98G, por exemplo, já foi descrito (Rubenstein et al., 1999) que a mesma só é capaz de gerar tumores quando injetada s. c., se ao inóculo de células for adicionado Matrigel[®], que é um extrato purificado contendo um grande número de componentes de matriz extracelular (Baatout & Cheta, 1996; Benelli & Albini, 1999; Kleinman & Martin, 2005). Já a linhagem U87MG, além de ser utilizada extensivamente em trabalhos específicos envolvendo gliomas, também é bastante utilizada em diversos trabalhos onde linhagens francamente tumorigênicas em animais de laboratório, independentemente do tecido de origem, são utilizadas para, por exemplo, testes de novos compostos anti-tumorais (Roberts et al., 2005).

Assim, estes resultados reproduzem o comportamento descrito para estas linhagens na literatura científica. Entretanto, os poucos trabalhos visando testar o potencial tumorigênico destas linhagens têm sido contraditórios e fragmentados, não tendo sido possível encontrar trabalho algum onde este parâmetro tenha sido testado sistematicamente nesta linhagens. Num futuro próximo, o estabelecimento de modelos experimentais *in vivo* de tumorigênese ortotópica (no mesmo local de onde o tumor originalmente veio), permitirá correlacionar os níveis relativos de expressão gênica, particular de cada linhagem, com outros fenótipos que os experimentos e recursos disponíveis atualmente não permitem avaliar, como invasão, migração, angiogênese, etc.

5.2. Utilização de dados de expressão gênica de linhagens de glioma de rato como ferramenta para o estudo de interações entre genes relacionados com glioma, e para identificação de possíveis novos alvos moleculares em gliomas humanos.

A partir dos dados obtidos na primeira etapa do trabalho, utilizando linhagens de glioma de rato, foi feito um esforço no sentido de se extrair, dos perfis de expressão correspondentes, informações relevantes para a doença humana. Para esta finalidade, foram quantificados os níveis de expressão dos mesmos genes em linhagens de glioma humano. A partir da análise destes resultados, foi escolhido um conjunto de genes para serem analisados, numa outra etapa, em amostras clínicas de gliomas humanos, com o objetivo de verificar a validade das hipóteses levantadas.

Neste contexto, foi possível comprovar, em amostras de gliomas humanos, a superexpressão de vários genes relacionados a fatores de crescimento e seus receptores. Em particular, observou-se a superexpressão os genes codificantes de fatores de crescimento FGF1 e PTN, assim como dos receptores para fator de crescimento ALK, PDGFRA e PTPRZ1. O significado biológico destes achados ainda não é claro, mas existem indícios diretos ou indiretos, em alguns poucos trabalhos, sugerindo que as vias de FGF, PDGF e PTN/MDK estão, direta ou indiretamente, interconectadas entre si, tanto em contextos mais próximos da condição fisiológica quanto em células tumorais. Embora os trabalhos anteriores da literatura não tenham se utilizado da precisão e sensibilidade da técnica de Q-PCR, como foi utilizado aqui, o conhecimento sobre a expressão aumentada de pelo menos alguns destes genes em gliomas, não é um dado novo.

O receptor alfa de PDGF (PDGFRA), por exemplo, já é classicamente conhecido como sendo superexpresso (Fleming et al., 1992b) e/ou amplificado em gliomas humanos (Westermarck et al., 1995), sendo a sua superexpressão limitante para o desenvolvimento e progressão dos astrocitomas, além de ser um fator prognóstico relacionado à progressão da doença e sobrevivência (Varela et al., 2004). Da mesma maneira, diversos trabalhos têm mostrado um papel cada vez maior dos próprios ligantes de PDGF no desenvolvimento de gliomas (Fleming et al., 1992b; Lokker et al., 2002; Maxwell et al., 1990). Em virtude disto, inibidores da

atividade tirosina quinase do receptor de PDGF (como Imatinib [Gleevec[®]]) têm sido considerados como possíveis agentes terapêuticos para glioma em modelos experimentais (Kilic et al., 2000; Pietras et al., 2003), com algum sucesso.

Por outro lado, os FGFs, sobretudo FGF1 e FGF2, já foram descritos como sendo expressos em altos níveis em gliomas (Maxwell et al., 1991; Paulus et al., 1990; Stefanik et al., 1991a; Stefanik et al., 1991b) e nos processos de neoangiogênese tumoral desencadeados por estes tumores (Auguste et al., 2001; Bian et al., 2000; Brockmann et al., 2003b; Jensen, 1998; Stiver, 2004). A inibição da função de receptores de FGF em diversas linhagens de glioma leva à diminuição de crescimento assim como atenuação significativa da capacidade tumorigênica das mesmas (Auguste et al., 2001; Saiki et al., 1999; Yukawa et al., 2000). Neste trabalho, foi observado, novamente, que FGF1 é frequentemente superexpresso em linhagens e amostras clínicas de gliomas e, além disso, apresenta uma estreita correlação com os níveis relativos de expressão do fator de crescimento pleiotrofina. Esta foi a correlação de expressão mais consistente obtida a partir de todos os dados obtidos. De fato, alguns poucos trabalhos têm descrito, como um dado secundário, evidências diretas de co-expressão de pleiotrofina e FGFs em cérebro normal e em gliomas (Lu et al., 2005; Ulbricht et al., 2003), embora a real existência desta co-expressão e a sua significância não tenham sido endereçadas até o presente momento para o desenvolvimento de tumores gliais.

O fator de crescimento pleiotrofina (PTN) é, entre os fatores de crescimento, um dos que tem ganhado importância mais recentemente, como um alvo potencialmente interessante para diversos tumores e, em particular, para gliomas. Isoladamente, PTN tem atividade transformante quando superexpressa em fibroblastos embrionários normais de camundongo (Chauhan et al., 1993), e diversos trabalhos têm descrito o envolvimento de pleiotrofina no crescimento de diversos tipos de tumor (Czubayko et al., 1994), incluindo tumores de próstata (Hatzia Apostolou et al., 2005), melanoma (Wu et al., 2005) e tumores de pâncreas (Klomp et al., 2002; Weber et al., 2000). É possível que este papel em tumores esteja ligado, ao menos em parte, pela sinalização através da via das MAP-quinases e PI3K (Soultou et al., 1997), beta-catenina (Meng et al., 2000), atividade anti-apoptótica induzida por este fator (Bowden et al., 2002) e, mais recentemente, pelo envolvimento de PKC (Pariser et al., 2005) nas vias de sinalização moduladas por pleiotrofina. Interessantemente, midquina (MDK), que é uma proteína que apresenta alta similaridade com PTN, parece regular a expressão de PTN ao menos em alguns tipos celulares e tecidos (Herradon et al., 2005). No sistema nervoso central,

pleiotrofina parece ter um papel fisiológico essencial durante o desenvolvimento, neuritogênese, migração celular e reparo de lesões (Hienola et al., 2004; Jung et al., 2004; Wanaka et al., 1993; Zhang et al., 2004). Assim, o papel de pleiotrofina em diversos contextos fisiológicos poderia explicar o seu envolvimento em vários tipos de tumores, quando os mecanismos de controle das mesmas vias biologicamente relevantes se encontra, frequentemente, corrompido.

Quanto à expressão coordenada de pleiotrofina com outros genes, encontrada neste trabalho, diversos são os indícios, na literatura, que reforçam esta idéia de co-regulação gênica tanto em contextos fisiológicos quanto patológicos. O gene codificante de pleiotrofina foi clonado como sendo um gene responsivo a PDGF em fibroblastos embrionários 3T3 de camundongo (Li et al., 1992). Mais recentemente, também foi encontrada modulação de PTN por PDGF em células estreladas de fígado, sugerindo que, ao menos em alguns contextos existe, de fato, uma relação regulatória entre as vias de PDGF e PTN (Brose et al., 1999). Fisiologicamente, foi observado, também, que os níveis de PTN e MDK, acompanham os níveis de expressão de FGF2 em processos de inflamação e reparo no sistema nervoso central (Liu et al., 1998b). Em gliomas, PTN tem sido cada vez mais implicado na gênese e progressão destes tumores (Brockmann et al., 2003b; Lu et al., 2005; Powers et al., 2002; Zhang et al., 2004), onde a expressão de pleiotrofina parece ser limitante para o crescimento e a migração de linhagens de células de glioma humano (Grzelinski et al., 2005; Lu et al., 2005). Além disso, foi identificado, em bibliotecas subtraídas de cDNA a co-expressão, em gliomas humanos, tanto de PTN como de seu receptor PTPRZ1 (Ulbricht et al., 2003). No mesmo trabalho, onde também foram analisados genes da via dos FGFs, também foi encontrada co-expressão de FGF2 e PTN em amostras de glioma humano, notando, inclusive, o padrão recorrente de co-expressão dos dois fatores de crescimento. Se for possível comprovar que FGF1 e PTN são fatores de crescimento co-regulados em gliomas ou, ainda, reciprocamente co-regulados, dada a importância já estabelecida de ambos no desenvolvimento de gliomas, este dado fortalecerá a noção da necessidade de desenvolvimento de estratégias terapêuticas multipontuais, onde diversos alvos moleculares seriam atacados simultaneamente com o objetivo de se obter em efeito terapêutico sinérgico.

O gene codificante para a proteína tirosina quinase do linfoma anaplásico (ALK), é uma tirosina quinase de membrana que foi identificada como sendo o oncogene participante da translocação característica do linfoma anaplásico (Morris et al., 1994). Além disso, esta tirosina quinase está, superexpressa e participa de

diversos tipos de translocações encontradas em vários tumores humanos de origens outras que não o tecido linfóide (Pulford et al., 2004a; Pulford et al., 2004b; Stoica et al., 2002) e, ainda, o fator de crescimento pleiotrofina foi descoberto como sendo um de seus ligantes extracelulares (Stoica et al., 2001). Em virtude disto, este gene foi incluído no trabalho, tendo apresentado expressão muito aumentada tanto na linhagem P7 de glioma de rato, como em algumas linhagens de glioma humano e amostras clínicas de glioma. Enquanto o gene PTPRZ1 codifica para um outro receptor de membrana para pleiotrofina, acredita-se que o sinal desencadeado pela ativação deste receptor está relacionado ao aumento da migração celular (Lu et al., 2005; Muller et al., 2003), ao passo que o sinal transduzido por ALK sob efeito do ligante é o de proliferação celular (Lu et al., 2005) sendo, este último, limitante para o crescimento de glioblastoma *in vitro* e *in vivo* (Powers et al., 2002). É interessante notar que, apesar do envolvimento desta quinase em uma série de diferentes tipos de neoplasias, não existe, até o momento, descrição de desenvolvimento de inibidores de quinase específicos para ALK, como já existe para outros receptores de membrana do tipo tirosina quinase. O desenvolvimento de uma molécula deste tipo permanece, então, como uma possibilidade interessante com potencial terapêutico para gliomas, linfomas e outros tipos de tumores.

A tirosina fosfatase zeta do tipo receptor 1 (PTPRZ1), que codifica uma fosfatase de membrana que atua como um dos receptores de pleiotrofina (Zhang et al., 2004), apresentou, também, níveis de expressão bastante aumentados em amostras clínicas de glioma. Esta proteína também tem sido descrita em outros trabalhos como sendo superexpressa em gliomas humanos (Lu et al., 2005; Ulbricht et al., 2003), e experimentos *in vitro* com linhagens de glioma humano, têm associado a expressão deste gene com características de migração das células de glioma (Muller et al., 2003). Neste trabalho foi possível observar, nas mesmas amostras, um alto grau de correlação de sua expressão, não só com seu próprio ligante PTN mas, também, com os genes PDGFRA, FGF1 e CHD7. Como não se conhece qual a relação causal entre todas estas novas correlações apresentadas, não é possível inferir, até o presente momento, qual a relação funcional que faz com que os níveis de expressão de PTPRZ1 se correlacione com aqueles de todos estes outros genes. Sendo PTPRZ1 um dos ligantes para o fator de crescimento PTN, a alta correlação de expressão encontrada para estes genes indica que os mesmos têm grande chance de fazer parte de uma via autócrina de estimulação de crescimento e/ou migração com retroalimentação positiva.

Neste contexto, embora a expressão de secretogranina 2 (SCG2) não pareça estar aumentada nos gliomas, foi possível observar uma correlação significativa de expressão com pleiotrofina. Até o presente momento, esta proteína foi descrita como sendo um marcador de células de origem neuroendócrina que, funcionalmente, se associa a vesículas de secreção de neurotransmissores (Fischer-Colbrie et al., 1987). Levando em consideração a correlação positiva e significativa dos níveis de SCG2 com os níveis de FGF1 e PTN, é possível que SCG2 possa estar, de alguma forma, envolvido na produção e secreção de grânulos contendo fatores de crescimento, que estão, igualmente, superexpressos nas amostras de glioma testadas. Alternativamente, é possível que a linhagem P7 expresse este marcador por ser originária de um clone celular com características de diferenciação diversas em relação ao clone que deu origem à linhagem ST1, levando em consideração que, embora a linhagem C6 tenha sido isolada como uma linhagem clonal, é possível se isolar, a partir desta, diferentes clones celulares tumorais, com características bem distintas em termos de grau de diferenciação (Kondo et al., 2004; Setoguchi et al., 2004).

Levando em consideração os vários mecanismos que poderiam explicar a superexpressão coordenada de pleiotrofina e de seu receptor, é interessante notar que os genes PTN e PTPRZ1 estão relativamente próximos (~15 Mb) no braço longo do cromossomo 7 humano. Esta sintenia é conservada em rato, camundongo e chimpanzé. Os altos níveis de expressão destes dois genes, em linhagens de glioma humano e de rato, também, em amostras clínicas de glioma humano seriam, inclusive, compatíveis com a existência de um amplicon, em tecidos tumorais, que incluísse os dois genes e estivesse amplificado em proporções variáveis nos tumores humanos. Liu et al. (1998a), estudando a amplificação do *locus* de EGFR, presente no cromossomo 7, que é um amplicon clássico em gliomas humanos, descreveu que a região do cromossomo 7 amplificada em gliomas humanos é extensa e heterogênea e, provavelmente, possui outros genes-alvo que não apenas o EGFR. Uma das regiões descritas nesse trabalho como sofrendo amplificação independente do *locus* de EGFR é a região 7q33, onde se encontra o gene de PTPRZ1 (Ariyama et al., 1995; Levy et al., 1993) e também está relativamente próxima do *locus* do gene PTN, na banda 7q34 (Milner et al., 1992). Outros trabalhos independentes de estudo de aberrações cromossômicas em gliomas humanos também descrevem amplificação das bandas 7q33-q34 ou de segmentos próximos em gliomas humanos (Gottfert et al., 1989; Liu et al., 2000; Mueller et al., 1997; Muleris et al., 1994; Weber et al., 1996), fortalecendo ainda mais nossa

hipótese sobre a existência de um amplicon recorrente em gliomas e que compreende os *loci* para PTN e PTPRZ1.

Outros genes, além de fatores de crescimento, também foram identificados neste trabalho como tendo níveis de expressão alterados entre gliomas e tecido cerebral não gliomatoso. O gene da Reelina, envolvido no desenvolvimento do SNC e migração de progenitores neurais (Rice & Curran, 2001), por exemplo, apresentou uma tendência a ser menos expresso em graus mais avançados de glioma, apesar de originalmente identificado como sendo superexpresso na linhagem P7. Apesar disto, este achado está coerente com alguns poucos trabalhos relacionando este gene a tumores. Este gene está entre os 40 maiores genes humanos, e o *locus* cromossômico onde o mesmo se encontra é rico em sítios frágeis de quebra (Smith et al., 2005). Os mesmos autores postularam que, RELN, assim como outros genes muito grandes presentes em regiões críticas do genoma, costumam ter atividade de supressão tumoral, motivo pelo qual freqüentemente se encontram silenciados e/ou deletados em linhagens e amostras de tecidos tumorais humanos, sendo esta uma possível explicação para a não detecção deste gene nas linhagens humanas de glioma. Devido à escassez de informações sobre o possível papel deste gene no desenvolvimento de tumores, o estudo funcional deste gene no contexto de proliferação e invasão tumoral poderia indicar uma nova via de supressão tumoral, passível de ser explorada em gliomas e, eventualmente, em outros tumores.

O gene ROBO1 (*Roundabout 1 homolog, Drosophila*), é um dos ortólogos em mamífero, recentemente identificado, de um gene de *Drosophila* ligado ao desenvolvimento do sistema nervoso central (Sundaresan et al., 1998). Em vertebrados, este gene está ligado ao desenvolvimento do sistema nervoso central (Vargesson et al., 2001), por regular o crescimento e migração dos axônios neuronais ao longo dos dois hemisférios cerebrais (Hivert et al., 2002; Long et al., 2004; Mambetisaeva et al., 2005). Alterações deste gene ou do respectivo *locus* cromossômico estão ligadas a deficiências cognitivas em humanos (Hannula-Jouppi et al., 2005; Miller, 2005). Em tumores, alguns trabalhos indicam o silenciamento, perda do *locus* cromossômico e/ou a perda de função deste gene em tumores de origem epitelial, especialmente de tumores de pulmão em humanos (Dallol et al., 2002) e, também, em modelos experimentais *in vivo* de carcinogênese pulmonar (Tsujiuchi et al., 2004; Xian et al., 2004). Entretanto, em outros tipos de tumores, ROBO1 e outros genes da mesma família estão expressos em altos níveis (Latil et al., 2003; Wang et al., 2003), da mesma maneira que foi encontrado neste trabalho começando pela linhagem P7 de glioma de rato e, finalmente, em várias amostras

clínicas de glioma. Devido ao fato de se tratar de um novo gene, os mecanismos ligados às propriedades de supressão tumoral, em alguns tumores, e de promoção do crescimento tumoral, em outros contextos tumorais, permanecem totalmente desconhecidos. É provável, entretanto, que as propriedades tróficas e pró-migratórias que a expressão deste gene promove em células do sistema nervoso central sejam utilizadas, de alguma maneira, como uma vantagem seletiva para o desenvolvimento e crescimento de gliomas.

O gene RNF130, que está superexpresso na linhagem P7 de glioma de rato, em algumas linhagens de glioma humano e, finalmente, em amostras clínicas de glioma, codifica para uma proteína com um domínio "RING" (*Really Interesting New Gene*), que é um domínio comumente presente em proteínas com atividade catalítica de Ubiquitina ligases (Jackson et al., 2000). Estas proteínas catalisam a ligação covalente de Ubiquitina, um polipeptídeo de 76 aminoácidos e que tem, como uma de suas principais funções, direcionar a molécula de proteína ligada a ele para a degradação proteassomal (Heinemeyer et al., 1991). Como a ubiquitinação é catalisada por enzimas específicas que, por sua vez, também reconhecem substratos específicos, este é mais um processo fino de modulação da atividade de produtos gênicos protéicos. Recentemente, tem sido ressaltado o papel cada vez maior e mais relevante que a ubiquitinação desempenha numa variedade de processos biológicos, inclusive em câncer (Isaksson et al., 1996). O produto do oncogene MDM2, por exemplo, acelera a degradação da proteína supressora de tumor p53 por catalisar a ubiquitinação da mesma (Haupt et al., 1997; Honda et al., 1997; Kubbutat et al., 1997; Momand et al., 1992). Desta maneira, o gene MDM2 está freqüentemente superexpresso ou amplificado em diversos tumores, inclusive em gliomas, levando à inibição da atividade de supressão tumoral da proteína p53, razão pela qual diversas drogas inibidoras de MDM2 têm sido investigadas para o tratamento de tumores (Yang et al., 2005). No que diz respeito ao gene RNF130, ainda não há comprovação de que a proteína codificada por ele tem, de fato, atividade catalítica e, se for o caso, também não são conhecidos quais seriam seus alvos intracelulares específicos. Uma possibilidade é que esta proteína, por estar super-expressa em gliomas, esteja promovendo a rápida degradação de proteínas supressoras de tumor via ubiquitinação. Se for possível provar a existência de um mecanismo desta natureza, a superexpressão de RNF130 poderia estar, desta maneira, contribuindo para a progressão e manutenção dos mecanismos moleculares associados à transformação celular. Neste caso, seria de grande

interesse a identificação das suas proteínas-alvo, bem como o desenvolvimento de fármacos inibidores farmacológicos da atividade de RNF130.

Em suma, a partir dos dados preliminares obtidos em linhagens de glioma de rato, foi possível identificar genes potencialmente relevantes para gliomas humanos, com a confirmação independente de vários achados da literatura e, ainda, a identificação de alguns genes que, até então não eram conhecidos como sendo potencialmente relacionados ao desenvolvimento de gliomas. Destes genes, foi possível inferir, testar e confirmar a presença de vários elementos possivelmente envolvidos na formação de múltiplas alças autócrinas de fatores de crescimento em linhagens de glioma humano e amostras clínicas de tumor, que podem ser mutuamente co-reguladas ou compartilharem as mesmas vias de controle de expressão. Apesar do envolvimento de certos fatores de crescimento, como PDGF e EGF, estarem relativamente bem caracterizados e sedimentados como estando diretamente implicados na patogênese de gliomas, através da formação de alças autócrinas de proliferação celular, estas vias podem não ser únicas. Os resultados aqui obtidos de expressão coordenada de múltiplos fatores de crescimento e/ou de seus respectivos receptores, além de ser significativo do ponto de vista estatístico, também encontram embasamento em alguns poucos trabalhos em que observações similares foram descritas, embora não endereçadas de maneira sistemática, pelo menos até o presente momento. Assim, é provável que várias destas vias estejam em atividade na célula de glioma. Portanto, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas contra o bloqueio de apenas uma alça autócrina não deve ser, por si só, suficiente para a supressão do fenótipo tumoral.

5.3. Identificação do gene CHD7, um novo fator remodelador de cromatina, como um possível novo alvo molecular em gliomas humanos.

O associação de um grande número de genes relacionados ao remodelamento de cromatina e controle de transcrição e com proliferação/transformação celulares se encontra, atualmente, apoiada por um grande número de trabalhos na literatura. O complexo SWI/SNF, que possui os genes Brm e BRG-1 como subunidades catalíticas mutuamente exclusivas, talvez tenha sido um dos primeiros complexos remodeladores de cromatina conhecido como possuindo atividades relacionadas a mecanismos controle de proliferação e transformação celulares (Bourachot et al., 2003; Chai et al., 2005; Gunawardena et al., 2004; Hendricks et al., 2004; Kang et al., 2004; Khavari et al., 1993; Muchardt et al., 1998; Muchardt et al., 1996; Muchardt & Yaniv, 1999; Muchardt & Yaniv, 2001; Nagl et al., 2005; Reyes et al., 1998; Shanahan et al., 1999; Strobeck et al., 2000; Trouche et al., 1997; Vries et al., 2005; Wang et al., 2005; Wang et al., 2004).

Outros complexos remodeladores de cromatina similares a SWI/SNF, em que os genes codificantes para suas respectivas subunidades catalíticas são homólogos a Brm e BRG-1, também têm sido identificados como desempenhando papéis regulatórios importantes em vários tipos de tumores humanos (Adra et al., 2000; Bai et al., 2004; Geiman & Muegge, 2000; Hamai et al., 2003; Hibi et al., 2005; Hibi et al., 2003; Lee et al., 2000; Leung et al., 2005; Leung et al., 2003; Moinova et al., 2002; Neely & Workman, 2002; Raabe et al., 2001; Stopka et al., 2000; Wain et al., 2005; Yano et al., 2004). O estudo dos alvos celulares da proteína oncogênica E1A de adenovírus, levou ao isolamento de uma nova proteína de alto peso molecular (p400) que é essencial para a atividade transformante de E1A, sendo a subunidade catalítica putativa de um complexo remodelador de cromatina, até então desconhecido (Fuchs et al., 2001). Mais tarde, foi demonstrado que o complexo integrado por esta proteína está ligado ao controle de transcrição pelo oncogene *c-myc* (Frank et al., 2003) e E2F (Taubert et al., 2004). Da mesma maneira, o complexo formado pelo respectivo ortólogo de p400 em *C. elegans* está ligado ao controle de transcrição de genes-alvo controlados pelo oncogene *ras* (Ceol & Horvitz, 2004).

Por outro lado, recentemente, foi mostrado o papel deste complexo para a indução de genes relacionados à apoptose em mamíferos (Samuelson et al., 2005) e, também, no controle de expressão da proteína supressora de tumor p21 através de p53 (Chan et al., 2005), evidenciando que o papel global de controle da transcrição exercido por genes e complexos remodeladores de cromatina pode influenciar, profundamente, os processos de controle de proliferação e transformação celular.

Outros membros da própria família CHD de DNA helicases, previamente isolados, têm sido relacionados com proliferação celular via controle de transcrição. Os complexos remodeladores de cromatina formados pelas proteínas codificadas pelos genes CHD3 e 4, que são os mais conhecidos, foram denominados NuRD (*Nucleosome Remodeling and Histone Deacetylation*), pela atividade de remodelamento de cromatina e de desacetilação de histonas verificada nos mesmos (Xue et al., 1998). A indução de proliferação celular induzida pelo oncogene E7 de papilomavírus, por exemplo, depende da interação deste oncogene com o complexo remodelador de cromatina formado pela helicase CHD4 (Brehm et al., 1999). As proteínas MTA (*Metastasis associated proteins*), por sua vez, estão superexpressas em tumores epiteliais agressivos e metástases destes tumores (Kumar et al., 2003; Nicolson et al., 2003). Em particular, a proteína MTA3, que se associa com o complexo NuRD, está fortemente relacionada com o fenótipo invasivo de tumores de mama (Fujita et al., 2003; Fujita et al., 2004). Por fim, a proteína MTA1, que também se associa com o complexo NuRD, foi recentemente descrita como um efector essencial do oncogene *c-myc* (Zhang et al., 2005).

Quanto ao gene CHD7, um novo fator remodelador de cromatina, muito pouco ainda é conhecido sobre o seu papel biológico, e menos ainda sobre sua possível relação com proliferação e/ou transformação celular. Em paralelo a este trabalho de doutoramento, o único trabalho onde o cDNA parcial KIAA1416, que na época correspondia a um gene completamente desconhecido, foi descrito como sendo um auto-antígeno em câncer colorretal, para o qual foram detectados anticorpos no soro dos portadores do tumor. Quando foi analisada a expressão deste transcrito em amostras de tumores colorretal, os níveis relativos de expressão deste gene estavam, também, elevados em relação aos controles normais (Scanlan et al., 2002). Os demais trabalhos com descrições funcionais deste gene referem-se somente à relação causal, recentemente descrita, deste gene como pelo menos um dos genes-alvo de alterações genéticas do tipo perda de função na síndrome de CHARGE (Vissers et al., 2004), que é uma síndrome hereditária de malformação

congenita (Brunner & van Bokhoven, 2005; Carey, 2005; Johnson et al., 2005; Jongmans et al., 2005; Lalani et al., 2005; Sanlaville et al., 2005; Shaw-Smith, 2005; Williams, 2005). A alteração do respectivo ortólogo em camundongo leva a defeitos do desenvolvimento muito semelhantes aos descritos para pacientes portadores da síndrome em humanos, confirmando o papel funcional do gene e estabelecendo um modelo experimental para a síndrome de CHARGE (Bosman et al., 2005). A disponibilidade destes animais se constitui, também, em uma ferramenta para o estudo do possível papel deste novo gene em proliferação e transformação celular.

O alto nível de correlação encontrado com o receptor alfa de PDGF (PDGFRA), por exemplo, pode significar uma possível interação regulatória entre os dois genes. Estando o gene CHD7 muito provavelmente envolvido com o controle global da transcrição de conjuntos de genes específicos, caso a co-regulação com PDGFRA seja comprovada, a próxima questão seria definir se a expressão de PDGFRA é modulada por CHD7 ou, alternativamente, se CHD7 seria um alvo transcricional da sinalização via PDGFRA. Neste último caso, em que CHD7 poderia ser um efetor intracelular da via de PDGF, um passo interessante seria desvendar quais os genes-alvo cuja expressão é controlada por CHD7, visando buscar, finalmente, qual(is) deste(s) alvo(s) é(são) essencial(is) para a sinalização pró-proliferativa ou pró-tumoral de CHD7 e/ou PDGFRA.

Independentemente do mecanismo, a manipulação dos níveis endógenos de CHD7 em linhagens humanas de glioma, através de transdução de lentivetores apropriados, permitiria obter as primeiras incursões a respeito do papel funcional deste gene. Neste ponto, a disponibilidade de modelos *in vivo* de glioma humano contribuiria muito para melhor elucidar este papel biológico. Uma vez que a proteína codificada por CHD7 é, com grande chance, uma helicase dependente de ATP, uma vez estabelecida a relevância do gene em gliomas, este gene, que codifica um produto com atividade enzimática, seria um novo alvo para o desenvolvimento racional de medicamentos.

Por fim, a atividade pró-tumorigênica ou pró-proliferativa potencialmente ligada a esse gene, ou ao complexo do qual a sua proteína codificada faz parte, pode, na verdade, ser decorrente dos genes regulados por CHD7, e não do seu produto *per se*. O isolamento de genes diferencialmente expressos pela superexpressão de BRG-1, por exemplo, levou à identificação de um número expressivo de genes-alvo que têm, potencialmente, grande chance de se constituírem em efetores moleculares do estado de supressão tumoral desempenhado pelo complexo SWI/SNF (Hendricks et al., 2004; Liu et al., 2001). Se

esta hipótese for provada, e os genes-alvo controlados por CHD7 forem identificados, esses podem, também, virem a se tornar novos alvos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras para o tratamento eficaz dos gliomas humanos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste ponto do trabalho, as possibilidades de derivação de novos projetos são múltiplas, tanto para responder as perguntas que se iniciaram aqui com os genes que foram identificados e tiveram sua expressão diferencial confirmada, como para formular novas perguntas, baseadas em interpretações de outros dados oriundos dos experimentos de “microarrays” e que não foram explorados até então. No caso dos novos genes, cujo papel em proliferação e transformação celular ainda é obscuro ou completamente desconhecido, (CHD7, RNF130 e ROBO1), seria de grande interesse, num primeiro momento, o desenvolvimento de reagentes, como antisoros e/ou anticorpos, que permitissem caracterizar melhor a respectiva proteína codificada por estes *loci*, assim como a sua expressão diferencial, confirmada apenas para os níveis relativos de RNA. A partir deste ponto, a geração de linhagens celulares geneticamente modificadas para superexpressar ou silenciar a expressão destes genes seria o passo seguinte para se obter as primeiras incursões a respeito do possível papel destes genes na proliferação e transformação de células gliais.

Por outro lado, os genes codificantes para fatores de crescimento e seus receptores identificados neste trabalho já são conhecidamente super-expressos em gliomas humanos, tanto em nível de mRNA quanto de proteína. O dado original, obtido neste trabalho, se refere aos níveis relativos de expressão destes genes que são correlacionados desde células de glioma de rato até gliomas humanos, o que sugere a existência de alças regulatórias entre eles. Neste contexto, a primeira pergunta seria: qual a relação causal de modulação que existe entre eles ou, mais especificamente, qual o efeito da superexpressão ou silenciamento de cada um destes genes nos níveis de expressão dos demais? Desta maneira, se for possível mostrar que de fato estes genes são capazes de se co-regular reciprocamente, qual seria o impacto dessas interações para o desenvolvimento e a progressão dos gliomas humanos? Alternativamente, a expressão correlacionada destes genes poderia ser a consequência de um ou alguns fatores ou vias que regulassem a expressão de múltiplos genes codificantes para fatores de crescimento e seus receptores. Neste particular, seria interessante, também, a análise das seqüências promotoras destes genes na busca de elementos regulatórios comuns que subsidiariam a investigação de uma possível via regulatória de múltiplas alças autócrinas de fatores de crescimento.

A comprovação de qualquer uma destas hipóteses abriria novas perspectivas, tanto para subsidiar novas linhas de investigação, como para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas visando aplicação clínica de curto a médio prazo. A obtenção de evidências experimentais sobre a existência vias regulatórias comuns aos genes relacionados a fatores de crescimento, subsidiaria a busca dos genes possivelmente envolvidos com estas vias hipotéticas e, uma vez desvendados estes genes, novos alvos terapêuticos potenciais teriam sido encontrados.

Independente dos mecanismos envolvidos no controle da expressão destes múltiplos fatores de crescimento e receptores (fator/via regulatória comum versus co-regulação recíproca), é provável que os mesmos genes, sendo co-expressos na mesma célula, participem de alças autócrinas que atuam sinergisticamente no controle da proliferação e/ou invasão dos gliomas. Neste caso, além dos inibidores dos receptores de PDGF (Imatinib, Gleevec®) e EGF (Gefitinib, Iressa®; Erlotinib, Tarceva®) já disponíveis para o tratamento de gliomas e outros tumores, seria interessante, também, buscar inibidores específicos do(s) receptor(es) de FGFs assim como da fosfatase PTPRZ1 e da tirosina quinase ALK, que atuam como receptores do fator de crescimento pleiotrofina. Drogas com esta atividade, integrariam o crescente grupo das “smart drugs” para o tratamento de tumores, as quais são planejadas para atacar alvos moleculares específicos de cada tipo de tumor. Uma vez estabelecida a existência de alças autócrinas redundantes em gliomas, uma combinação de “smart drugs” direcionadas para múltiplos alvos específicos teria, então, grande chance de apresentar um efeito terapêutico sinérgico, talvez muito maior que o efeitos animadores já obtidos até o momento com “smart drugs” como droga única. Alguns destes fármacos apresentam efeitos dramáticos para certos tipos de tumor, como por exemplo o tratamento de leucemia mielóide crônica com Gleevec®, que se mostrou revolucionário (Druker, 2002; Mauro et al., 2001). No caso dos gliomas, estes medicamentos produzem efeitos superiores aos quimioterápicos convencionais, uma vez que atacam alguns defeitos moleculares típicos destes tumores. Apesar disto, os resultados obtidos ainda estão longe da cura completa, o que evidencia a necessidade de se descobrir novos alvos molecular mais específicos e/ou a necessidade de uma intervenção farmacológica multipontual. De fato, testes clínicos envolvendo fármacos que inibem múltiplos receptores de fator de crescimento já estão em andamento para alguns tipos de tumores refratários, com resultados bastante promissores (Fiedler et al., 2005; Herbst et al., 2005). Os resultados mostrados neste trabalho, corroborando achados da literatura, indicam, portanto, que este pode ser um caminho bastante promissor

para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que venham a contribuir, significativamente, para o tratamento eficaz dos gliomas num futuro próximo.

É importante ressaltar, neste contexto, que é de suma importância a criação e caracterização de modelos experimentais de gliomagenese ortotópica através de estereotaxia, onde seria possível avaliar a contribuição, de cada gene em particular, para a expressão e manutenção *in vivo* dos fenótipos relacionados a migração, invasão e angiogênese dos gliomas, dentro do microambiente próprio em que estes tumores se desenvolvem naturalmente. Para tanto, vetores lentivirais adequados poderiam ser utilizados para modificar geneticamente linhagens celulares de glioma, promovendo a superexpressão exógena de genes de interesse, e/ou o apagamento, via interferência de RNA (RNAi), dos níveis endógenos de expressão de genes relevantes.

Alternativamente, o papel destes poderia ser investigado num contexto mais próximo à situação da doença *in vivo*, com a criação de linhagens de camundongos transgênicos, “knock-out” ou, ainda, “knock-outs” condicionais para os genes de interesse. Estes animais poderiam então serem cruzados com outras linhagens de camundongos geneticamente modificados e que se constituem de modelos de gliomagenese *in vivo*, como as linhagens de camundongo transgênicos para *rasV12G*.(Shannon et al., 2005) ou *c-src* (Maddalena et al., 1999) sob o promotor glia-específico de GFAP, ou então linhagens “knock-out” condicionais para p53 (Yahanda et al., 1995) ou PTEN (Xiao et al., 2005). Desta maneira, seria possível avaliar qual a contribuição de cada gene em particular para a exacerbação ou atenuação do fenótipo de predisposição a gliomas apresentados por certas linhagens de animais geneticamente modificados. A disponibilidade desses modelos experimentais *in vivo* possibilitaria avaliar, inclusive, como linhagens de glioma com diferentes perfis de expressão gênica respondem, *in vivo*, ao tratamento com drogas potencialmente ativas contra gliomas.

A padronização e o estabelecimento destes modelos experimentais, bem como a criação das ferramentas e reagentes que possibilitarão a análise dos genes identificados neste trabalho já foram iniciadas durante este trabalho de doutoramento. Num futuro próximo, é possível que a continuação deste esforço seja encampada por novos membros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, ao longo dos próximos anos.

7. CONCLUSÕES

- A linhagem ST1 de glioma de rato tem menor potencial tumorigênico do que a linhagem P7, de mesma origem, a julgar por ensaios de tumorigênese *in vivo* em camundongos *nude*.
- Foi possível identificar seis genes mais expressos na linhagem ST1 e quatro genes mais expressos na linhagem P7 de glioma de rato, a partir do “screening” de aproximadamente 3.000 genes por hibridização de “macroarrays” de cDNA comerciais, seguido de confirmação de expressão diferencial por Northern Blot;
- A hibridização de “microarrays” Affymetrix® contendo 24.000 sondas, seguida de confirmação de expressão diferencial por Q-PCR, permitiu a confirmação dos resultados anteriores e identificação adicional de dois genes mais expressos na linhagem ST1, e de mais 16 genes mais expressos na linhagem P7.
- Os dados obtidos a partir destas etapas indicam que a linhagem P7 possui várias alças autócrinas ativas, em relação à linhagem ST1. Estes mesmos dados sugerem, ainda, que estas alças autócrinas de estimulação do crescimento devem ser co-reguladas por um mesmo fator comum ou, ainda, se co-regulam mutuamente.
- Foi possível detectar a expressão de vários genes relacionados a fatores de crescimento e seus receptores em linhagens humanas de glioma indicando, também, a presença de várias alças autócrinas de estimulação do crescimento.
- Demonstrou-se que a expressão de vários destes genes é significativamente correlacionada em linhagens de glioma humano.
- Uma análise comparativa do potencial tumorigênico das linhagens humanas de glioma foi empreendida. As linhagens HOG, U87MG e U343MG foram capazes de gerar tumores subcutâneos quando injetadas no dorso de camundongos imunodeficientes do tipo *nude*. Nas mesmas condições, não foi observado a formação de tumor pelas linhagens A172, T98G e U373MG.
- Foi possível confirmar a superexpressão estatisticamente significativa dos genes CHD7, FGF1, PDGFRA, PTN e PTPRZ1 em amostras clínicas de todos os graus de glioma, quando comparadas com cérebro humano não-tumoral.

- Foi observado que os genes CHD7, FGF1, PDGFRA, PTN, PTPRZ1 e SCG2 são co-expressos em amostras clínicas de glioma, apresentando com correlação estatisticamente significativa.
- Foi possível confirmar a superexpressão estatisticamente significativa dos genes ALK, EGFR, FGFR1, RNF130 E ROBO1 em amostras clínicas de determinados graus de glioma humano.
- A expressão do gene RELN está diminuída nos glioblastomas multiformes, e esta diferença foi estatisticamente significativa. Contudo, foi possível observar que não existe diferença de expressão significativa para os genes BRM, BRG-1 e FGFR3 nas amostras testadas.
- Foi possível amplificar o cDNA, a princípio completo, do gene CHD7, um novo fator remodelador de cromatina que está superexpresso em amostras clínicas de glioma.
- A partir de dados de expressão de linhagens de glioma de rato, foi possível inferir e confirmar a expressão correlacionada de um conjunto de genes relevantes para gliomas humanos.
- Foi possível, também, a partir dos perfis de expressão de linhagens de glioma de rato, identificar genes com expressão alterada em gliomas humanos. A expressão diferencial de alguns destes genes não era conhecida até o momento.
- Vários dos genes identificados neste trabalho têm o potencial de se tornarem novos alvos para o desenvolvimento de modalidades terapêuticas inovadoras para o tratamento de gliomas.

8. ANEXOS

Membranas Atlas Rat 588 Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1			
Posição	No. Acesso	Gene Symbol	Descrição
A02b	M61219	rPHB	prohibitin
A02l	X17163	rJUN	Jun oncogene
A03e	L15619	rCSNK2B	casein kinase 2, beta polypeptide
	L15619	hSFRS11	splicing factor, arginine/serine-rich 11
A03g	M15427	rRAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
A03j	U65007	rMET	met proto-oncogene
A05b	D14014	rCCND1	cyclin D1
A05g	L11007	rCDK4	cyclin-dependent kinase 4
A05h	L02121	rCDK5	cyclin-dependent kinase 5
A06e	X59601	rPLEC1	plectin 1
A06j	D84418	rHMGB2	high mobility group box 2
A06n	Y00047	rPCNA	proliferating cell nuclear antigen
A07d	Y00404	rSOD1	superoxide dismutase 1
A07f	X54793	rHSPD1	heat shock protein 1 (chaperonin)
A07k	M86870	rPDIA4	protein disulfide isomerase associated 4
B01b	M92340	rIL6ST	interleukin 6 signal transducer
B01n	D29766	rBCAR1	breast cancer anti-estrogen resistance 1
B02a	D44481	rCRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)
B02c	U35365	rFYN	fyn proto-oncogene
B02g	L26525	rDDR1	discoidin domain receptor family, member 1
B02n	M12492	rPRKAR2B	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta
B04a	D14592	rMAP2K2	mitogen activated protein kinase kinase 2
B05d	M20637	rPLCD1	phospholipase C, delta 1
B05k	U34959	rGNB2	guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 2
B06a	J02999	rRAB2	RAB2, member RAS oncogene family
B06g	X13817	rCALM3	calmodulin 3
B06i	D17615	rYWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
B07e	M59859	rMARCKS	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate
C03h	M69139	rPMP22	peripheral myelin protein 22
C04a	M17528	rGNAI2	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2
C06a	AF016297	rNRP2	neuropilin 2
C07d	M93669	rSCG2	secretogranin 2
D01i	X13722	rLDLR	low density lipoprotein receptor
D04k	J02646	rEIF2S1	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha
D05a	M18547	rRPS12	ribosomal protein S12
D05c	L29259	rTCEB1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1
D06i	M91590	rARRB2	arrestin, beta 2
D07h	U12309	rITGB1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
E01m	U04317	rIL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1
E02k	M29014	rINSR	insulin receptor
F01c	M36589	rNGFB	nerve growth factor, beta
F02h	M55601	rPTN	pleiotrophin
F03e	U25684	rTMSBL1	thymosin beta-like protein 1
F03g	U62326	rMIF	macrophage migration inhibitory factor
F03k	U97142	rGFRA1	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1
F04m	M58593	rPSMA3L	proteasome subunit alpha type 3-like
F04n	D30804	rPSMA7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type
F05b	D10754	rPSMB6	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 6
F05c	D10755	rPSMA6	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6
F06b	U27201	rTIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
F07e	M94056	rDPEP1	dipeptidase 1 (renal)

Anexo 1A – Genes diferencialmente expressos na linhagem ST1 (Membrana “Rat 588”). A lista relaciona os genes correspondentes aos “spots” visualmente selecionados que apresentaram intensidade de hibridização maior com sondas sintetizadas a partir de RNA extraído da linhagem ST1, e hibridizadas contra a membrana de “macroarray” comercial “Rat 588”. O “r” minúsculo precedendo o “Gene Symbol” indica que a sequência da sonda utilizada corresponde à de rato.

Membranas Atlas Rat 588 Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Posição	No. Acesso	Gene Symbol	Descrição
B01i	X63594	rNFKBIA	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
B01k	X91810	rSTAT3	signal transducer and activator of transcription 3
B04m	D64045	rPIK3R1	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1
B05h	L35921	rGNG8	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 8 subunit
C01k	J02592	rGSTM2	glutathione S-transferase, mu 2
C02e	M64723	rCLU	clusterin
C04i	L34067	rGPC1	glypican 1
D02h	J05107	rHSD11B1	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1
E01j	X69903	rIL4R	interleukin 4 receptor
E02h	M60786	rEDNRA	endothelin receptor type A
F01g	U45965	rCXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2

Anexo 1B – Genes diferencialmente expressos na linhagem P7 (Membrana “Rat 588”). A lista relaciona os genes correspondentes aos “spots” visualmente selecionados que apresentaram intensidade de hibridização maior com sondas sintetizadas a partir de RNA extraído da linhagem P7, e hibridizadas contra a membrana de “macroarray” comercial “Rat 588”. O “r” minúsculo precedendo o “Gene Symbol” indica que a sequência da sonda utilizada corresponde à de rato.

Membranas Atlas Rat 1.2 II Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1			
Posição	No. Acesso	Gene Symbol	Descrição
A02n	AB016536	rHNPAB	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
A03b	M65149	rCEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta
A04n	U04833	rPDX1	pancreatic and duodenal homeobox gene 1
A05m	AJ005425	rMEF2D	myocyte enhancer factor 2D
A08k	U51583	rTCF8	transcription factor 8
A08n	U67080	rST18	suppression of tumorigenicity 18
A10b	AB003504	rSMARCD2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2
A11g	M81786	rSDC4	syndecan 4
A12d	Y13714	rSPARC	secreted acidic cysteine rich glycoprotein
B01e	AF065438	rLGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein
B08l	AB008889	rTRPC4	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4
B09g	U17834	rBGN	biglycan
C04c	D87240	rPFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
D05h	X52311	rUNR	upstream of NRAS
D08a	AF041244	rHCRT1	hypocretin (orexin) receptor 1
D09g	M84221	rBZRP	benzodiazepine receptor, peripheral
D09m	AF081152	rLPHN2	latrophilin 2
D12f	L40030	rPGF	placental growth factor
E02l	U38481	rROCK2	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2
E03f	AF084205	rTAOK1	TAO kinase 1
E04d	X84004	rDUSP1	dual specificity phosphatase 1
E09d	U52103	rDPYSL4	dihydropyrimidinase-like 4
E09h	U95178	rDAB2	disabled homolog 2 (Drosophila)
E10d	U24175	rSTAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A
E11a	D88250	rC1s	complement component 1, s subcomponent
F03f	AJ000696	rKIF1C	kinesin family member 1C
F03m	X16261	rMYH11	myosin heavy chain 11
F06g	M34043	rTMSB4X	thymosin, beta 4
F07k	AF014503	rNUPR1	Nuclear protein 1 (p8)

Anexo 2A – Genes diferencialmente expressos na linhagem ST1 (Membrana “Atlas Rat 1.2 II”). A lista relaciona os genes correspondentes aos “spots” visualmente selecionados que apresentaram intensidade de hibridização maior com sondas sintetizadas a partir de RNA extraído da linhagem ST1, e hibridizadas contra a membrana de “macroarray” comercial “Atlas Rat 1.2 II”. O “r” minúsculo precedendo o “Gene Symbol” indica que a sequência da sonda utilizada corresponde à de rato.

Membranas Atlas Rat 1.2 II Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Posição	No. Acesso	Gene Symbol	Descrição
A01b	AF049882	rKAI1	kangai 1
A01k	X61654	rCD63	CD63 antigen
A06d	X76454	rRIL	reversion induced LIM gene
A07g	K02816	rRPO2TC1	RNA polymerase II transcriptional coactivator
A10n	U49055	rRBM16	RNA binding motif protein 16
B04d	D30035	rPRDX1	peroxiredoxin 1
B06b	Z96106	rKCNH2	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2
B09k	AJ224879	rCOL2A1	procollagen, type II, alpha 1
B14n	AJ004912	rTMP21	transmembrane trafficking protein 21
C02b	J03583	rCLTC	clathrin, heavy polypeptide (Hc)
C07a	X12553	rCOX6A1	cytochrome c oxidase, subunit VIa, polypeptide 1
C07d	M22756	rNDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2
C07f	AB016800	rDHCR7	7-dehydrocholesterol reductase
C09f	U90340	rADK	adenosine kinase
C09g	X16554	rPRPS1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1
D01g	U62940	rGRPEL1	GrpE-like 1, mitochondrial
D01k	M81225	rFNTA	farnesyltransferase, CAAX box, alpha
D01l	U21662	rMGAT2	Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
D03k	X13549	rRPS10	ribosomal protein S10
D03m	C07082	rRPS14	ribosomal protein S14
D04d	X06423	rRPS8	ribosomal protein S8
D04f	X53377	rRPS7	ribosomal protein S7
D05a	X05300	rRPN1	ribophorin I
D05l	D49708	rSFRS10	splicing factor, arginine/serine-rich 10 (transformer 2 homolog, Drosophila)
D06c	U32577	rHNRPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
D06l	M37584	rH2AFZ	H2A histone family, member Z
D06m	X70685	rH1F0	H1 histone family, member 0
D07b	AF062594	rNAP1L1	nucleosome assembly protein 1-like 1
D07c	M55022	rNCL	nucleolin
D07e	U89695	rHMGA2	high mobility group AT-hook 2
D07l	U04319	rIL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1
D12a	Y07503	rPENK-RS	preproenkephalin, related sequence
D12b	AF030358	rCX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
D13b	M11596	rCALCB	calcitonin-related polypeptide, beta
D13d	M13588	rPPY	pancreatic polypeptide
D13g	M35965	rTG	thyroglobulin
D14e	U67884	rMIA	cartilage derived retinoic acid sensitive protein
E07h	M54919	rS100B	S100 protein, beta polypeptide
E12h	M15944	rMME	membrane metallo endopeptidase
E12l	L09120	rCAPN2	calpain 2
F04d	U39046	rDNCIC2	dynein, cytoplasmic, intermediate chain 2
F04g	M60666	rTPM1	tropomyosin 1, alpha
F04j	J02780	rTPM4	tropomyosin 4
F05g	AJ002556	rMTAP6	microtubule-associated protein 6
F05l	AB002406	rRUVBL1	RuvB-like protein 1
F06i	U18314	rTMPO	thymopoietin
F09d	M58677	rODF1	outer dense fiber of sperm tails 1
F09e	M62930	rREG1	regenerating islet-derived 1
F14a	M97255	rTFF2	trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)
F14f	U25264	rSEPW1	selenoprotein W, muscle 1

Anexo 2B – Genes diferencialmente expressos na linhagem P7 (Membrana “Atlas Rat 1.2 II”). A lista relaciona os genes correspondentes aos “spots” visualmente selecionados que apresentaram intensidade de hibridização maior com sondas sintetizadas a partir de RNA extraído da linhagem P7, e hibridizadas contra a membrana de “macroarray” comercial “Atlas Rat 1.2 II”. O “r” minúsculo precedendo o “Gene Symbol” indica que a sequência da sonda utilizada corresponde à de rato.

Membranas Atlas Mouse Cancer 1.2			
Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1			
Posição	No. Acesso	Gene Symbol	Descrição
A07g	X95600	mCDH8	cadherin 8
A08f	U94479	mILK	integrin linked kinase
A10b	D16263	mCSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2
A10n	M87276	mTHBS1	thrombospondin 1
A13e	D13867	mITGA3	integrin alpha 3
A13h	J05287	mLAMP2	lysosomal membrane glycoprotein 2
B03i	X68193	mNME2	expressed in non-metastatic cells 2, protein
B04c	X70804	mRAB17	RAB17, member RAS oncogene family
B06m	M14757	mABCB1B	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
	M30697	mABCB1A	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A
B07m	J04696	mGSTM2	glutathione S-transferase, mu 2
B08c	J03752	mMGST1	microsomal glutathione S-transferase 1
B08f	M86752	hSTIP1	stress-induced-phosphoprotein 1
B08n	M63802	mGJB1	gap junction membrane channel protein beta 1
B09m	X93167	mFN1	fibronectin 1
B10m	X66405	mCOL6A1	procollagen, type VI, alpha 1
B12g	D87866	mUGT1A2	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A2
C01a	U17162	mBAG1	Bcl2-associated athanogene 1
C01l	U43184	mFADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
C02e	L28095	mCASP1	caspase 1
C02m	U01664	mPPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma
C03j	L08235	mCLU	clusterin
C11f	X51983	mTHRA	thyroid hormone receptor alpha
D07i	X16053	mTMSB4X	thymosin, beta 4, X chromosome
D07j	M13177	mTGFB1	transforming growth factor, beta 1
D13d	U41285	mDVL3	dishevelled 3, dsh homolog (Drosophila)
D13f	U77638	mSMAD5	MAD homolog 5 (Drosophila)
D14g	S72408	mCRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)
D14m	L21768	mEPS15	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
E01c	Y00487	mHCK	hemopoietic cell kinase
E03c	L35303	mTRAF2	Tnf receptor-associated factor 2
E04c	U10871	mMAPK14	mitogen activated protein kinase 14
E06a	Z14249	mMAPK3	mitogen activated protein kinase 3
E09g	U53276	mPPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform
E09k	M81483	mPPP3CB	protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isoform
E09m	U12204	mPPP5C	protein phosphatase 5, catalytic subunit
E10m	L09562	mPTPRG	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G
E11g	Y00703	mGNAS	GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus
E11i	Y00094	mRAB1	RAB1, member RAS oncogene family
E12b	X99963	mRHOB	ras homolog gene family, member B
E13g	U57311	mYWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
E14m	Z19579	mSIAH1A	seven in absentia 1A
F03k	M59470	mCST3	cystatin C
F05f	X62622	mTIMP2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2
F08d	X82402	mFN1	fibronectin 1
F09e	L20276	mBGN	biglycan
F09h	D49382	mSEPT2	septin 2
	D10915	mSEPT2	septin 2

Anexo 3A – Genes diferencialmente expressos na linhagem ST1 (Membrana “Atlas Mouse Cancer 1.2”). A lista relaciona os genes correspondentes aos “spots” visualmente selecionados que apresentaram intensidade de hibridização maior com sondas sintetizadas a partir de RNA extraído da linhagem ST1, e hibridizadas contra a membrana de “macroarray” comercial “Atlas Mouse Cancer 1.2”. O “m” minúsculo precedendo o “Gene Symbol” indica que a sequência da sonda utilizada corresponde à de camundongo.

Membranas Atlas Mouse Cancer 1.2 Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Posição	No. Acesso	Gene Symbol	Descrição
A08m	J04806	mSPP1	secreted phosphoprotein 1
B04i	X83974	mTTF1	transcription termination factor 1
C04g	U44088	mPHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
D03i	M70642	mCTGF	connective tissue growth factor
D06b	D90225	mPTN	pleiotrophin
E11e	M13963	mGNAI2	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2
F07d	D00472	mCFL1	cofilin 1, non-muscle

Anexo 3B – Genes diferencialmente expressos na linhagem P7 (Membrana “Atlas Mouse Cancer 1.2”). A lista relaciona os genes correspondentes aos “spots” visualmente selecionados que apresentaram intensidade de hibridização maior com sondas sintetizadas a partir de RNA extraído da linhagem P7, e hibridizadas contra a membrana de “macroarray” comercial “Atlas Mouse Cancer 1.2”. O “m” minúsculo precedendo o “Gene Symbol” indica que a sequência da sonda utilizada corresponde à de camundongo.

Anexo 4 – Genes diferencialmente expressos entre as linhagens ST1 e P7 identificados nos experimentos de hibridização de microarrays (“GeneChip U34 Rat Genome Set”, Affymetrix®). A lista relaciona os genes correspondentes aos “probe sets” com sinal significativo e que apresentaram expressão relativa $>2,00$, após análise dos resultados de hibridização de sondas provenientes das linhagens ST1 e P7 que foram hibridizadas contra um conjunto de “microarrays” que analisa, ao todo, a expressão de cerca de 24.000 transcritos diferentes distribuídos ao longo de todo o genoma do rato (“GeneChip U34 Rat Genome Set”, Affymetrix®). As listas dos genes que apresentaram expressão diferencial neste experimento está disposta em ordem decrescente de expressão relativa. Estão relacionados: os “probe sets” que apresentaram expressão diferencial e sua respectiva localização nos “chips”, assim como o número de acesso das seqüências interrogadas e os “Gene Symbol”, que foram reanotados para cada um dos “probe sets”. As letras minúsculas precedendo o “Gene Symbol” indica a espécie do ortólogo mais próximo (r = rato, m = camundongo, h = humano).

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
C	rc_AI169156_at	mGLYAT	2854,0	B	rc_AA900984_at	hLDLRAD3	3089,0
C	rc_AI071826_at	hTP53I5	2575,5	A	rc_AA891810_g_at	hRNF130	2434,8
B	rc_AI012992_s_at	rPPARG	1269,5	C	rc_AI235915_at	rFGFR1	1223,5
A	U03416_at	rOLFM1	743,8	C	rc_AI102037_at	rKCNA1	1080,8
A	M96601_at	rSLC6A6	628,0	C	rc_AI168935_at	rFLJ10970	950,4
B	rc_AA955408_at	hSOX9	527,5	B	rc_AA900826_at	hGPR115	950,0
A	AF034577_at	rPDK4	505,5	A	rc_AA957201_s_at	rLMNB1	878,7
C	rc_AI101587_r_at	hSRF	386,2	A	M93669_at	rSCG2	864,5
A	rc_AI172247_at	rXDH	364,5	A	S54008_i_at	rFGFR1	820,4
B	rc_AA997015_at	rLOC499318	288,7	B	rc_AI058424_at	rLGI4	713,5
A	X57169_i_at	rCRYGD	261,4	C	rc_AI104393_at	rART3	506,6
A	rc_AI639090_at	rAI639090	211,8	A	rc_AA891810_at	hRNF130	430,5
A	AF021137_s_at	rKCNJ2	185,6	C	rc_AI230951_at	hCOTL1	422,8
A	rc_AA893351_at	rPTER	168,6	C	rc_AI072460_at	mAK047753	409,6
C	rc_AI111707_at	hPSCA	127,1	A	AJ224879_at	rCOL2A1	365,0
B	rc_AI059530_at	hAK7	122,8	A	AB009372_at	rLOC246266	308,2
A	U64451_at	rACADSB	117,1	C	rc_AI072183_at	rFOS	299,2
C	rc_AI103109_at	hIER5	114,5	A	rc_AA925717_at	hAATK	284,7
B	rc_AI059103_at	hFRMD4B	81,9	C	rc_AI230939_at	rMTSG1	253,9
C	rc_AI102739_at	hHOP	78,9	C	rc_AA817718_at	hTMEM47	232,9
B	rc_AI030727_at	hLOC387869	77,2	B	rc_AA998190_at	hLOC51136	232,7
C	rc_AI175045_at	rPDK4	60,0	B	rc_AA924006_s_at	rTIMP3	229,3
A	J03637_at	rALDH3A1	57,4	B	rc_AA924155_at	hKIAA0280	213,0
C	rc_AI171372_at	mSYPL2	56,9	A	L32602_at	rOTX1	202,6
A	V01216_at	hORM1	56,5	C	rc_AI145424_at	rFGFR3	200,0
C	rc_AI233995_at	hPDE8A	54,0	A	rc_AI169612_at	rFABP4	175,7
B	rc_AI070068_at	rGADD45B	51,4	A	M22340cnds#1_s_at	rCRTL1	174,6
C	rc_AI072788_at	hSOX9	44,5	C	rc_AI073282_at	mRGR	168,7
B	rc_AI044631_at	hCD3G	43,3	B	rc_AI030156_at	mKLH15	168,5
C	rc_AI072020_at	hTIMP4	42,2	C	rc_AI072647_at	hISGF11	168,1
B	rc_AA997330_at	hFAM46B	40,1	B	rc_AA943463_at	mAAK1	149,9
B	rc_AA924157_at	hFANCF/hGAS2	35,8	A	M26161_at	rKCNA1	142,0
C	rc_AI102887_at	rHod	32,6	A	M31837_at	rIGFBP3	141,1
A	AB011365_s_at	rPPARG	30,9	C	rc_AA858903_at	rTIMP-3	138,7
A	rc_AI045440_at	rSPN	30,3	A	rc_AA892861_at	hMGC52423	128,0
B	rc_AA851719_at	hC20orf160	24,7	A	AF041082_at	rROBO1	122,5
C	rc_AI101851_at	mCYB561	24,7	A	rc_AI102795_at	rPTN	120,1
B	rc_AA926109_at	hINHBA	24,6	C	rc_AI232103_at	rCOL18A1	100,7
B	rc_AA998260_at	hALS2CL	24,4	B	rc_AA849817_at	rKCNA1	94,4
A	rc_AA891527_at	rFHL2	21,1	B	rc_AI058357_at	hFLJ10970	90,3
C	rc_AI177132_i_at	rMR	18,7	B	rc_AI044845_at	hEML1	89,0
B	rc_AI008321_at	hSOX9	18,3	C	rc_AI137584_at	rAI137584	85,9
B	rc_AA925360_at	rMCPT2	18,1	A	rc_AA859536_at	hBASP1	79,3
B	rc_AA998506_at	mIIGP1	17,6	B	rc_AI043832_at	rIL1R1	79,1
A	Y00311_at	rTHEDC1	16,3	C	rc_AI179717_at	hKIAA1914	72,9
A	M91652complete_seq_at	rGLUL	16,0	B	rc_AI060225_at	hPREX1	71,3
A	rc_AI102562_at	rMT1A	15,9	A	U07619_at	rF3	68,3
B	rc_AI044427_at	hDMPK	15,9	C	rc_AI170244_at	hRNF130	58,4
A	rc_AI232783_s_at	rGLU1	14,3	B	rc_AI008258_r_at	rSYNGAP1	56,1

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
A	S68944_i_at	mSLC6A17	14,2	C	rc_Ai177031_at	rPPAB2B	55,2
B	rc_Ai012265_i_at	rGLUL	14,1	C	rc_Ai144771_at	hTUB/hRIC3	55,2
A	rc_AA852004_s_at	rGLUL	13,6	A	U04998_at	rPTPRZ1	53,0
C	rc_AA858817_at	hC10orf10	13,6	A	D12498_s_at	rFGFR1	52,6
A	K00512_at	rMBP	13,3	C	rc_Ai102401_at	hEDIL3	51,9
B	rc_AA944752_at	hWHDC1	12,8	C	rc_Ai176468_at	hEML1	48,8
A	M91652complete_seq_g_at	rGLUL	12,3	B	rc_AA925302_at	hTTC9	46,9
A	J02962_at	rLGALS3	11,8	A	U09357_at	rPTPRZ1	44,7
C	rc_AA818571_at	hNTN4	11,7	B	rc_AA963833_at	hCHGN	44,4
C	rc_Ai104875_at	rEYA2	11,3	C	rc_Ai071251_at	hGPC4	43,0
A	rc_AA799786_s_at	rABCC8	11,1	C	rc_Ai137227_at	hBTBD14A	42,4
C	rc_Ai231074_at	m2010004M13Rik	10,9	A	rc_AA874873_g_at	hSESN3	42,2
A	U90888_at	rAMPD3	10,9	A	U09401_s_at	rTNC	41,5
C	rc_AA817785_at	mFOXF1A	10,9	A	rc_AA893592_at	hRCN1	37,1
C	rc_Ai172612_at	rCYP21A1/rTNXB	10,8	B	rc_Ai043809_f_at	rGAS7	34,8
B	rc_AA850917_at	rPFKFB3	10,6	A	S75687_s_at	rSLC1A3	34,7
B	rc_Ai013928_at	hFNDC6	10,6	A	L35558_s_at	rSLC1A1	34,4
B	rc_Ai008850_at	rIL17RE	10,3	C	rc_Ai233269_at	hITGB8	33,5
B	rc_AA850867_at	rSGCG	10,2	A	SS3527mRNA_s_at	rS100B	33,1
B	rc_AA900847_at	rMYO1C	10,2	B	rc_AA944823_at	hSGEF	31,1
A	D15069_s_at	rADM	10,0	B	rc_Ai010612_at	rTNC	29,9
A	AB003992_s_at	rSNAP25B	9,8	A	rc_Ai639037_at	hCED6	29,4
B	rc_Ai029337_at	rAI029337	9,6	C	rc_Ai100875_at	mCKLFSF5	28,7
A	rc_H31802_at	hTRIM7	9,6	C	rc_Ai071102_at	hSTOX2	28,2
C	rc_AA818910_at	hARRDC3	9,5	A	rc_Ai177026_at	rATP1A2	27,9
B	rc_Ai059513_at	hPNPLA2	9,5	C	rc_Ai145591_at	hG2	27,7
A	M64733mRNA_s_at	hCLU	9,5	A	rc_AA875033_at	rFBLN5	27,6
A	AF014503_at	rNP1 (P8)	8,9	C	rc_Ai102560_at	hRAPGEF5	27,5
B	rc_AA924902_at	hWHDC1	8,9	A	U15550_at	rTNC	27,0
A	M24067_at	rSERPINE1	8,7	B	rc_Ai044699_at	rRNF144	26,8
A	S56937_s_at	rUGT1A6/1A7	8,4	B	rc_AA943965_g_at	rCIRL3	26,3
C	rc_Ai171603_at	hOGN	8,4	B	rc_AA849714_at	hTMEM56	25,6
B	rc_Ai044147_at	hCA7	8,1	C	rc_Ai231717_at	rGPM6B	24,9
A	L19998_at	hSULT1A1	8,1	B	rc_AA900326_at	hSOCS2	24,8
C	rc_AA818807_at	hEMP2	8,0	B	rc_AA956304_at	rCISH2	24,0
B	rc_Ai030704_at	mITGA3	7,8	B	rc_Ai070269_at	hECRG4	23,2
A	M73714_at	rALDH3A2	7,8	C	rc_Ai231255_at	hChGn	22,7
A	rc_AA858520_at	rFST	7,7	B	rc_AA963664_at	rRELN	21,5
B	rc_Ai013568_at	hFLJ10847	7,6	A	rc_AA859661_at	QPCT	20,2
C	rc_Ai171611_at	hGPD1L	7,6	B	rc_AA998395_f_at	rCTGF	19,9
A	U24489_g_at	rTNX	7,5	B	rc_Ai008190_at	rGNG2	19,4
A	J02612mRNA_s_at	rUGT1A6	7,5	C	rc_AA818353_at	mDAPK1	18,8
C	rc_Ai175575_at	mFST	7,3	B	rc_AA997460_at	rDUSP4	18,0
B	rc_Ai060279_at	hTNS	7,2	A	U97142_at	rGFRA1	17,8
C	rc_Ai102314_at	hMGC35048	7,1	C	rc_Ai070843_at	rSLC35F1	17,1
C	rc_Ai23749_at	rTNS	7,0	A	AJ131902_g_at	rGAS7	16,6
A	M58495mRNA_at	rNQO1	6,9	C	rc_Ai072336_at	mNKD2	16,2
B	rc_AA849497_at	hACAS2	6,8	B	rc_AA946489_at	rGPM6B	15,8
C	rc_Ai231792_at	hBAG3	6,7	B	rc_AA943965_at	rCIRL3	15,6

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
A	Y00396mRNA_at	rCMYC	6,7	B	rc_AA996698_at	hC1orf153	15,5
A	rc_AA858520_g_at	rFST	6,6	B	rc_AI044816_at	hTTC9	14,8
B	rc_AA964755_at	rTHBS1	6,6	A	rc_AA891884_at	rERBB3	14,7
A	L19998_g_at	rSULT1A1	6,5	C	rc_AI234003_at	rGPM6B	14,6
A	E00778cds_s_at	rCYP1A1	6,4	B	rc_AA925373_at	rPCDH7	14,5
C	rc_AI178261_at	rOCIL	6,3	B	rc_AA998025_at	rCHC1L	14,5
C	rc_AI229118_at	hRGS17	6,3	C	rc_AA818355_at	mMRO	14,3
B	rc_AA926305_g_at	rSLC6A6	6,2	A	rc_AA859805_at	hLOXL1	13,7
A	S77528cds_s_at	rCEBPB	6,2	C	rc_AI228494_f_at	rAKAP12	13,4
A	U31598_s_at	rH1ADMA	6,2	C	rc_AI070532_at	rPHLDA1	13,2
C	rc_AA818609_at	hKIAA1949	6,1	C	rc_AI112730_at	mTRPM3	13,1
B	rc_AA996451_at	hFAM53B	6,1	C	rc_AI236672_at	rPCDH7	13,1
C	rc_AI169321_at	hNPHP3	6,1	A	AF038571_s_at	rSLC1A1	13,0
A	X73524_at	rDES	6,1	A	rc_AI070721_s_at	rGFRA1	13,0
C	rc_AI071307_at	mNRPB	6,0	A	X68041cds_s_at	rSOD3	12,9
B	rc_AI012562_at	hAD023	6,0	B	rc_AI070318_at	rCTGF	12,8
B	rc_AI029189_at	hGAN	5,9	B	rc_AI013647_at	hDOC1	12,7
A	AF086758_g_at	hSLC12A2	5,9	B	rc_AA851185_at	rSOCS2	12,4
A	rc_AI011498_at	rBAF60b	5,9	B	rc_AA996943_at	rPHACTR1	12,3
A	E00717UTR#1_s_at	rCYP1A1	5,9	C	rc_AI172159_at	miSLR	12,2
A	AF089730_at	rSLACK	5,9	B	rc_AI071921_at	mPYCR2	12,1
C	rc_AI105154_at	hOGFRL1	5,7	A	X94185cds_s_at	DUSP6	12,0
B	rc_AA998264_at	mBLVRB	5,7	C	rc_AI176815_at	rTIMP3	11,8
A	S74351_s_at	DUSP1	5,7	A	rc_AA860017_at	rROBO1	11,8
B	rc_AI012590_at	rSTK17B	5,7	C	rc_AI178093_at	rFXD3/rLGI4	11,7
A	J05132_s_at	rUGT1A6	5,6	C	rc_AA858877_at	mLEF1	11,2
C	rc_AI011666_at	hARMC8	5,6	C	rc_AI176185_at	mFOS	10,7
B	rc_AI028964_at	hNPAL3	5,5	C	rc_AI071372_at	hDKFZp434L142	10,5
B	rc_AI045602_at	hPLEKHA6	5,5	B	rc_AA924107_at	rTIMP3	10,5
C	rc_AA858528_s_at	hIGFBP4	5,5	A	rc_AI169708_s_at	rUGT2B	10,4
C	rc_AI103386_at	rFST	5,4	C	rc_AI228356_at	hFAM57A	10,3
B	rc_AA923955_at	rSLC20A2	5,4	C	rc_AI231086_at	rLEF1	10,3
A	S56936_s_at	rUGT1A6	5,3	C	rc_AI072481_at	rIDB4	10,2
B	rc_AI013875_at	hSORBS1	5,3	C	rc_AI229906_at	mMARCKS	10,2
C	rc_AI102098_at	hSCF	5,3	C	rc_AI101323_at	hETV5	10,1
A	D38062exon_s_at	rUGT1A7	5,3	C	rc_AI234349_at	rLPHN3	10,1
A	U24489_at	rTNX	5,3	B	rc_AA851229_at	hCLIC2	10,0
A	rc_AA800753_at	hIPO7	5,2	A	M90661_at	rINSRR	9,9
A	AF090867_g_at	rGMPR	5,1	C	rc_AI136875_at	hNOTCH1	9,7
C	rc_AI179271_at	hRGS17	5,1	C	rc_AA819192_at	hPDE7B	9,4
A	D87240_at	rPFKFB3	5,0	A	rc_AI009405_s_at	rIGFBP3	9,2
B	rc_AI059588_at	hC19orf33	5,0	A	rU03491_at	rTGFB3	9,1
A	S82233_s_at	rMGC72987	5,0	B	rc_AI013042_at	mSREBF1	9,1
A	rc_AA891690_g_at	hTNFSF13	5,0	B	rc_AA850338_g_at	mHOOK3	8,9
C	rc_AI071565_s_at	rKLF9	4,9	A	rc_AA874873_at	mSES3	8,9
A	AF071204_g_at	rSCF	4,9	B	rc_AA997821_at	mSES3	8,8
B	rc_AI008643_at	hDNAJB4	4,9	C	rc_AI231127_at	mTGFB1	8,7
B	rc_AI058767_at	rPIP5K2A	4,8	A	rc_AI639056_at	IL1RAP	8,6
B	rc_AI010140_at	hMBNL1	4,8	B	rc_AI009159_at	rTIMP3	8,6

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
A	rc_AA996484_g_at	rALDH3A2	4,8	A	AJ003148cds_s_at	rGAS7	8,5
C	rc_AI072213_at	hSLC7A6OS	4,8	A	U42627_at	rDUSP6	8,5
A	M64301_g_at	rMAPK6	4,7	C	AA801076_at	hSLC44A1	8,5
C	rc_AI104996_at	rKCHIP2C	4,7	C	rc_AI233818_at	rAKAP12	8,4
B	rc_AI043880_at	rPNKWNK4	4,7	A	rc_H31897_at	hFLJ20160	8,3
B	rc_AI071926_at	rAI071926	4,7	A	L02529_at	rFZD1	8,3
C	AA848569_at	mFEM1A	4,7	C	rc_AI103361_at	hTMEM56	8,2
B	rc_AA963627_at	hHSPB7	4,7	B	rc_AI012471_at	mEFHD1	8,2
A	M26744_at	rIL6	4,7	A	AF026504_at	rSIPA1L1	8,0
B	rc_AA955287_at	mRRAS2	4,6	A	rc_AA800844_s_at	hLOXL1	8,0
C	rc_AI175104_at	hMBNL1	4,6	A	U82612cds_at	rFN1	8,0
A	rc_AA799803_at	hC1r	4,6	A	D63886_s_at	rMMP16	7,9
A	D10938exon_s_at	rBDNF	4,5	B	rc_AA924236_at	rERBB3	7,8
A	rc_AA963447_at	rPTEN	4,5	A	rc_AI013472_at	rPPAB2B	7,8
A	rc_AA799567_at	hFLJ40722	4,5	C	rc_AI233311_at	hCRLF1	7,8
A	D12769_g_at	rBTEB1	4,5	A	U48592_g_at	mIL1RAP	7,7
A	M64301_at	rMAPK6	4,5	B	rc_AI030338_at	rLPHN3	7,7
B	rc_AI009014_at	hLOC57149	4,5	C	rc_AI070522_at	hLAPTM4B	7,7
A	rc_AI176456_at	hMT2A	4,5	A	U17254_g_at	rNR4A1	7,6
A	U09870_at	hMVP	4,4	A	U63740_at	rFEZ1	7,5
B	rc_AI012340_s_at	rPSMB9	4,4	A	D14441_at	rBASP1	7,5
C	rc_AI176993_at	hLOC201895	4,4	C	rc_AI229036_at	rGPSM1	7,5
C	rc_AI072744_at	hHSPB7	4,4	A	X92069_at	rP2RX5	7,4
A	rc_AA875244_at	hOSR1	4,4	B	rc_AA965161_at	rTIMP3	7,4
C	C06892_at	rMSLN	4,4	C	rc_AI105205_at	hSLC44A1	7,2
C	rc_AI176041_at	hPIR	4,3	A	X06984cds_s_at	rALDOC	7,2
C	rc_AI105421_at	rKLF9	4,3	C	rc_AI228386_at	rNEDD9	7,1
B	rc_AA900046_at	hGTF2IRD1	4,3	C	rc_AI102768_at	hLAPTM4B	7,1
C	rc_AI227734_at	mYSG2	4,3	A	AJ001029_at	rSOX10	7,1
A	M64488_at	mSYT2	4,3	B	rc_AA924107_g_at	rTIMP3	7,0
B	rc_AI009415_f_at	rCSTH	4,3	A	U09361_s_at	mTNC	7,0
B	rc_AA964692_at	rRNF141	4,3	A	AF076619_at	rGRB14	6,9
A	M29293_at	rSNRPN	4,3	B	rc_AI009643_at	rNRP1	6,9
A	rc_AA892179_at	hC6orf4	4,2	A	L14323_at	hPLCB1	6,8
B	rc_AI043713_at	mCD300LE	4,2	C	rc_AI236539_at	hSLC44A1	6,8
C	rc_AI101338_at	hEIF4E3	4,2	C	rc_AA818860_at	rIDB4	6,8
C	rc_AI232269_at	hLOC58489	4,2	A	U75404UTR#1_s_at	rAKAP12	6,8
C	rc_AI170067_at	hMLLT4	4,2	A	M63656_s_at	rALDOC	6,8
B	rc_AA998258_at	mFKBP5	4,2	B	rc_AA998207_at	rJAM3	6,7
B	rc_AI059580_at	rRNF141	4,2	A	U70211_at	hEVL	6,7
A	D83796_s_at	rUGT1A6	4,2	C	rc_AI235732_at	rNID2	6,6
C	rc_AI171281_at	mOGN	4,2	A	AF015304_at	rSLC29A1	6,5
C	rc_AI111605_at	mYSG2	4,2	C	rc_AI170117_at	rALCAM	6,5
B	rc_AI013924_at	hDIAPH1	4,1	C	rc_AI180121_s_at	rALDOC	6,4
B	rc_AI008416_s_at	hLOC201895	4,1	C	rc_AI111551_at	hFLJ12442/hSTAB1	6,4
A	AF051561_s_at	rSLC12A2	4,1	A	U07971_at	rGATM	6,3
B	rc_AI011832_at	rSNRK	4,1	B	rc_AA956483_at	rMPZ	6,3
B	rc_AA925961_s_at	rSLC12A2	4,1	C	rc_AI144801_at	hNETO2	6,3
B	rc_AA945996_at	rAGTRL1	4,1	B	rc_AA956246_at	hACPL2	6,2

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
C	rc_AI179988_at	mNRPB	4,0	A	rc_H31479_at	hNECL2	6,2
A	M11794cds#2_f_at	rMT1A	4,0	C	rc_AI136370_at	mLRIG3	6,1
A	X60769mRNA_at	rCEBPB	4,0	B	rc_AA943307_g_at	rSRC	6,1
C	rc_AI229596_at	m3830408D24Rik	4,0	A	M11596_at	rCALCB	6,1
B	rc_AA849876_at	hMBNL1	4,0	A	rc_AI639331_at	AP1S3	6,0
C	rc_AI172491_at	hIDH2	4,0	A	rc_AA800735_g_at	hSVIL	5,9
A	U38481_at	rROCK2	4,0	C	rc_AA858997_at	hDAPK1	5,9
A	rc_AA891785_at	hIDH2	4,0	B	rc_AA925662_at	hSLC31A2	5,7
B	rc_AA998006_at	hPPP1R12C	4,0	A	rc_AI012030_at	rMGP	5,7
B	rc_AA998266_at	rTNIP1	3,9	B	rc_AI070278_at	mBQ745459/hGPR125	5,7
A	M55250_at	rGLRA3	3,9	A	S67900_s_at	rPFKFB2	5,7
A	J02722cds_at	rHMOX1	3,9	B	rc_AI012214_at	rPHACTR1	5,6
C	rc_AI071397_at	rVP165	3,9	C	rc_AI072254_at	hC1orf139	5,6
C	rc_AI102927_at	rGLRX1	3,9	C	rc_AI230834_at	rMARCKS	5,5
B	rc_AI010171_at	mLNPEP	3,9	B	rc_AA957765_at	rSLC31A1	5,4
C	rc_AI177657_at	hGALK2	3,9	A	rc_AI102620_at	rMAP3K1	5,4
A	X73411mRNA_s_at	rSNRNP	3,9	C	rc_AI072625_at	hEVI1	5,4
C	rc_AI103584_at	hKLF15	3,8	A	L25785_at	rTGFB1I4	5,3
C	rc_AI171692_s_at	mCCBL1	3,8	C	rc_AI102741_at	rTIMP3	5,3
C	rc_AI179481_at	hHNF4A	3,8	C	rc_AI234660_at	hC20orf112	5,3
B	rc_AA945591_at	mSDF2L1	3,8	C	rc_AI232183_at	hDEPDC6	5,2
B	rc_AI058359_at	mCDC42EP2	3,8	C	rc_AA858564_at	hSOX2	5,2
A	rc_AI176726_at	hMGC14161	3,8	B	rc_AA997767_at	hTMEM51	5,2
C	rc_AI236160_at	mGPRK5	3,7	A	rc_AA800298_at	hCOL15A1	5,2
C	rc_AI071699_at	hBCAS3	3,7	A	U52530_s_at	ErbB3	5,1
A	rc_AI145367_at	mCAP2	3,7	B	rc_AA944162_at	mOLFML2A	5,1
A	AF022774_g_at	rRPH3A1	3,7	C	rc_AI176941_at	hDKFZP564D166	5,0
A	rc_AA891916_g_at	mMIR16	3,7	A	AF016296_at	mNRP1	5,0
B	rc_AA944502_at	hMBNL2	3,7	C	rc_AI234341_at	rAPLN	5,0
C	rc_AI231450_at	mMEF2A	3,7	A	AB000216_at	rCCA3	5,0
C	rc_AI179538_at	rKLF4	3,7	C	rc_AI231350_at	rDUSP6	4,9
A	rc_AA800197_at	hTCP11L2	3,6	A	AF026505_at	rARGBP2	4,9
C	rc_AI178629_s_at	rPSBM8	3,6	B	rc_AA925408_at	mMID2	4,9
C	rc_AI104245_at	hDHRSX	3,6	A	rc_AA859645_at	rATRN	4,9
C	rc_AI231805_at	rMGC105649	3,6	A	X12589cds_s_at	rKCNA1	4,8
A	L24907_at	rCAMK1	3,6	B	rc_AI059603_at	hDEPDC6	4,8
B	rc_AA943066_at	hDDEF1	3,6	B	rc_AA964411_f_at	mATP6V0E2/hATP6V0E2L	4,8
B	rc_AA851567_s_at	mIGH6	3,6	A	Z46614cds_at	rCAV	4,8
B	rc_AI059844_at	mTRAFD1	3,6	C	rc_AI177105_at	mD9UCLA1/hNS5ATP13TP2	4,7
B	rc_AI007753_at	mPLEKHA6	3,6	C	rc_AI176160_at	rIL6ST	4,7
B	rc_AA848823_s_at	rNR3C1 (GR)	3,5	A	AB002558_at	rGAPDH	4,7
C	rc_AA818036_at	Retroviral sequence	3,5	C	rc_AI172602_s_at	rMARCKS	4,7
C	rc_AI175998_at	mTMOD3	3,5	A	AF000942_at	rID3	4,7
A	rc_AA866299_g_at	hPPP2R3A	3,5	A	rc_AI639269_at	mMS4A8A	4,7
B	rc_AA924654_at	mCLK4	3,5	B	rc_AI009713_at	hSPATA13	4,6
A	Y00396mRNA_g_at	rMYC	3,5	A	D86041_at	hDDAH1	4,6
C	rc_AI111960_at	hFKBP5	3,5	C	rc_AI101533_at	rDTX4	4,6
C	rc_AI113011_at	hDCUN1D3	3,5	A	rc_AI102868_at	hPSAT1	4,6
C	rc_AI178602_at	mGOLPH4	3,5	A	rc_AI171268_at	rID3	4,6

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
B	rc_AA924354_at	mDIXDC1	3,5	C	rc_Al170399_at	hDKFZP564D166	4,6
B	rc_Al060043_at	hPHCA	3,5	A	rc_Al137583_at	rID2	4,6
A	AF077354_g_at	rHSPA4	3,5	C	rc_Al111954_at	hSOX2	4,5
A	X07266cde_s_at	hERRFI1	3,5	C	rc_Al227679_at	rUNC5C	4,5
B	rc_Al043791_at	rGILZ	3,4	C	rc_Al233280_at	mTM4SF1	4,5
A	rc_AA891595_at	rROCK2	3,4	C	rc_Al231702_at	hRALP	4,5
B	rc_Al043640_at	mMEF2C	3,4	C	rc_Al102884_at	mPELI2	4,5
B	rc_Al008618_at	hFOXP1	3,4	A	M75148_at	hKNS2	4,5
B	rc_Al009426_at	rTGM2	3,4	C	rc_Al137933_at	hKIAA1549	4,4
C	rc_Al232266_at	rGCLC	3,4	B	rc_AA849739_at	hCREB5	4,4
C	rc_Al103828_at	hTncRNA	3,4	C	rc_Al235337_s_at	mPDLIM4	4,4
A	AF077354_at	rHSPA4	3,4	A	U78977_at	mATP9A	4,4
A	rc_Al059692_s_at	rEEF2K	3,4	B	rc_Al059417_at	rIGSF4A	4,4
B	rc_Al009614_at	rSLC6A6	3,4	A	rc_AA925556_at	hCKIP1	4,3
C	rc_Al176003_at	rPRELP	3,3	A	rc_Al232379_at	hPDGFRA	4,3
C	rc_Al178245_at	hFMNL1	3,3	B	rc_Al011623_at	hBTBD3	4,3
C	rc_Al176919_at	hPTAR1	3,3	B	rc_AA848809_at	rALDH1A3	4,3
B	rc_AA944304_at	hTPD52	3,3	C	rc_Al176688_at	rSIAT4C	4,2
C	rc_Al178734_at	hUVRAG	3,3	A	U17254_at	rNR4A1	4,2
A	rc_AA891916_at	mMIR16	3,3	C	rc_Al136709_at	rROHN	4,2
B	rc_Al045581_at	mFEM1A	3,3	B	rc_Al010216_at	hC5orf5/hPKD2L2	4,2
B	rc_Al070315_at	mLRRC8	3,3	A	rc_AA891737_at	rGCLM	4,2
C	rc_Al105080_at	mOXCT1	3,3	C	rc_Al231808_at	mPALMD	4,1
B	rc_AA901006_at	mMIR16	3,3	B	rc_AA900875_at	rCITED4	4,1
B	rc_AA901017_at	hDARS2	3,2	C	rc_Al170696_at	rNDRG2	4,1
B	rc_AA925744_at	mUSP3	3,2	B	rc_Al044587_at	mME2	4,1
C	rc_Al145095_at	m2810026P18Rik	3,2	B	rc_Al010103_at	rCAV2	4,1
C	rc_Al103101_at	hF25965	3,2	B	rc_AA926194_at	mJAK1/hRAVER2	4,1
C	rc_Al178836_at	hRNF153	3,2	B	rc_Al009996_at	rIGSF4A	4,1
A	X62528_at	rRNH1	3,2	A	M64755_at	rCSAD	4,1
A	U39875_at	rCHP	3,2	A	U78977_g_at	mATP9A	4,1
A	rc_AA875227_at	MBNL1	3,2	A	U17035_s_at	rCXCL10	4,1
B	rc_AA955911_at	hKIAA1432	3,2	C	rc_Al101373_at	hC10orf56	4,1
B	rc_AA963646_at	hZNF358	3,2	B	rc_AA850405_at	hMGC5576	4,0
A	U02553cde_s_at	hDUSP1	3,2	A	rc_AA892820_at	hFLNB	4,0
B	rc_AA924813_at	mBACH1	3,2	B	rc_AA946355_at	mA330042H22/hFLJ20481	4,0
A	L26268_g_at	rBTG1	3,2	C	rc_Al172616_at	intron hKLHL1	4,0
A	D12769_at	rBTEB1	3,2	A	M81639_at	hSNN	4,0
A	J04943_at	rNPM1	3,2	B	rc_AA900645_at	rIGSF4A	4,0
A	rc_AA891580_at	mCYLD	3,1	B	rc_Al030163_at	rGALNT10	4,0
B	rc_Al012429_at	rRAMP1	3,1	C	rc_Al104848_at	mAl173486	4,0
A	AB000776_at	rSEMA6B	3,1	A	AA933181_at	hIGSF4	4,0
C	rc_Al237525_at	hNF2	3,1	C	AA944099_s_at	rPDGFRA	3,9
B	rc_AA848508_at	mMAT2B	3,1	C	rc_Al071138_at	hC1orf21	3,9
A	rc_Al045030_s_at	hCEBPD	3,1	C	rc_Al101596_at	rPDK1	3,9
C	rc_Al230647_at	mZCCHC10	3,1	B	rc_Al045409_s_at	rLOC497083	3,9
B	rc_AA997304_at	mMRPS22	3,1	A	rc_AA924925_at	rSTAR/rPPAP2B	3,9
B	rc_Al009774_at	mTMOD3	3,1	C	rc_AA817836_at	rLOC362065	3,9
B	rc_Al044261_at	mITGB5	3,1	A	rc_AA997865_at	m4930488E11Rik	3,9

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
A	rc_AA892012_g_at	rGOT2	3,1	C	rc_AI178517_at	hFLJ14624	3,8
C	rc_AI175349_at	hTOB2	3,1	B	rc_AA801238_at	mSPON2	3,8
B	rc_AA925868_at	rAA925868	3,1	C	rc_AI169367_at	hC10orf58	3,8
A	rc_AA891785_g_at	hIDH2	3,1	C	rc_AA819412_at	rIL1RAP	3,8
B	rc_AI045807_at	hTMED5	3,1	A	rc_AA799560_at	rNDRG2	3,8
C	rc_AI177543_at	hPTPLA	3,1	C	rc_AI072389_at	rMGC93972	3,8
B	rc_AI012222_at	mOCIL	3,1	A	X76454_at	hPDLIM4	3,8
B	rc_AI044689_at	mCENTG2	3,1	A	rc_AA875172_at	rSH3KBP1	3,8
C	rc_AI178912_at	hOSR1	3,1	B	rc_AA945587_at	rSLC31A1/rCDC26	3,8
B	rc_AA942718_at	rBCL2L1	3,1	B	rc_AI069936_at	hTCF20	3,8
B	rc_AA925441_at	hCAPN5	3,1	A	rc_AI102868_g_at	rPSAT1	3,8
A	rc_AI177366_at	rITGB1	3,1	A	rc_AA859931_g_at	hMGC2749	3,8
C	rc_AI175466_at	hRRAS	3,0	B	rc_AI045710_at	rERP70/mPEG3	3,7
B	rc_AI044338_at	hPP1201	3,0	C	rc_AI236332_at	rSAT	3,7
C	rc_AI177481_s_at	rPSMB9	3,0	B	rc_AI012671_at	mATP9A	3,7
C	rc_AI177363_s_at	hCSK (c-src)	3,0	A	M92340_at	rIL6ST	3,7
B	rc_AI009363_at	mROCK2	3,0	C	rc_AA817802_at	mCACNA2D1	3,6
A	AB006710_s_at	rPFKFB3	3,0	C	rc_AI237091_at	rSIAT4C	3,6
A	rc_AI639255_at	hDOCK8	3,0	A	rc_AA945867_at	rJUN	3,6
C	rc_AA859360_at	rSLC29A2	3,0	B	rc_AI059914_at	hETV1	3,6
B	rc_AA851660_at	mSTK38L	3,0	A	rc_AI101320_at	rJAG2	3,6
B	rc_AA849718_g_at	rIFITM2	3,0	A	rc_AA892294_at	rAA892294	3,6
B	rc_AI009794_f_at	mTMSB4X	3,0	C	rc_AI112802_at	rRELN	3,6
B	rc_AI045040_at	mDGAT2	3,0	B	rc_AI029723_at	mSNAG1	3,6
B	rc_AI070313_at	hSP110	3,0	B	rc_AI029931_at	rIGSF4A	3,6
A	U75929UTR#1_f_at	rSPARC	3,0	A	rc_AI175959_at	rJUN	3,6
A	rc_AI030286_s_at	rBDNF	3,0	A	M16406cnds_s_at	rCHRM1	3,6
A	M31322_g_at	mAPLP2	3,0	A	S49491_s_at	rPENK-RS	3,6
A	U92802_at	rGPR30	3,0	A	rc_AA799410_at	hSCFD2	3,6
A	M18467_at	rGOT2	3,0	A	M64033_at	rSCT	3,5
B	rc_AI044348_at	hC10orf59	3,0	C	rc_AI177383_at	hC6orf145	3,5
B	rc_AI059323_at	mKLF3	3,0	A	AF048687_s_at	rB4GALT6	3,5
A	AB008522_s_at	rDNCL12	3,0	A	L00191cnds#1_s_at	rFN1	3,5
A	Z49761_at	rHLA-DMA	3,0	A	rc_AA891694_at	rTXNL1	3,5
B	rc_AA943758_at	mDRAP1	3,0	C	rc_AI112807_at	hFRMD4A	3,5
B	rc_AA944197_s_at	rMYR2	2,9	B	rc_AI044449_at	mPCBD2	3,5
A	X16555_at	rPRPS2	2,9	B	rc_AI044544_at	hNEB	3,5
B	rc_AA925167_at	hTSK	2,9	C	rc_AI235414_at	hRORA	3,5
B	rc_AA998252_at	hIRF2BP2	2,9	C	rc_AI179025_at	rSH3KBP1	3,4
A	M13750_at	rPRLPA	2,9	C	rc_AI145035_at	hCHST2	3,4
C	rc_AA818705_at	hTUSC2	2,9	C	rc_AA859150_at	hTRIM2	3,4
C	rc_AI178526_at	hHECA	2,9	A	L07281_at	hCPE	3,4
C	rc_AI234620_at	hPPL	2,9	A	U67884_at	rMIA	3,4
A	S78284_s_at	rBCL2L1	2,9	C	rc_AI114113_at	hSSB4	3,4
A	J05181_at	rGCLC	2,9	C	rc_AI177761_at	mCD68	3,4
B	rc_AI011285_at	hTMED5	2,9	C	rc_AI233349_at	rTACSTD1	3,4
A	rc_AI169756_s_at	hERRF1	2,9	C	T26358_at	rRHOQ	3,4
B	rc_AI010951_at	mSLC25A30	2,9	B	rc_AI013605_at	mKIAA1727	3,4
A	rc_AA891774_at	hMGC15429	2,9	A	U03491_g_at	rTGFB3	3,4

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
B	rc_AI011178_at	hCOL6A1/rGLG1	2,9	A	rc_AA799883_at	rAA799883	3,4
C	rc_AI072631_at	rCBLB	2,8	A	rc_AA800036_at	hSCHIP1	3,4
C	rc_AI103159_at	rIFITM2	2,8	C	rc_AI231368_s_at	hETV1	3,4
B	rc_AI012611_at	hRASGRP2	2,8	A	M28647_g_at	rATP1A1	3,3
A	rc_AA819643_at	rPRKAA2	2,8	A	AJ012603UTR#1_g_at	rADAM17	3,3
B	rc_AA850666_g_at	mMRPS22	2,8	C	rc_AI103510_at	hSERPINE2	3,3
C	rc_AI171165_at	hKIAA0367	2,8	A	AB018049_s_at	rSIAT9	3,3
B	rc_AA926209_at	hROCK2	2,8	A	X02412_at	rTPM1	3,3
B	rc_AI044576_at	hMYO10	2,8	A	Z24721_at	rSOD3	3,3
C	rc_AI137988_at	hMYO10	2,8	C	rc_AI145916_at	rRABL4	3,3
B	rc_AI013159_at	hMAML1	2,8	B	rc_AI010591_s_at	rSIAT9	3,3
B	rc_AI059449_at	hPIK3C2A	2,8	A	AF076856_s_at	rESPN	3,3
C	rc_AI177448_at	hMICAL2	2,8	A	rc_AI071299_at	rTIEG	3,2
A	J02679_s_at	rNQO1	2,8	A	rc_AA894054_f_at	mSLC35E3	3,2
A	D29960_at	hHSPB6	2,8	C	rc_AI111678_at	hZNF462	3,2
A	D38061exon_s_at	rUGT1A6	2,8	C	rc_AA858852_at	hTREX2	3,2
A	L26292_at	rKLF4	2,8	B	rc_AI029942_at	rCAV	3,2
B	rc_AA944179_at	hPTAR1	2,8	B	rc_AI045154_at	hC1orf19/hORC5	3,2
B	rc_AA956382_s_at	rACAA1	2,8	A	AB013732_at	rUGDH	3,2
B	rc_AI009756_at	hPDCD6IP	2,8	A	rc_AI639139_g_at	mHRTMLL1	3,2
A	U95178_s_at	rDAB2	2,8	A	M17412_at	hE2IG5	3,2
C	rc_AI179261_at	mCTSQ	2,8	C	rc_AI072764_at	hTLN2	3,2
B	rc_AI028831_at	rMAP3K6	2,8	A	rc_AI639387_at	hMRPS6	3,2
A	U89282_at	rTEP1	2,8	A	rc_AA899253_at	rMARCKS	3,2
B	rc_AA924560_at	hFER1L3	2,8	C	rc_AI170426_at	hRAPH1/hABI2	3,2
B	rc_AI012566_at	rMYR2	2,8	B	rc_AI013388_at	mAI429214	3,2
C	rc_AI172045_at	hHDAC5	2,8	C	rc_AI233416_s_at	hLOC388135	3,2
C	rc_AI172447_at	rNFKBIA	2,8	A	rc_AA893471_s_at	rRELN	3,2
C	rc_AI234361_at	hCHUK	2,7	B	rc_AI012271_at	hANKS1	3,1
B	rc_AA963102_at	rSLC38A2	2,7	A	X17053mRNA_s_at	rCCL2	3,1
A	AJ002967_at	rUTRN	2,7	A	rc_AA891734_at	hTENS1	3,1
C	rc_AI072950_at	hCABLES2	2,7	C	rc_AI180373_at	rMAP3K1	3,1
C	rc_AI169231_s_at	hHERRF1	2,7	C	rc_AI232970_at	rGPD1	3,1
B	rc_AA943202_at	hGAB2	2,7	A	U35775_g_at	rADD3	3,1
A	M34043_at	hTMSB4X	2,7	A	D42148_at	rGAS6	3,1
A	M31322_at	hAPLP2	2,7	B	rc_AA946377_at	rMYH10	3,1
B	rc_AA925744_g_at	hUSP3	2,7	B	rc_AI044396_at	rIL6ST	3,1
B	rc_AI012476_at	hNANS	2,7	B	rc_AA943983_r_at	mIGSF4C	3,1
B	rc_AA925116_g_at	rIGFIFBP/rIGF18BP	2,7	A	D63772_at	rSLC1A1	3,1
B	rc_AA997608_at	rSERPINB6	2,7	B	rc_AA925493_at	hSCFD2	3,0
C	rc_AI231295_at	hSEMA4B	2,7	A	rc_AI230228_at	rPSAT1	3,0
A	M81855_at	rABCB1	2,7	A	U90261UTR#1_g_at	rSH3KBP1	3,0
A	rc_AI639255_g_at	hDOCK8	2,7	A	X56228_g_at	rTST	3,0
C	R46953_f_at	rSPARC	2,7	C	rc_AI111872_at	mNAV1	3,0
B	rc_AA924100_at	rWTIP	2,7	C	rc_AI176246_at	mPSCD3	3,0
B	rc_AI011991_at	rRHOG	2,7	B	rc_AA963276_at	mETV1	3,0
C	rc_AI071525_at	mEHD2	2,7	C	rc_AI171807_at	rIL6ST	3,0
C	rc_AI237606_at	hBCL6	2,7	C	rc_AI237714_s_at	rSIAT9	3,0
C	AA851120_at	hADAM9	2,7	C	rc_AI230460_at	rMLP1	3,0

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
A	X77237_at	rPPP5C	2,7	A	AJ012603cds_at	rADAM17	3,0
B	rc_AA998352_s_at	rRHOB	2,7	A	rc_AA944422_at	rCNN3	3,0
A	rc_AA892246_at	hSTK24	2,7	B	rc_AA964346_at	mCLDN14	3,0
B	rc_AI044120_at	hSAMD4	2,7	C	rc_AI237223_at	hC14orf80	3,0
A	U23769_at	rPDLIM1	2,7	A	rc_AI236721_r_at	rYWHAG	3,0
C	rc_AI101388_at	hGALNAC4S-6ST	2,6	A	rc_AA892829_at	hPAPSS1	3,0
C	rc_AI178796_at	hUNC84A	2,6	B	rc_AA925418_at	miTGAV	2,9
C	rc_AI236211_at	hSLITL2	2,6	B	rc_AI009344_i_at	rFXD1	2,9
B	rc_AA925746_at	hGALNT7	2,6	C	rc_AI234702_at	rBAMBI	2,9
A	D13126_at	rHPCAL1	2,6	C	rc_AI236301_at	rFKBP9	2,9
C	rc_AI177965_at	hLOC153222	2,6	B	rc_AA852027_at	hVPS37B	2,9
C	rc_AI230004_at	hSCC-112	2,6	A	rc_AA859981_at	rIMPA2	2,9
B	rc_AI030035_at	hSUMF1	2,6	C	rc_AI112571_at	rARHGAP24	2,9
A	rc_AI059508_s_at	rTKT	2,6	A	L41686mRNA_at	hMEGF10	2,9
C	R47128_f_at	rSPARC	2,6	C	rc_AI171916_at	hKLHL23	2,9
A	X63594cds_at	rNFKBIA (IKBA)	2,6	B	rc_AA851372_at	hMGC2749	2,9
C	rc_AI233750_at	hKLF3	2,6	A	E05646cds_s_at	rPBP	2,9
A	rc_AA891204_s_at	rSPARC	2,6	C	rc_AA818179_at	rITGB3BP	2,9
C	rc_AI235899_at	hFLJ10652	2,6	B	rc_AI045621_r_at	rMARCKS	2,9
B	rc_AA965241_at	hCOL6A2	2,6	A	rc_AA799879_at	rSYNGR1	2,9
B	rc_AI012574_at	hCBLB	2,6	C	rc_AI176346_at	hC5orf18	2,8
B	rc_AI070270_at	rTOB2	2,6	A	rc_AI230256_at	rID2	2,8
A	X60468mRNA_s_at	rAPBB1	2,6	A	M34384_at	rNES	2,8
B	rc_AA956233_at	hTLK2 (alt. sp.)	2,6	B	rc_AA945835_at	hFNBP1L	2,8
A	rc_AA900476_at	rCITED2	2,6	A	M86621_at	rCACNA2D1	2,8
A	J03752_at	rMGST1	2,6	A	rc_AA800882_g_at	hPRICKLE2	2,8
C	rc_AA818197_at	hPTPN13	2,6	C	rc_AI105296_at	rHIF1A	2,8
C	rc_AI171231_at	rSLC38A2	2,6	C	rc_AI228064_at	rLMO4	2,8
A	AF065149_s_at	rANK3	2,6	C	rc_AI229137_at	m6030419C18Rik	2,8
C	rc_AI179093_at	rNUDT4	2,6	B	rc_AA944275_i_at	rTUBA1	2,8
A	rc_AA946313_s_at	rSPARC	2,6	A	V01227_s_at	rTUBA1	2,8
C	rc_AA818796_at	mSERPINB9	2,6	C	rc_AI071578_at	hC5orf13	2,8
C	AA851065_at	hENPP4	2,6	A	rc_AI169265_at	mNDUFA4	2,8
B	rc_AA998422_i_at	m2610002F03Rik/hAK054908	2,6	C	rc_AI229843_at	rTNFAIP8	2,8
B	rc_AA925318_g_at	rNFKBIB	2,6	B	rc_AA900474_at	mFEM1A/mCOTL1	2,8
B	rc_AI045568_at	hMALAT1	2,6	C	rc_AI137123_at	rTRIM2	2,8
B	rc_AI070152_at	rDDIT4L	2,6	B	rc_AA997253_at	hEGFL5	2,8
A	D26154cds_at	rMRIP	2,6	B	rc_AI008919_at	rSEC14L2	2,8
A	rc_AI175776_s_at	Rat EST AF159098 (rep.)	2,6	A	rc_AA800745_at	rALAD	2,8
A	U61729_at	rPROL2	2,6	A	X53232_at	hKIAA1688	2,8
B	rc_AA965166_at	hPP	2,5	A	rc_AA893357_at	mMAGI1	2,8
B	rc_AA996565_at	hHMGA2	2,5	B	rc_AA944679_at	hITGAV	2,8
A	rc_AI639494_at	hMKRN2	2,5	C	rc_AI171984_at	rTXNL1	2,8
A	rc_AA799507_at	hKIAA1055	2,5	A	rc_AA892919_at	hC22orf9	2,8
C	rc_AI171262_at	hCCNG2	2,5	A	rc_AI227608_s_at	rMAPT	2,8
C	AA851050_at	rGSR	2,5	A	L22294_at	rPDK1	2,8
B	rc_AI045587_r_at	rGNAI2	2,5	A	M64780_at	rAGRN	2,8
A	X53581cds#5_f_at	rLOC297970/rLOC360941 (rep.)	2,5	C	rc_AI073086_at	mPRKCA	2,8
C	rc_AI172103_at	mE2F6	2,5	C	rc_AI233194_at	rSLC30A1	2,8

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
C	rc_AI180260_at	hMALAT1	2,5	C	rc_AI176174_at	mTM4SF1	2,7
C	rc_AI229746_at	mTSPAN4	2,5	A	AJ223355_at	rSLC25A10	2,7
C	rc_AI231423_at	rPRKX	2,5	A	X78949_at	rP4HA1	2,7
B	rc_AA848315_at	rIMPDH2	2,5	A	rc_AA892773_at	m1810058124Rik	2,7
B	rc_AA943125_at	hFOXP1	2,5	A	rc_AA893082_at	rMAF1	2,7
B	rc_AI012174_at	hGLTSCR2	2,5	C	rc_AI102497_at	hSERPINE2	2,7
A	D17445_at	rYWHAH (14-3-3 eta)	2,5	C	rc_AI236337_at	rNID67	2,7
B	rc_AA900474_g_at	rFEM1A	2,5	C	rc_AI237273_at	hCTL2	2,7
B	rc_AI012085_at	rABI3	2,5	B	rc_AI045035_at	hFAM91A1	2,7
A	D17445_g_at	rYWHAH (14-3-3 eta)	2,5	C	rc_AI145650_at	hCTL2	2,7
A	U25264_at	rSEPW1	2,5	C	rc_AI175048_at	hSIX1	2,7
B	rc_AA946411_at	hHIPK2	2,5	A	U09228_at	rTCF4	2,7
B	rc_AI013361_at	hSQRDL	2,5	C	rc_AI171999_at	rRHOQ/hPIGF	2,7
B	rc_AI030231_at	hST8SIA3	2,5	B	rc_AI045281_at	rAI045281	2,7
C	rc_AI111725_at	hMRPL45	2,5	B	rc_AI045621_s_at	hMARCKS	2,7
C	rc_AI171726_at	rESRRA	2,5	B	rc_AI045621_i_at	hMARCKS	2,7
C	rc_AI236640_at	rSMS	2,5	A	rc_AA945054_s_at	rCYB5	2,7
A	AF087943_s_at	rCD14	2,5	A	A03913cds_s_at	hSERPINE2	2,7
A	rc_AI177161_at	rNFE2L2	2,5	A	D10706_s_at	rOAZ1	2,7
B	rc_AI012612_at	rCHP	2,5	A	L27651_g_at	rSLC22A7	2,7
A	L38644_at	rKPNB1	2,5	C	rc_AI102948_at	hETV1	2,7
A	M65149_at	rCEBPD	2,5	C	rc_AA819103_at	mMEST/mCOPG2	2,7
C	rc_AI103641_at	rSARDH	2,5	C	rc_AA858982_at	rLMO4	2,7
C	rc_AI176677_at	rRAB23	2,5	B	rc_AA945714_at	rARGHAP8	2,6
C	rc_AI178368_s_at	rCRRY	2,5	B	rc_AI012832_s_at	mSNN/mTXNDC11	2,6
C	rc_AI236912_at	hNAB1	2,5	A	rc_AA892298_at	rPPIL3	2,6
B	rc_AA997779_at	mFUBP1	2,5	B	rc_AA957410_at	hNCK2	2,6
A	U14647_g_at	rCASP1	2,5	B	rc_AA924338_at	rWASPIP	2,6
A	L26268_at	rBTG1	2,5	B	rc_AA964814_at	rGCLM	2,6
C	rc_AI229154_at	hSTAP2	2,5	A	D14421_at	rPPP2R2B	2,6
C	rc_AI236784_at	rEIF4EBP2	2,5	B	rc_AI012208_at	rCAV	2,6
B	rc_AI030447_at	rGEMIN5	2,5	B	rc_AI059444_at	hSLC35E3	2,6
A	L18889_at	rCANX	2,5	B	rc_AA925643_i_at	hZNF161	2,6
C	rc_AI227884_at	hHINT1	2,5	C	rc_AI102152_at	hTA-LRRP	2,6
B	rc_AA955075_at	hSPG21	2,5	A	U86635_g_at	rGSTM5	2,6
B	rc_AI059014_f_at	hPPP2CA	2,5	B	rc_AA964789_at	hTSGA14	2,5
B	rc_AI059117_at	hDDEF1	2,5	A	X95286cds_at	rSEMA3A	2,5
A	AF086624_s_at	rPIM3	2,5	B	rc_AA925844_at	hSFT2D2	2,5
C	rc_AI072896_at	hPKP2	2,4	B	rc_AA926279_at	rBIN3	2,5
C	rc_AI178966_at	rGILZ	2,4	B	rc_AI013475_at	hSORT1	2,5
A	D10729_s_at	rPSMB8	2,4	A	Z14118cds_g_at	rPDGFRA	2,5
B	rc_AA956794_at	hUSP3	2,4	A	rc_AA799402_at	hPRTFDC1	2,5
B	rc_AA96636_f_at	rLOC287278	2,4	C	rc_AA859319_at	rZNF148	2,5
A	U21719mRNA_s_at	hDDX21	2,4	A	rc_AI008638_at	rMFGE8	2,5
C	rc_AI176828_at	rELIH	2,4	B	rc_AA997656_at	mSH3MD2	2,5
C	rc_AA819105_at	rSIRT2	2,4	A	rc_AA874919_g_at	rMSH2	2,5
A	AF051895_at	rANXA5	2,4	A	X75253_at	rPBP	2,5
A	rc_AI071531_s_at	rOLR1	2,4	C	rc_AI228113_s_at	rNPTXR	2,5
A	D88250_at	rC1S	2,4	C	rc_AI228348_at	mACTR1B	2,5

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
B	rc_AI013247_at	rTAGLN2	2,4	C	rc_AI236786_at	rFKBP9	2,5
A	rc_AA859593_at	mTRIM25	2,4	C	rc_AI104297_at	rPHLDA3	2,5
C	rc_AI175578_at	hLYSMD2	2,4	C	rc_AI236772_at	mTES	2,5
C	rc_AI234038_at	hZNF598	2,4	B	rc_AI012347_at	mSERTAD4	2,5
C	R47150_f_at	rSPARC	2,4	A	L16532_at	rCNP1	2,5
B	rc_AA850662_at	hFLII	2,4	C	rc_AI072555_at	rSLC38A6	2,5
B	rc_AA946351_at	hMXRA8	2,4	B	rc_AI029424_at	rADD3	2,5
B	rc_AI011684_s_at	rTKT	2,4	A	AJ223355_g_at	rSLC25A10	2,5
B	rc_AI012353_at	rC20orf29	2,4	C	rc_AI070516_at	hKIAA0256	2,4
A	U83119_f_at	rLOC297970	2,4	C	rc_AI179987_at	rHMG2	2,4
C	rc_AI112043_at	hDCBLD2	2,4	B	rc_AA852027_g_at	hVPS37B	2,4
C	rc_AI170811_at	hTMOD3	2,4	B	rc_AI012481_at	rAI012481	2,4
C	rc_AA858911_at	hFLJ20487	2,4	A	U48592_at	rIL1RAP	2,4
C	rc_AA858921_at	hMEF2C	2,4	A	X96437mRNA_g_at	hIER3	2,4
B	rc_AA850872_at	rPTEN	2,4	A	rc_AI010581_at	rDBI	2,4
B	rc_AI009197_at	rVKORC1	2,4	C	rc_AI072550_at	C10orf22	2,4
C	rc_AI231921_f_at	rCOX3/rCOX2	2,4	C	rc_AA859241_at	rSYNJ2BP	2,4
C	rc_AI235352_at	hINPP5F	2,4	A	rc_H31907_at	hGPS1/hDUS1L	2,4
A	X77934cnds_at	hAPLP2	2,4	C	rc_AI177183_at	hMGC4677/hLOC541471	2,4
A	U88157_at	rHAPIP	2,4	C	rc_AI172473_at	mBAF60a (SMARCD1)	2,4
A	D85189_at	rFACL4	2,4	A	rc_AA892565_at	hTTC8	2,4
C	AA848354_at	hUBE1DC1	2,4	B	rc_AA956626_at	mRBMS3	2,4
B	rc_AA996804_at	hFBLN1	2,4	A	X17053cnds_s_at	rCCL2	2,4
B	rc_AI009362_at	hPOLR3D	2,4	A	X05834_at	rFN1	2,4
A	D78610_at	hPTPRE	2,4	C	rc_AI070935_at	mPOLE2	2,4
C	rc_AI236643_at	hNIPA1	2,4	B	rc_AA801395_s_at	mTNFAIP8	2,4
B	rc_AA997883_at	rFLCN	2,4	B	rc_AI009261_at	mPLEKHA7	2,4
C	rc_AI232694_at	hSEC24D	2,4	C	rc_AI137351_at	mZFP278	2,4
C	rc_AI233743_at	rDAB2	2,4	C	rc_AI137931_at	rITGA6	2,4
B	rc_AA997861_at	rSDF4	2,4	C	rc_AI236704_at	rANKRD28	2,4
B	rc_AI009944_at	hTXK	2,4	C	rc_AI175948_s_at	rFGFR4	2,4
B	rc_AI010593_at	hAFF4	2,4	C	rc_AI237137_at	rPPM1F	2,4
B	rc_AI059428_at	hEPS15	2,4	A	X08056cnds_s_at	rGAMT	2,4
A	rc_AA894345_at	hPEA15	2,4	A	rc_AA859483_at	hLOC388135	2,3
C	rc_AI178328_at	hTSPAN4	2,3	C	rc_AI236972_at	hDHRS8	2,3
C	rc_AI230360_at	hUBE3A	2,3	B	rc_AA943773_at	hITGAV	2,3
B	rc_AA899045_g_at	hESD	2,3	A	S65555_g_at	rGCLM	2,3
B	rc_AA900967_at	hNUMBL	2,3	C	rc_AI073074_at	hRBMS3	2,3
B	rc_AA943374_at	hFLJ20054	2,3	B	rc_AA849961_at	rTC10	2,3
B	rc_AA944401_g_at	hTOM1	2,3	A	AF097593_g_at	rCDH2	2,3
A	rc_AA799614_at	hSIRT2	2,3	C	rc_AI171799_at	rEPDR2	2,3
A	rc_AA800613_at	rZFP36	2,3	A	U89529_at	rSLC27A1	2,3
C	rc_AI104883_at	rLOC317191	2,3	B	rc_AI013098_at	hGPR126	2,3
C	rc_AI235282_at	hLRP1	2,3	C	rc_AI137506_at	rLOC362774	2,3
C	rc_AI235893_at	hCOL6A1	2,3	A	X76489cnds_g_at	hCD9	2,3
B	rc_AI008409_at	hMALAT1	2,3	C	rc_AA818224_at	rLOC498736	2,3
B	rc_AI029790_at	hGNA13	2,3	C	rc_AI170053_at	hMRPS6	2,3
A	S81478_s_at	rPTPN16	2,3	C	rc_AI177272_at	hFLJ10357	2,3
A	rc_AA944007_at	rNUCB	2,3	C	rc_AI177755_at	rPBEF1	2,3

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
A	rc_AI177004_s_at	rHMGCS1	2,3	B	rc_AA997425_at	hGALNT2	2,3
A	rc_AA799593_at	hUBE2H	2,3	C	rc_AI137060_at	hPTPRJ	2,3
C	rc_AA859401_at	hNANS	2,3	C	rc_AI231038_at	rTMP21	2,3
B	rc_AA943066_g_at	rDDEF1	2,3	C	rc_AI236592_at	hPOLR2K	2,3
B	rc_AA944401_at	hTOM1	2,3	B	rc_AI010224_at	hADD3	2,3
B	rc_AA945088_at	hCAB39	2,3	B	rc_AI059618_at	rUGP2	2,3
B	rc_AI059569_at	mSEPT8	2,3	A	rc_AA875495_at	mANP32A	2,3
C	rc_AI103552_at	hFLJ14525	2,3	B	rc_AA801178_at	hATAD2	2,2
C	rc_AA818877_at	hFHOD1	2,3	B	rc_AA996782_at	hLMNB2	2,2
C	rc_AI176864_at	hANXA6	2,3	A	rc_AA875253_at	hARL1	2,2
C	rc_AI178527_at	hDDX21	2,3	A	rc_AA891796_at	hC6orf49	2,2
A	D88461_at	mWASL	2,3	C	rc_AI070624_at	hASB8	2,2
A	rc_AI177161_g_at	rNFE2L2	2,3	C	rc_AI101393_at	hRECK	2,2
C	rc_AI171647_at	hSET8	2,3	C	rc_AI235644_at	hPPM1F	2,2
B	rc_AI012552_at	hTRIM5	2,3	B	rc_AA848813_g_at	mDP1	2,2
B	rc_AI013075_at	hTBGR1	2,3	B	rc_AI059876_at	rAI059876	2,2
A	X91810_at	rSTAT3	2,3	B	rc_AA850753_at	hSPRY2/hLTBP1	2,2
C	rc_AI177867_at	hEHD1	2,3	A	AJ004812_s_at	rTMP21	2,2
C	rc_AI236753_at	mEIF1A	2,3	C	rc_AI230046_at	rMGC94098	2,2
B	rc_AI045871_at	hMDFIC	2,3	A	U35775_at	rADD3	2,2
A	X63594cds_g_at	rNFKBIA (IKBA)	2,3	A	D88672_at	hPLD2	2,2
C	rc_AI101171_at	rSLCO3A1	2,3	A	rc_AA799474_at	hCYC1	2,2
C	rc_AI102788_at	rPOLR3E	2,3	A	U82612cds_g_at	rFN1	2,2
B	rc_AA943758_g_at	hDRAP1	2,3	B	rc_AA945753_at	hHRMT1L1	2,2
B	rc_AA925294_g_at	rHOMER3	2,3	B	rc_AA956703_g_at	hCUGBP2	2,2
B	rc_AI030877_s_at	hSNX10	2,3	B	rc_AA963698_at	rPAQR4	2,2
B	rc_AI030989_at	rNSSDR	2,3	A	U72660_at	rNINJ1	2,2
A	AB022014_at	rPSMD10	2,3	C	rc_AI145694_at	rDARS	2,2
A	rc_AA859830_s_at	rBGN	2,3	C	rc_AI145759_at	hCHST2	2,2
A	M38135_at	rCTSH	2,3	A	S58528_at	hITGAV	2,2
A	rc_AA800853_g_at	rRASL11B	2,3	A	rc_AA800701_at	hLBH	2,2
C	rc_AI178392_at	hTNFAIP2	2,3	B	rc_AA946443_at	rNPDC1	2,2
C	H34047_at	hACAT2	2,3	A	rc_AA891220_at	hPBEF	2,2
B	rc_AA957323_at	rHERPUD1	2,3	C	rc_AI235611_at	hANXA4	2,2
B	rc_AI010108_at	mMYO1H/mKCTD10	2,3	B	rc_AI029321_at	hRBM12B	2,2
B	rc_AI011448_at	rNOTCH2	2,3	A	D89983_at	rOAZIN1	2,2
A	AA686870_i_at	hLOC56901/hNUOMS	2,3	C	rc_AA859402_at	hGALNT2	2,2
C	rc_AI233446_at	hNOLA2/hFLJ22318	2,3	B	rc_AI008930_g_at	hMGC10986	2,2
B	rc_AA964459_at	hDYRK2	2,3	C	rc_AI237135_at	hZFXH1	2,1
B	rc_AI029437_at	hLYSMD4	2,3	B	rc_AA945325_at	hRNF13	2,1
B	rc_AI029530_at	hTOB2	2,3	C	rc_AI178272_at	rBOLA3	2,1
A	AF080568_at	rPCYT2	2,3	B	rc_AI044025_at	mCIDEB	2,1
A	AF083330_at	rKIF3C	2,3	A	S55427_s_at	rPMP22	2,1
A	D26154UTR#1_at	rMRIP	2,3	B	rc_AI008930_at	hMGC10986	2,1
A	D50436_at	rFDX1	2,3	A	rc_AI014169_at	hTXNIP	2,1
C	rc_AI172414_at	rBRP44L	2,3	C	rc_AI169177_s_at	hIER3	2,1
C	rc_AI228399_at	hKIAA1128	2,3	C	rc_AI231355_at	hSNRPC	2,1
C	rc_AA819554_at	hBAIAP2	2,3	C	rc_AI234767_at	hFARP1	2,1
C	rc_AI236120_at	hSMG1	2,3	B	rc_AA957335_at	hGAS6	2,1

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1				Genes candidatos com maior expressão na linhagem P7			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa	Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
A	U24652_at	rLNK	2,3	A	rc_AA892373_at	rSDCBP	2,1
C	rc_AI145859_at	hLOC284611	2,2	C	rc_AI176727_at	hITGA6	2,1
C	rc_AI229821_at	rUTRN	2,2	C	rc_AI232281_at	hKIAA0971	2,1
C	H34543_at	hINPP5F	2,2	A	rc_AA819500_at	mRFC4	2,0
B	rc_AA850893_at	hCLKFSF7	2,2				
B	rc_AA957696_at	hANKRD11	2,2				
B	rc_AI011164_at	hST3GAL1	2,2				
B	rc_AI045970_at	hAMPH	2,2				
B	rc_AI070138_at	hNAT9	2,2				
A	rc_AA894234_at	hC20orf35	2,2				
C	rc_AI104897_at	rMAP2K3	2,2				
C	rc_AI179206_at	hPRKCI	2,2				
C	rc_AA818568_at	rMGC72981	2,2				
A	U10357_g_at	rPDK2	2,2				
A	rc_AI012802_at	rHAGH	2,2				
C	rc_AI145768_at	hSFRS11	2,2				
C	rc_AI178605_at	hCSK (c-src)	2,2				
C	rc_AI235935_at	hMTHFD1L	2,2				
C	AA685258_at	hEZH1	2,2				
B	rc_AA899535_g_at	hLARP1	2,2				
B	rc_AI059084_at	hFLJ14525	2,2				
A	J05122_at	rBZRP	2,2				
C	rc_AI103983_at	mARID5B	2,2				
B	rc_AA944906_at	hC10orf26	2,2				
B	rc_AI011843_at	hSEPX1	2,2				
B	rc_AI012276_at	hKIF2	2,2				
B	rc_AI043849_at	hELL2	2,2				
B	rc_AI058641_at	hACY3	2,2				
B	rc_AI070054_at	rLOC64038	2,2				
A	rc_AA893328_at	CANX	2,2				
A	AF062740_g_at	rPDP1	2,2				
A	L07736_at	rCPT1A	2,2				
A	rc_AA892545_at	rSLC22A18	2,2				
C	rc_AI175454_at	hP4HA2	2,2				
B	rc_AA848318_at	RGD1310224	2,2				
B	rc_AI059480_at	hTCF7L2	2,2				
C	rc_AA818106_at	hC9orf55	2,2				
C	rc_AI231776_at	hNUDT21	2,2				
B	rc_AA849965_at	hCAB39	2,2				
B	rc_AA899045_at	hESD	2,2				
B	rc_AA945712_at	hLOC201695	2,2				
B	rc_AI010260_at	rAVPI1	2,2				
A	D10757_g_at	rPSMB9	2,2				
A	rc_AI009338_g_at	rLOC246295	2,2				
A	rc_AA893059_at	hCTPS2	2,2				
A	rc_AA893065_at	hNPEPPS	2,2				
C	rc_AI171374_at	rMGEA6/Rmap2k3	2,2				
C	rc_AI179426_at	rCIB1	2,2				
B	rc_AA848948_at	hC13orf1	2,2				

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
B	rc_AA943238_at	rPIP5K2A	2,2
A	rc_AA800853_at	hRASL11B	2,2
B	rc_AI045441_at	hKIAA0934	2,2
A	AF018261_at	rEPN1	2,2
A	X86086_g_at	rANXA6	2,2
A	rc_AA800962_at	hTLN1	2,2
C	rc_AI172193_at	hPOLD4	2,2
C	rc_AA818996_at	rLOC501055	2,2
B	rc_AA956476_at	mCKAP4	2,2
B	rc_AI013740_at	rPLP2	2,2
B	rc_AI030141_at	rCLIC4	2,2
A	M18330_at	rPRKCD	2,2
C	rc_AI103410_at	rCARHSP1	2,1
C	rc_AI170692_at	hGABARAPL1	2,1
C	rc_AI177050_at	rLOC317191	2,1
C	rc_AI177790_at	rBC098778	2,1
C	R47028_i_at	rCOX3/rCOX2	2,1
B	rc_AA849947_at	hNAP1L4	2,1
B	rc_AA850975_at	hG3BP	2,1
B	rc_AA900688_at	hSH2BP1	2,1
C	rc_AI230741_at	hZNF385	2,1
C	rc_AI231533_at	hUSP25	2,1
B	rc_AA925304_at	hHNRPUL1	2,1
B	rc_AA997184_at	hMRPL43	2,1
B	rc_AI009167_at	hBAG2	2,1
A	S61868_at	rSDC4	2,1
A	X58631cds_at	hCSK (c-src)	2,1
C	rc_AI104933_at	hMLX/hTBPIP	2,1
C	rc_AI180266_at	rHDGF	2,1
C	rc_AI236282_s_at	hFLJ10597	2,1
B	rc_AI009687_at	hTHEX1	2,1
A	X70871_at	rCCNG1	2,1
C	rc_AI176596_at	hENTH	2,1
C	rc_AA818574_s_at	hOSBP	2,1
B	rc_AA848496_g_at	rEIF4B	2,1
B	rc_AA900400_at	hWTAP	2,1
B	rc_AA964535_at	hPARVA	2,1
B	rc_AA998151_at	rSMFN	2,1
B	rc_AI008414_at	hRIC8	2,1
B	rc_AI029174_at	rAKAP1	2,1
A	AB016536_s_at	rHNRPAB	2,1
A	U46958_at	rCD44	2,1
C	rc_AI178189_s_at	rGTF3A	2,1
B	rc_AA945866_at	hCENTG2	2,1
A	U97146_at	rLYPL1A	2,1
C	rc_AI103848_at	mATG4A	2,1
B	rc_AA899109_at	hC17orf27	2,1
B	rc_AA956278_at	hVASP	2,1
B	rc_AI009752_at	rLOC367314	2,1

Genes candidatos com maior expressão na linhagem ST1			
Chip	No. Acesso Sonda	Gene Symbol	Exp. Relativa
B	rc_AI012356_at	rSTAT3	2,1
A	D42137exon_s_at	rANXA5	2,1
C	rc_AI112197_at	hZDHHC13	2,1
C	rc_AI177962_at	hAXL	2,1
C	rc_AA818407_at	hCPEB4	2,1
C	rc_AI234098_at	rSPNB2	2,1
B	rc_AA963315_at	rGKAP1	2,1
A	rc_AA800220_at	rLYPL1A	2,1
C	rc_AI171837_at	rTXNL2	2,1
C	rc_AI178872_at	hFNDC3A	2,1
A	D00569_g_at	rDEC1	2,1
A	D26154UTR#1_g_at	rMRIP	2,1
C	rc_AI237835_at	hMXI1	2,1
A	rc_AI178135_at	rC1QBP	2,1
C	rc_AI176963_at	rCITED2	2,0
C	rc_AA819658_at	hCHRD1	2,0

9. BIBLIOGRAFIA

- Adra, C.N., Donato, J.L., Badovinac, R., Syed, F., Kheraj, R., Cai, H., Moran, C., Kolker, M.T., Turner, H., Weremowicz, S., Shirakawa, T., Morton, C.C., Schnipper, L.E. & Drews, R. (2000). SMARCD1, a novel human helicase family-defining member associated with genetic instability: cloning, expression, and mapping to 4q22-q23, a band rich in breakpoints and deletion mutants involved in several human diseases. *Genomics*, **69**, 162-73.
- Akbasak, A. & Sunar-Akbasak, B. (1992). Oncogenes: cause or consequence in the development of glial tumors. *J Neurol Sci*, **111**, 119-33.
- Aoki, T., Kato, S., Fox, J.C., Okamoto, K., Sakata, K., Morimatsu, M. & Shigemori, M. (2002). Inhibition of autocrine fibroblast growth factor signaling by the adenovirus-mediated expression of an antisense transgene or a dominant negative receptor in human glioma cells in vitro. *Int J Oncol*, **21**, 629-36.
- Arai, M., Utsunomiya, J. & Miki, Y. (2004). Familial breast and ovarian cancers. *Int J Clin Oncol*, **9**, 270-82.
- Ariyama, T., Hasegawa, K., Inazawa, J., Mizuno, K., Ogimoto, M., Katagiri, T. & Yakura, H. (1995). Assignment of the human protein tyrosine phosphatase, receptor-type, zeta (PTPRZ) gene to chromosome band 7q31.3. *Cytogenet Cell Genet*, **70**, 52-4.
- 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., 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.
- Auer, R.N., Del Maestro, R.F. & Anderson, R. (1981). A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci*, **8**, 325-31.
- Auguste, P., Gursel, D.B., Lemiere, S., Reimers, D., Cuevas, P., Carceller, F., Di Santo, J.P. & Bikfalvi, A. (2001). Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res*, **61**, 1717-26.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1998). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.: Boston.
- Baatout, S. & Cheta, N. (1996). Matrigel: a useful tool to study endothelial differentiation. *Rom J Intern Med*, **34**, 263-9.
- Bai, A.H., Tong, J.H., To, K.F., Chan, M.W., Man, E.P., Lo, K.W., Lee, J.F., Sung, J.J. & Leung, W.K. (2004). Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia. *Int J Cancer*, **112**, 846-53.
- Baker, S.J. & Reddy, E.P. (2000). Cloning of murine G1RP, a novel gene related to *Drosophila melanogaster* g1. *Gene*, **248**, 33-40.
- Baraldi, M., Guidotti, A., Schwartz, J.P. & Costa, E. (1979). GABA receptors in clonal cell lines: a model for study of benzodiazepine action at molecular level. *Science*, **205**, 821-3.
- 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.
- Baudet, C., Chevalier, G., Chassevent, A., Canova, C., Filmon, R., Larra, F., Brachet, P. & Wion, D. (1996a). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces programmed cell death in a rat glioma cell line. *J Neurosci Res*, **46**, 540-50.
- Baudet, C., Chevalier, G., Naveilhan, P., Binderup, L., Brachet, P. & Wion, D. (1996b). Cytotoxic effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and synthetic vitamin D3 analogues on a glioma cell line. *Cancer Lett*, **100**, 3-10.
- 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.

- Benelli, R. & Albini, A. (1999). In vitro models of angiogenesis: the use of Matrigel. *Int J Biol Markers*, **14**, 243-6.
- Bengtson, M.H. (2002). Caracterização celular e molecular dos efeitos do ácido retinóico sobre as células ST1 de glioma de rato. In *Departamento de Bioquímica*. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- Bian, X.W., Du, L.L., Shi, J.Q., Cheng, Y.S. & Liu, F.X. (2000). Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas. *Anal Quant Cytol Histol*, **22**, 267-74.
- Bigner, S.H., Humphrey, P.A., Wong, A.J., Vogelstein, B., Mark, J., Friedman, H.S. & Bigner, D.D. (1990). Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res*, **50**, 8017-22.
- Bigner, S.H., Wong, A.J., Mark, J., Muhlbaier, L.H., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. & Bigner, D.D. (1987). Relationship between gene amplification and chromosomal deviations in malignant human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet*, **29**, 165-70.
- Borchers, A.G., Hufton, A.L., Eldridge, A.G., Jackson, P.K., Harland, R.M. & Baker, J.C. (2002). The E3 ubiquitin ligase GREUL1 anteriorizes ectoderm during *Xenopus* development. *Dev Biol*, **251**, 395-408.
- Bosman, E.A., Penn, A.C., Ambrose, J.C., Kettleborough, R., Stemple, D.L. & Steel, K.P. (2005). Multiple mutations in mouse *Chd7* provide models for CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet*, **14**, 3463-76.
- Bourachot, B., Yaniv, M. & Muchardt, C. (2003). Growth inhibition by the mammalian SWI-SNF subunit Brm is regulated by acetylation. *Embo J*, **22**, 6505-15.
- Bowden, E.T., Stoica, G.E. & Wellstein, A. (2002). Anti-apoptotic signaling of pleiotrophin through its receptor, anaplastic lymphoma kinase. *J Biol Chem*, **277**, 35862-8.
- Braunewell, K.H. & Gundelfinger, E.D. (1997). Low level expression of calcium-sensor protein VILIP induces cAMP-dependent differentiation in rat C6 glioma cells. *Neurosci Lett*, **234**, 139-42.
- Brehm, A., Nielsen, S.J., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J. & Kouzarides, T. (1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *Embo J*, **18**, 2449-58.
- 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.
- Brockmann, M.A., Papadimitriou, A., Brandt, M., Fillbrandt, R., Westphal, M. & Lamszus, K. (2003a). Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by local treatment with the scatter factor/hepatocyte growth factor-antagonist NK4. *Clin Cancer Res*, **9**, 4578-85.
- Brockmann, M.A., Ulbricht, U., Gruner, K., Fillbrandt, R., Westphal, M. & Lamszus, K. (2003b). Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors. *Neurosurgery*, **52**, 1391-9; discussion 1399.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M. & Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*, **96**, 795-806.
- Brunner, H.G. & van Bokhoven, H. (2005). Genetic players in esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 341-7.
- Burkhard, C., Di Patre, P.L., Schuler, D., Schuler, G., Yasargil, M.G., Yonekawa, Y., Lutolf, U.M., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (2003). A population-based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma. *J Neurosurg*, **98**, 1170-4.
- Cairns, B.R., Kim, Y.J., Sayre, M.H., Laurent, B.C. & Kornberg, R.D. (1994). A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1950-4.
- Cao, B., Su, Y., Oskarsson, M., Zhao, P., Kort, E.J., Fisher, R.J., Wang, L.M. & Vande Woude, G.F. (2001). Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7443-8.
- Carey, J.C. (2005). CHARGE syndrome: 2005. *Am J Med Genet A*, **133**, 227.

- Carrier, F., Georgel, P.T., Pourquier, P., Blake, M., Kontny, H.U., Antinore, M.J., Gariboldi, M., Myers, T.G., Weinstein, J.N., Pommier, Y. & Fornace, A.J., Jr. (1999). Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol*, **19**, 1673-85.
- Carvalho, L.H.S. (2002). Papel de NF- κ B no controle da proliferação e transformação celular. In *Departamento de Bioquímica*. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- CBTRUS. (2002). Central Brain Tumor Registry of the United States.
- Ceol, C.J. & Horvitz, H.R. (2004). A new class of *C. elegans* synMuv genes implicates a Tip60/NuA4-like HAT complex as a negative regulator of Ras signaling. *Dev Cell*, **6**, 563-76.
- Chai, J., Charboneau, A.L., Betz, B.L. & Weissman, B.E. (2005). Loss of the hSNF5 gene concomitantly inactivates p21CIP/WAF1 and p16INK4a activity associated with replicative senescence in A204 rhabdoid tumor cells. *Cancer Res*, **65**, 10192-8.
- Chan, H.M., Narita, M., Lowe, S.W. & Livingston, D.M. (2005). The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 --> p21 senescence pathway. *Genes Dev*, **19**, 196-201.
- Chauhan, A.K., Li, Y.S. & Deuel, T.F. (1993). Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 679-82.
- 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.
- Cho, R.J., Huang, M., Campbell, M.J., Dong, H., Steinmetz, L., Sapinoso, L., Hampton, G., Elledge, S.J., Davis, R.W. & Lockhart, D.J. (2001). Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. *Nat Genet*, **27**, 48-54.
- Chu, E.C. & Tarnawski, A.S. (2004). PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit*, **10**, RA235-41.
- Claesson-Welsh, L. (1994). Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem*, **269**, 32023-6.
- Collins, V.P. (2004). Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **75 Suppl 2**, ii2-11.
- Cretu, A., Fotos, J.S., Little, B.W. & Galileo, D.S. (2005). Human and rat glioma growth, invasion, and vascularization in a novel chick embryo brain tumor model. *Clin Exp Metastasis*, **22**, 225-36.
- Czubayko, F., Riegel, A.T. & Wellstein, A. (1994). Ribozyme-targeting elucidates a direct role of pleiotrophin in tumor growth. *J Biol Chem*, **269**, 21358-63.
- Dallol, A., Forgacs, E., Martinez, A., Sekido, Y., Walker, R., Kishida, T., Rabbitts, P., Maher, E.R., Minna, J.D. & Latif, F. (2002). Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers. *Oncogene*, **21**, 3020-8.
- Daubresse, G., Deuring, R., Moore, L., Papoulas, O., Zakrajsek, I., Waldrip, W.R., Scott, M.P., Kennison, J.A. & Tamkun, J.W. (1999). The Drosophila kismet gene is related to chromatin-remodeling factors and is required for both segmentation and segment identity. *Development*, **126**, 1175-87.
- de Bono, J.S., Tolcher, A.W. & Rowinsky, E.K. (2003). The future of cytotoxic therapy: selective cytotoxicity based on biology is the key. *Breast Cancer Res*, **5**, 154-9.
- de Kok, J.B., Roelofs, R.W., Giesendorf, B.A., Pennings, J.L., Waas, E.T., Feuth, T., Swinkels, D.W. & Span, P.N. (2005). Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest*, **85**, 154-9.
- 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.
- DeJong, J.L., Morgenstern, R., Jornvall, H., DePierre, J.W. & Tu, C.P. (1988). Gene expression of rat and human microsomal glutathione S-transferases. *J Biol Chem*, **263**, 8430-6.
- Delmas, V., Stokes, D.G. & Perry, R.P. (1993). A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2414-8.
- 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.
- Dirks, W.G., Fahnrich, S., Lis, Y., Becker, E., MacLeod, R.A. & Drexler, H.G. (2002). Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in tumor cell lines. *Int J Cancer*, **100**, 49-56.

- Druker, B.J. (2002). Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Eur J Cancer*, **38 Suppl 5**, S70-6.
- Ekstrand, A.J., Sugawa, N., James, C.D. & Collins, V.P. (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4309-13.
- Eswarakumar, V.P., Lax, I. & Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**, 139-49.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem*, **137**, 266-7.
- Fiedler, W., Serve, H., Dohner, H., Schwittay, M., Ottmann, O.G., O'Farrell, A.M., Bello, C.L., Allred, R., Manning, W.C., Cherrington, J.M., Louie, S.G., Hong, W., Brega, N.M., Massimini, G., Scigalla, P., Berdel, W.E. & Hossfeld, D.K. (2005). A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood*, **105**, 986-93.
- Fischer-Colbrie, R., Hagn, C. & Schober, M. (1987). Chromogranins A, B, and C: widespread constituents of secretory vesicles. *Ann N Y Acad Sci*, **493**, 120-34.
- Fischer, I., Nolan, C.E. & Shea, T.B. (1987). Effects of retinoic acid on expression of the transformed phenotype in C6 glioma cells. *Life Sci*, **41**, 463-70.
- Fleming, T.P., Matsui, T., Heidaran, M.A., Molloy, C.J., Artrip, J. & Aaronson, S.A. (1992a). Demonstration of an activated platelet-derived growth factor autocrine pathway and its role in human tumor cell proliferation in vitro. *Oncogene*, **7**, 1355-9.
- Fleming, T.P., Saxena, A., Clark, W.C., Robertson, J.T., Oldfield, E.H., Aaronson, S.A. & Ali, I.U. (1992b). Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res*, **52**, 4550-3.
- Fodor, S.P., Rava, R.P., Huang, X.C., Pease, A.C., Holmes, C.P. & Adams, C.L. (1993). Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, **364**, 555-6.
- Fodor, S.P., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T. & Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, **251**, 767-73.
- Frank, S.R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M. & Amati, B. (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep*, **4**, 575-80.
- Fredriksson, L., Li, H. & Eriksson, U. (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*, **15**, 197-204.
- Fribourg, A.F., Knudsen, K.E., Strobeck, M.W., Lindhorst, C.M. & Knudsen, E.S. (2000). Differential requirements for ras and the retinoblastoma tumor suppressor protein in the androgen dependence of prostatic adenocarcinoma cells. *Cell Growth Differ*, **11**, 361-72.
- Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W.S., Nakatani, Y. & Livingston, D.M. (2001). The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell*, **106**, 297-307.
- Fujita, N., Jaye, D.L., Kajita, M., Geigerman, C., Moreno, C.S. & Wade, P.A. (2003). MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell*, **113**, 207-19.
- Fujita, N., Kajita, M., Taysavang, P. & Wade, P.A. (2004). Hormonal regulation of metastasis-associated protein 3 transcription in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, **18**, 2937-49.
- Fukasawa, K. (2005). Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett*, **230**, 6-19.
- Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R.D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J.E., Raub, T.J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Oberg, J.O. & Osterberg, T. (2005). In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro*, **19**, 299-334.
- Geiman, T.M. & Muegge, K. (2000). Lsh, an SNF2/helicase family member, is required for proliferation of mature T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4772-7.
- 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.

- Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Metzker, M.L., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K.C., Burch, P.E., Okwuonu, G., Hines, S., Lewis, L., DeRamo, C., Delgado, O., Dugan-Rocha, S., Miner, G., Morgan, M., Hawes, A., Gill, R., Celera, Holt, R.A., Adams, M.D., Amanatides, P.G., Baden-Tillson, H., Barnstead, M., Chin, S., Evans, C.A., Ferriera, S., Fosler, C., Glodek, A., Gu, Z., Jennings, D., Kraft, C.L., Nguyen, T., Pfannkoch, C.M., Sitter, C., Sutton, G.G., Venter, J.C., Woodage, T., Smith, D., Lee, H.M., Gustafson, E., Cahill, P., Kana, A., Doucette-Stamm, L., Weinstock, K., Fechtel, K., Weiss, R.B., Dunn, D.M., Green, E.D., Blakesley, R.W., Bouffard, G.G., De Jong, P.J., Osoegawa, K., Zhu, B., Marra, M., Schein, J., Bosdet, I., Fjell, C., Jones, S., Krzywinski, M., Mathewson, C., Siddiqui, A., Wye, N., McPherson, J., Zhao, S., Fraser, C.M., Shetty, J., Shatsman, S., Geer, K., Chen, Y., Abramzon, S., Niernan, W.C., Havlak, P.H., Chen, R., Durbin, K.J., Egan, A., Ren, Y., Song, X.Z., Li, B., Liu, Y., Qin, X., Cawley, S., Worley, K.C., Cooney, A.J., D'Souza, L.M., Martin, K., Wu, J.Q., Gonzalez-Garay, M.L., Jackson, A.R., Kalafus, K.J., McLeod, M.P., Milosavljevic, A., Virk, D., Volkov, A., Wheeler, D.A., Zhang, Z., Bailey, J.A., Eichler, E.E., et al. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, **428**, 493-521.
- 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.
- Goda, S.K. & Minton, N.P. (1995). A simple procedure for gel electrophoresis and northern blotting of RNA. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3357-8.
- Goncharov, I., Weiner, L. & Vogel, Z. (2005). Delta9-tetrahydrocannabinol increases C6 glioma cell death produced by oxidative stress. *Neuroscience*, **134**, 567-74.
- Gottert, E., Henn, W., Theisinger, B., Zang, K.D. & Blin, N. (1989). Differential activity of two oncogenes from chromosome #7 in human glioblastoma cell lines. *Anticancer Res*, **9**, 653-7.
- Goya, L. (1997). Steroid and protein regulators of glial cell proliferation. *Adv Exp Med Biol*, **429**, 249-60.
- Goya, L., Feng, P.T., Aliabadi, S. & Timiras, P.S. (1996). Effect of growth factors on the in vitro growth and differentiation of early and late passage C6 glioma cells. *Int J Dev Neurosci*, **14**, 409-17.
- Grand, F., Kulkarni, S., Chase, A., Goldman, J.M., Gordon, M. & Cross, N.C. (1999). Frequent deletion of hSNF5/INI1, a component of the SWI/SNF complex, in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*, **59**, 3870-4.
- Grasso, R.J., Holbrook, N.J. & Wodzinski, S.F. (1981). Elevated amounts of protein in C6 glial cells during the growth-inhibitory response elicited by dexamethasone. *J Neurochem*, **37**, 515-7.
- Grobbs, B., De Deyn, P.P. & Slegers, H. (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res*, **310**, 257-70.
- Grzelinski, M., Bader, N., Czubayko, F. & Aigner, A. (2005). Ribozyme-targeting reveals the rate-limiting role of pleiotrophin in glioblastoma. *Int J Cancer*, **117**, 942-51.
- Guais, A., Solhonne, B., Melaine, N., Guellaen, G. & Bulle, F. (2004). Goliath, a ring-H2 mitochondrial protein, regulated by luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin in rat leydig cells. *Biol Reprod*, **70**, 204-13.
- Gubits, R.M., Yu, H., Casey, G., Munell, F. & Vitek, M.P. (1992). Altered genetic response to beta-adrenergic receptor activation in late passage C6 glioma cells. *J Neurosci Res*, **33**, 297-305.
- Guidotti, A., Baraldi, M., Schwartz, J.P. & Costa, E. (1979). Molecular mechanisms regulating the interactions between the benzodiazepines and GABA receptors in the central nervous system. *Pharmacol Biochem Behav*, **10**, 803-7.
- Gunawardena, R.W., Siddiqui, H., Solomon, D.A., Mayhew, C.N., Held, J., Angus, S.P. & Knudsen, E.S. (2004). Hierarchical requirement of SWI/SNF in retinoblastoma tumor suppressor-mediated repression of Plk1. *J Biol Chem*, **279**, 29278-85.
- Gunduz, E., Gunduz, M., Ouchida, M., Nagatsuka, H., Beder, L., Tsujigiwa, H., Fukushima, K., Nishizaki, K., Shimizu, K. & Nagai, N. (2005). Genetic and epigenetic alterations of BRG1 promote oral cancer development. *Int J Oncol*, **26**, 201-10.
- Hamai, Y., Oue, N., Mitani, Y., Nakayama, H., Ito, R., Matsusaki, K., Yoshida, K., Toge, T. & Yasui, W. (2003). DNA hypermethylation and histone hypoacetylation of the HLTF gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Cancer Sci*, **94**, 692-8.

- Hannula-Jouppi, K., Kaminen-Ahola, N., Taipale, M., Eklund, R., Nopola-Hemmi, J., Kaariainen, H. & Kere, J. (2005). The Axon Guidance Receptor Gene ROBO1 Is a Candidate Gene for Developmental Dyslexia. *PLoS Genet*, **1**, e50.
- Hartmann, C., Numann, A., Mueller, W., Holtkamp, N., Simon, M. & von Deimling, A. (2004). Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma. *Int J Cancer*, **108**, 839-44.
- Haskill, S., Beg, A.A., Tompkins, S.M., Morris, J.S., Yurochko, A.D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P. & Baldwin, A.S., Jr. (1991). Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell*, **65**, 1281-9.
- Hatziaepostolou, M., Delbe, J., Katsoris, P., Polytarchou, C., Courty, J. & Papadimitriou, E. (2005). Heparin affin regulatory peptide is a key player in prostate cancer cell growth and angiogenicity. *Prostate*, **65**, 151-8.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, **387**, 296-9.
- Heimberger, A.B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R. & Aldape, K. (2005). Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin Cancer Res*, **11**, 1462-6.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. & Wolf, D.H. (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *Embo J*, **10**, 555-62.
- Heldin, C.H. & Westermark, B. (1990). Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul*, **1**, 555-66.
- Heldin, C.H. & Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, **79**, 1283-316.
- Hendricks, K.B., Shanahan, F. & Lees, E. (2004). Role for BRG1 in cell cycle control and tumor suppression. *Mol Cell Biol*, **24**, 362-76.
- Henn, W., Blin, N. & Zang, K.D. (1986). Polysomy of chromosome 7 is correlated with overexpression of the erbB oncogene in human glioblastoma cell lines. *Hum Genet*, **74**, 104-6.
- Heppner, G.H. & Miller, F.R. (1998). The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol*, **177**, 1-56.
- Herbst, R.S., Johnson, D.H., Mininberg, E., Carbone, D.P., Henderson, T., Kim, E.S., Blumenschein, G., Jr., Lee, J.J., Liu, D.D., Truong, M.T., Hong, W.K., Tran, H., Tsao, A., Xie, D., Ramies, D.A., Mass, R., Seshagiri, S., Eberhard, D.A., Kelley, S.K. & Sandler, A. (2005). Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, **23**, 2544-55.
- 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**, 3213-9.
- Herradon, G., Ezquerra, L., Nguyen, T., Silos-Santiago, I. & Deuel, T.F. (2005). Midkine regulates pleiotrophin organ-specific gene expression: evidence for transcriptional regulation and functional redundancy within the pleiotrophin/midkine developmental gene family. *Biochem Biophys Res Commun*, **333**, 714-21.
- Hesselager, G., Uhrbom, L., Westermark, B. & Nister, M. (2003). Complementary effects of platelet-derived growth factor autocrine stimulation and p53 or Ink4a-Arf deletion in a mouse glioma model. *Cancer Res*, **63**, 4305-9.
- Hibi, K., Kodera, Y., Ito, K., Akiyama, S. & Nakao, A. (2005). Aberrant methylation of HLTF, SOCS-1, and CDH13 genes is shown in colorectal cancers without lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum*, **48**, 1282-6.
- Hibi, K., Nakayama, H., Kanyama, Y., Kodera, Y., Ito, K., Akiyama, S. & Nakao, A. (2003). Methylation pattern of HLTF gene in digestive tract cancers. *Int J Cancer*, **104**, 433-6.
- Hienola, A., Pekkanen, M., Raulo, E., Vanttola, P. & Rauvala, H. (2004). HB-GAM inhibits proliferation and enhances differentiation of neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*, **26**, 75-88.

- Hivert, B., Liu, Z., Chuang, C.Y., Doherty, P. & Sundaresan, V. (2002). Robo1 and Robo2 are homophilic binding molecules that promote axonal growth. *Mol Cell Neurosci*, **21**, 534-45.
- Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, **420**, 25-7.
- Huang, H.S., Nagane, M., Klingbeil, C.K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X.D., Huang, C.M., Gill, G.N., Wiley, H.S. & Cavenee, W.K. (1997). The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem*, **272**, 2927-35.
- 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.
- Isakoff, M.S., Sansam, C.G., Tamayo, P., Subramanian, A., Evans, J.A., Fillmore, C.M., Wang, X., Biegel, J.A., Pomeroy, S.L., Mesirov, J.P. & Roberts, C.W. (2005). Inactivation of the Snf5 tumor suppressor stimulates cell cycle progression and cooperates with p53 loss in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17745-50.
- Isaksson, A., Musti, A.M. & Bohmann, D. (1996). Ubiquitin in signal transduction and cell transformation. *Biochim Biophys Acta*, **1288**, F21-9.
- Isenberg, K., Zhou, X. & Moore, B.W. (1992). Ethanol inhibits C6 cell growth: fetal alcohol syndrome model. *Alcohol Clin Exp Res*, **16**, 695-9.
- Ito, T., Yamauchi, M., Nishina, M., Yamamichi, N., Mizutani, T., Ui, M., Murakami, M. & Iba, H. (2001). Identification of SWI.SNF complex subunit BAF60a as a determinant of the transactivation potential of Fos/Jun dimers. *J Biol Chem*, **276**, 2852-7.
- Jackson, A.L. & Loeb, L.A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res*, **477**, 7-21.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K. & Reimann, J.D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol*, **10**, 429-39.
- Jensen, R.L. (1998). Growth factor-mediated angiogenesis in the malignant progression of glial tumors: a review. *Surg Neurol*, **49**, 189-95; discussion 196.
- Johnson, D.S., Morrison, N., Grant, L., Turner, T., Fantes, J., Connor, J.M. & Murday, V.A. (2005). Confirmation of CHD7 as a cause of CHARGE association identified by mapping a balanced chromosome translocation in affected monozygotic twins. *J Med Genet.* (no prelo)
- Jongmans, M., Admiraal, R., van der Donk, K., Vissers, L., Baas, A., Kapusta, L., van Hagen, J.M., Donnai, D., de Ravel, T., Veltman, J., Geurts van Kessel, A., de Vries, B., Brunner, H., Hoefsloot, L. & van Ravenswaaij, C. (2005). CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene. *J Med Genet.* (no prelo)
- Jung, C.G., Hida, H., Nakahira, K., Ikenaka, K., Kim, H.J. & Nishino, H. (2004). Pleiotrophin mRNA is highly expressed in neural stem (progenitor) cells of mouse ventral mesencephalon and the product promotes production of dopaminergic neurons from embryonic stem cell-derived nestin-positive cells. *Faseb J*, **18**, 1237-9.
- Kaetzel, D.M., Reid, J.D.t., Pedigo, N., Zimmer, S.G. & Boghaert, E.R. (1998). A dominant-negative mutant of the platelet-derived growth factor A-chain increases survival of hamsters implanted intracerebrally with the highly invasive CxT24-neo3 glioblastoma cell. *J Neurooncol*, **39**, 33-46.
- Kamiryo, T., Tada, K., Shiraishi, S., Shinjima, N., Nakamura, H., Kochi, M., Kuratsu, J., Saya, H. & Ushio, Y. (2002). Analysis of homozygous deletion of the p16 gene and correlation with survival in patients with glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, **96**, 815-22.
- Kang, H., Cui, K. & Zhao, K. (2004). BRG1 controls the activity of the retinoblastoma protein via regulation of p21CIP1/WAF1/SDI. *Mol Cell Biol*, **24**, 1188-99.
- Kazazoglou, T., Fleischer-Lambropoulos, E., Geladopoulos, T., Kentroti, S., Stefanis, C. & Vernadakis, A. (1996). Differential responsiveness of late passage C-6 glial cells and advanced passages of astrocytes derived from aged mouse cerebral hemispheres to cytokines and growth factors: glutamine synthetase activity. *Neurochem Res*, **21**, 609-14.

- Kempski, O., Chaussy, L., Gross, U., Zimmer, M. & Baethmann, A. (1983). Volume regulation and metabolism of suspended C6 glioma cells: an in vitro model to study cytotoxic brain edema. *Brain Res*, **279**, 217-28.
- 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.
- Khavari, P.A., Peterson, C.L., Tamkun, J.W., Mendel, D.B. & Crabtree, G.R. (1993). BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature*, **366**, 170-4.
- Kikuno, R., Nagase, T., Nakayama, M., Koga, H., Okazaki, N., Nakajima, D. & Ohara, O. (2004). HUGE: a database for human KIAA proteins, a 2004 update integrating HUGEppi and ROUGE. *Nucleic Acids Res*, **32**, D502-4.
- Kilic, T., Alberta, J.A., Zdunek, P.R., Acar, M., Iannarelli, P., O'Reilly, T., Buchdunger, E., Black, P.M. & Stiles, C.D. (2000). Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Res*, **60**, 5143-50.
- Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C. & Cavenee, W.K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, **61**, 215-25; discussion 226-9.
- Kleinman, H.K. & Martin, G.R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, **15**, 378-86.
- Klomp, H.J., Zernial, O., Flachmann, S., Wellstein, A. & Juhl, H. (2002). Significance of the expression of the growth factor pleiotrophin in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*, **8**, 823-7.
- Kojima, T., Shworak, N.W. & Rosenberg, R.D. (1992). Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line. *J Biol Chem*, **267**, 4870-7.
- Kondo, T., Setoguchi, T. & Taga, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 781-6.
- Kono, K., Ueba, T., Takahashi, J.A., Murai, N., Hashimoto, N., Myoumoto, A., Itoh, N. & Fukumoto, M. (2003). In vitro growth suppression of human glioma cells by a 16-mer oligopeptide: a potential new treatment modality for malignant glioma. *J Neurooncol*, **63**, 163-71.
- Koochekpour, S., Jeffers, M., Rulong, S., Taylor, G., Klineberg, E., Hudson, E.A., Resau, J.H. & Vande Woude, G.F. (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res*, **57**, 5391-8.
- Kovesdi, I., Fairhurst, J.L., Kretschmer, P.J. & Bohlen, P. (1990). Heparin-binding neurotrophic factor (HBNF) and MK, members of a new family of homologous, developmentally regulated proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **172**, 850-4.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. & Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, **387**, 299-303.
- Kumar, R., Wang, R.A. & Bagheri-Yarmand, R. (2003). Emerging roles of MTA family members in human cancers. *Semin Oncol*, **30**, 30-7.
- Labuhn, M., Jones, G., Speel, E.J., Maier, D., Zweifel, C., Gratzl, O., Van Meir, E.G., Hegi, M.E. & Merlo, A. (2001). Quantitative real-time PCR does not show selective targeting of p14(ARF) but concomitant inactivation of both p16(INK4A) and p14(ARF) in 105 human primary gliomas. *Oncogene*, **20**, 1103-9.
- Lal, A., Glazer, C.A., Martinson, H.M., Friedman, H.S., Archer, G.E., Sampson, J.H. & Riggins, G.J. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res*, **62**, 3335-9.
- Lal, B., Xia, S., Abounader, R. & Latterra, J. (2005). Targeting the c-Met pathway potentiates glioblastoma responses to gamma-radiation. *Clin Cancer Res*, **11**, 4479-86.
- Lalani, S.R., Safiullah, A.M., Fernbach, S.D., Phillips, M., Bacino, C.A., Molinari, L.M., Glass, N.L., Towbin, J.A., Craigen, W.J. & Belmont, J.W. (2005). SNP genotyping to screen for a common deletion in CHARGE syndrome. *BMC Med Genet*, **6**, 8.
- 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.,

- Lehoczky, 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., Chissoe, 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.
- Latil, A., Chene, L., Cochant-Priollet, B., Mangin, P., Fournier, G., Berthon, P. & Cussenot, O. (2003). Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *Int J Cancer*, **103**, 306-15.
- Laurent, B.C., Treich, I. & Carlson, M. (1993a). Role of yeast SNF and SWI proteins in transcriptional activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **58**, 257-63.
- Laurent, B.C., Treich, I. & Carlson, M. (1993b). The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev*, **7**, 583-91.
- Lee, D.W., Zhang, K., Ning, Z.Q., Raabe, E.H., Tintner, S., Wieland, R., Wilkins, B.J., Kim, J.M., Blough, R.I. & Arceci, R.J. (2000). Proliferation-associated SNF2-like gene (PASG): a SNF2 family member altered in leukemia. *Cancer Res*, **60**, 3612-22.
- Lee, K., Kentroti, S., Billie, H., Bruce, C. & Vernadakis, A. (1992). Comparative biochemical, morphological, and immunocytochemical studies between C-6 glial cells of early and late passages and advanced passages of glial cells derived from aged mouse cerebral hemispheres. *Glia*, **6**, 245-57.
- Leslie, N.R. & Downes, C.P. (2004). PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J*, **382**, 1-11.
- Leung, W.K., To, K.F., Man, E.P., Chan, M.W., Bai, A.H., Hui, A.J., Chan, F.K. & Sung, J.J. (2005). Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*, **100**, 2274-9.
- Leung, W.K., Yu, J., Bai, A.H., Chan, M.W., Chan, K.K., To, K.F., Chan, F.K., Ng, E.K., Chung, S.C. & Sung, J.J. (2003). Inactivation of helicase-like transcription factor by promoter hypermethylation in human gastric cancer. *Mol Carcinog*, **37**, 91-7.
- Levy, J.B., Canoll, P.D., Silvennoinen, O., Barnea, G., Morse, B., Honegger, A.M., Huang, J.T., Cannizzaro, L.A., Park, S.H., Druck, T. & et al. (1993). The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J Biol Chem*, **268**, 10573-81.
- Li, C. & Hung Wong, W. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol*, **2**, RESEARCH0032.
- Li, C. & Wong, W.H. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 31-6.
- Li, Y.S., Gurrieri, M. & Deuel, T.F. (1992). Pleiotrophin gene expression is highly restricted and is regulated by platelet-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **184**, 427-32.
- Li, Y.S., Milner, P.G., Chauhan, A.K., Watson, M.A., Hoffman, R.M., Kodner, C.M., Milbrandt, J. & Deuel, T.F. (1990). Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science*, **250**, 1690-4.
- Link, K.A., Burd, C.J., Williams, E., Marshall, T., Rosson, G., Henry, E., Weissman, B. & Knudsen, K.E. (2005). BAF57 governs androgen receptor action and androgen-dependent proliferation through SWI/SNF. *Mol Cell Biol*, **25**, 2200-15.
- Liu, L., Backlund, L.M., Nilsson, B.R., Grander, D., Ichimura, K., Goike, H.M. & Collins, V.P. (2005). Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas. *J Mol Med*, **83**, 917-926.

- Liu, L., Ichimura, K., Pettersson, E.H. & Collins, V.P. (1998a). Chromosome 7 rearrangements in glioblastomas; loci adjacent to EGFR are independently amplified. *J Neuropathol Exp Neurol*, **57**, 1138-45.
- Liu, L., Ichimura, K., Pettersson, E.H., Goike, H.M. & Collins, V.P. (2000). The complexity of the 7p12 amplicon in human astrocytic gliomas: detailed mapping of 246 tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, **59**, 1087-93.
- Liu, R., Liu, H., Chen, X., Kirby, M., Brown, P.O. & Zhao, K. (2001). Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell*, **106**, 309-18.
- Liu, X., Mashour, G.A., Webster, H.F. & Kurtz, A. (1998b). Basic FGF and FGF receptor 1 are expressed in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis: temporally distinct expression of midkine and pleiotrophin. *Glia*, **24**, 390-7.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-8.
- 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.
- Long, H., Sabatier, C., Ma, L., Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D.M., Tamada, A., Murakami, F., Goodman, C.S. & Tessier-Lavigne, M. (2004). Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron*, **42**, 213-23.
- Lopes, M.B. (2003). Angiogenesis in brain tumors. *Microsc Res Tech*, **60**, 225-30.
- Lopez-Gines, C., Cerda-Nicolas, M., Gil-Benso, R., Pellin, A., Lopez-Guerrero, J.A., Callaghan, R., Benito, R., Roldan, P., Piquer, J., Llacer, J. & Barbera, J. (2005). Association of chromosome 7, chromosome 10 and EGFR gene amplification in glioblastoma multiforme. *Clin Neuropathol*, **24**, 209-18.
- Lu, K.V., Jong, K.A., Kim, G.Y., Singh, J., Dia, E.Q., Yoshimoto, K., Wang, M.Y., Cloughesy, T.F., Nelson, S.F. & Mischel, P.S. (2005). Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin. *J Biol Chem*, **280**, 26953-64.
- Lualdi, E., Modena, P., Debiec-Rychter, M., Pedoutour, F., Teixeira, M.R., Facchinetti, F., Dagrada, G.P., Pilotti, S. & Sozzi, G. (2004). Molecular cytogenetic characterization of proximal-type epithelioid sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **41**, 283-90.
- Madaule, P. & Axel, R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell*, **41**, 31-40.
- Maddalena, A.S., Hainfellner, J.A., Hegi, M.E., Glatzel, M. & Aguzzi, A. (1999). No complementation between TP53 or RB-1 and v-src in astrocytomas of GFAP-v-src transgenic mice. *Brain Pathol*, **9**, 627-37.
- 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.
- Mahimainathan, L. & Choudhury, G.G. (2004). Inactivation of platelet-derived growth factor receptor by the tumor suppressor PTEN provides a novel mechanism of action of the phosphatase. *J Biol Chem*, **279**, 15258-68.
- Mallo, G.V., Fiedler, F., Calvo, E.L., Ortiz, E.M., Vasseur, S., Keim, V., Morisset, J. & Iovanna, J.L. (1997). Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *J Biol Chem*, **272**, 32360-9.
- Mallorga, P., Tallman, J.F. & Fishman, P.H. (1981). Differences in the beta-adrenergic responsiveness between high and low passage rat glioma C6 cells. *Biochim Biophys Acta*, **678**, 221-9.
- Mambetisaeva, E.T., Andrews, W., Camurri, L., Annan, A. & Sundaresan, V. (2005). Robo family of proteins exhibit differential expression in mouse spinal cord and Robo-Slit interaction is required for midline crossing in vertebrate spinal cord. *Dev Dyn*, **233**, 41-51.
- Mauro, M.J., O'Dwyer, M.E. & Druker, B.J. (2001). ST1571, a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, **48 Suppl 1**, S77-8.
- Maxwell, M., Naber, S.P., Wolfe, H.J., Galanopoulos, T., Hedley-Whyte, E.T., Black, P.M. & Antoniades, H.N. (1990). Coexpression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor genes

- by primary human astrocytomas may contribute to their development and maintenance. *J Clin Invest*, **86**, 131-40.
- Maxwell, M., Naber, S.P., Wolfe, H.J., Hedley-Whyte, E.T., Galanopoulos, T., Neville-Golden, J. & Antoniades, H.N. (1991). Expression of angiogenic growth factor genes in primary human astrocytomas may contribute to their growth and progression. *Cancer Res*, **51**, 1345-51.
- Medina, P.P., Carretero, J., Fraga, M.F., Esteller, M., Sidransky, D. & Sanchez-Cespedes, M. (2004). Genetic and epigenetic screening for gene alterations of the chromatin-remodeling factor, SMARCA4/BRG1, in lung tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, **41**, 170-7.
- Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M. & Deuel, T.F. (2000). Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2603-8.
- Mentlein, R. & Held-Feindt, J. (2002). Pleiotrophin, an angiogenic and mitogenic growth factor, is expressed in human gliomas. *J Neurochem*, **83**, 747-53.
- Mentlein, R. & Held-Feindt, J. (2003). Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy? *Naturwissenschaften*, **90**, 385-94.
- Mercado, J.M.M. (1997). Reversão fenotípica de células ST1 induzida por hormônios glicocorticóides: análise ao nível de ciclo celular e de genes supressores de tumor. In *Departamento de Bioquímica*. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- Miller, G. (2005). Neuroscience. Genes that guide brain development linked to dyslexia. *Science*, **310**, 759.
- Milner, P.G., Shah, D., Veile, R., Donis-Keller, H. & Kumar, B.V. (1992). Cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization of the human pleiotrophin gene. *Biochemistry*, **31**, 12023-8.
- Miriaux, S., Lemièrre, S., Pineau, R., Pluderi, M., Canioni, P., Franconi, J.M., Thiaudière, E., Bello, L., Bikfalvi, A. & Auguste, P. (2004). Inhibition of FGF receptor activity in glioma implanted into the mouse brain using the tetracyclin-regulated expression system. *Angiogenesis*, **7**, 105-13.
- Modena, P., Lualdi, E., Facchinetti, F., Galli, L., Teixeira, M.R., Pilotti, S. & Sozzi, G. (2005). SMARCB1/INI1 tumor suppressor gene is frequently inactivated in epithelioid sarcomas. *Cancer Res*, **65**, 4012-9.
- Moinova, H.R., Chen, W.D., Shen, L., Smiraglia, D., Olechnowicz, J., Ravi, L., Kasturi, L., Myeroff, L., Plass, C., Parsons, R., Minna, J., Willson, J.K., Green, S.B., Issa, J.P. & Markowitz, S.D. (2002). HLF gene silencing in human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4562-7.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. & Levine, A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, **69**, 1237-45.
- Moriyama, T., Kataoka, H., Tsubouchi, H. & Kono, M. (1995). Concomitant expression of hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator and c-met genes in human glioma cells in vitro. *FEBS Lett*, **372**, 78-82.
- Morris, S.W., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Dittmer, K.G., Shapiro, D.N., Saltman, D.L. & Look, A.T. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, **263**, 1281-4.
- Muchardt, C., Bourachot, B., Reyes, J.C. & Yaniv, M. (1998). ras transformation is associated with decreased expression of the brm/SNF2alpha ATPase from the mammalian SWI-SNF complex. *Embo J*, **17**, 223-31.
- Muchardt, C., Reyes, J.C., Bourachot, B., Leguoy, E. & Yaniv, M. (1996). The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis. *Embo J*, **15**, 3394-402.
- Muchardt, C. & Yaniv, M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Embo J*, **12**, 4279-90.
- Muchardt, C. & Yaniv, M. (1999). The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 189-95.
- Muchardt, C. & Yaniv, M. (2001). When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle. *Oncogene*, **20**, 3067-75.

- Mueller, H.W., Michel, A., Heckel, D., Fischer, U., Tonnes, M., Tsui, L.C., Scherer, S., Zang, K.D. & Meese, E. (1997). Identification of an amplified gene cluster in glioma including two novel amplified genes isolated by exon trapping. *Hum Genet*, **101**, 190-7.
- Muleris, M., Almeida, A., Dutrillaux, A.M., Pruchon, E., Vega, F., Delattre, J.Y., Poisson, M., Malfoy, B. & Dutrillaux, B. (1994). Oncogene amplification in human gliomas: a molecular cytogenetic analysis. *Oncogene*, **9**, 2717-22.
- Muller, S., Kunkel, P., Lamszus, K., Ulbricht, U., Lorente, G.A., Nelson, A.M., von Schack, D., Chin, D.J., Lohr, S.C., Westphal, M. & Melcher, T. (2003). A role for receptor tyrosine phosphatase zeta in glioma cell migration. *Oncogene*, **22**, 6661-8.
- Nagl, N.G., Jr., Patsialou, A., Haines, D.S., Dallas, P.B., Beck, G.R., Jr. & Moran, E. (2005). The p270 (ARID1A/SMARCF1) subunit of mammalian SWI/SNF-related complexes is essential for normal cell cycle arrest. *Cancer Res*, **65**, 9236-44.
- 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., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (2001b). Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest*, **81**, 77-82.
- Neely, K.E. & Workman, J.L. (2002). The complexity of chromatin remodeling and its links to cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1603**, 19-29.
- Nestler, U., Winking, M. & Boker, D.K. (2002). The tissue level of dexamethasone in human brain tumors is about 1000 times lower than the cytotoxic concentration in cell culture. *Neurol Res*, **24**, 479-82.
- Newton, H.B. (2003). Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 1: Growth factor and Ras signaling pathways. *Expert Rev Anticancer Ther*, **3**, 595-614.
- Newton, H.B. (2004). Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 2: PI3K/Akt/PTEN, mTOR, SHH/PTCH and angiogenesis. *Expert Rev Anticancer Ther*, **4**, 105-28.
- Nicolson, G.L., Nawa, A., Toh, Y., Taniguchi, S., Nishimori, K. & Moustafa, A. (2003). Tumor metastasis-associated human MTA1 gene and its MTA1 protein product: role in epithelial cancer cell invasion, proliferation and nuclear regulation. *Clin Exp Metastasis*, **20**, 19-24.
- 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.
- Ohara, O., Nagase, T., Ishikawa, K., Nakajima, D., Ohira, M., Seki, N. & Nomura, N. (1997). Construction and characterization of human brain cDNA libraries suitable for analysis of cDNA clones encoding relatively large proteins. *DNA Res*, **4**, 53-9.
- 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.
- Ohgaki, H. & Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, **109**, 93-108.
- Okamoto, Y., Di Patre, P.L., Burkhard, C., Horstmann, S., Jourde, B., Fahey, M., Schuler, D., Probst-Hensch, N.M., Yasargil, M.G., Yonekawa, Y., Lutoff, U.M., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (2004). Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, **108**, 49-56.
- Ortis, F. (2002). Papel de BRG1 e Brm, reguladores globais de transcrição, na reversão fenotípica de células ST1 pela ação de glicocorticóides. In *Departamento de Bioquímica*, Vol. Ph. D. Universidade of São Paulo: São Paulo.
- Ostman, A. (2004). PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev*, **15**, 275-86.
- Ozawa, H. & Takata, K. (1995). The granin family--its role in sorting and secretory granule formation. *Cell Struct Funct*, **20**, 415-20.

- Pariser, H., Herradon, G., Ezquerro, L., Perez-Pinera, P. & Deuel, T.F. (2005). Pleiotrophin regulates serine phosphorylation and the cellular distribution of beta-adducin through activation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12407-12.
- Paulus, W., Grothe, C., Sensenbrenner, M., Janet, T., Baur, I., Graf, M. & Roggendorf, W. (1990). Localization of basic fibroblast growth factor, a mitogen and angiogenic factor, in human brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*, **79**, 418-23.
- Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.J., Cronin, M.T., Holmes, C.P. & Fodor, S.P. (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5022-6.
- Peterson, C.L., Dingwall, A. & Scott, M.P. (1994). Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2905-8.
- Pfriege, F.W. & Barres, B.A. (1995). What the fly's glia tell the fly's brain. *Cell*, **83**, 671-4.
- Pietras, K., Sjoblom, T., Rubin, K., Heldin, C.H. & Ostman, A. (2003). PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell*, **3**, 439-43.
- Post, G.R. & Dawson, G. (1992). Characterization of a cell line derived from a human oligodendroglioma. *Mol Chem Neuropathol*, **16**, 303-17.
- Powers, C., Aigner, A., Stoica, G.E., McDonnell, K. & Wellstein, A. (2002). Pleiotrophin signaling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth. *J Biol Chem*, **277**, 14153-8.
- Pulford, K., Lamant, L., Espinos, E., Jiang, Q., Xue, L., Turturro, F., Delsol, G. & Morris, S.W. (2004a). The emerging normal and disease-related roles of anaplastic lymphoma kinase. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 2939-53.
- Pulford, K., Morris, S.W. & Turturro, F. (2004b). Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol*, **199**, 330-58.
- Raabe, E.H., Abdurrahman, L., Behbehani, G. & Arceci, R.J. (2001). An SNF2 factor involved in mammalian development and cellular proliferation. *Dev Dyn*, **221**, 92-105.
- Rangarajan, A., Hong, S.J., Gifford, A. & Weinberg, R.A. (2004). Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell*, **6**, 171-83.
- Rao, R.D. & James, C.D. (2004). Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Semin Oncol*, **31**, 595-604.
- Reisman, D.N., Sciarrotta, J., Bouldin, T.W., Weissman, B.E. & Funkhouser, W.K. (2005). The expression of the SWI/SNF ATPase subunits BRG1 and BRM in normal human tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, **13**, 66-74.
- Reisman, D.N., Sciarrotta, J., Wang, W., Funkhouser, W.K. & Weissman, B.E. (2003). Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res*, **63**, 560-6.
- Reyes, J.C., Barra, J., Muchardt, C., Camus, A., Babinet, C. & Yaniv, M. (1998). Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *Embo J*, **17**, 6979-91.
- Rice, D.S. & Curran, T. (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 1005-39.
- Roberts, C.W. & Orkin, S.H. (2004). The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer*, **4**, 133-42.
- Roberts, W.G., Whalen, P.M., Soderstrom, E., Moraski, G., Lyssikatos, J.P., Wang, H.F., Cooper, B., Baker, D.A., Savage, D., Dalvie, D., Atherton, J.A., Ralston, S., Szewc, R., Kath, J.C., Lin, J., Soderstrom, C., Tkalecic, G., Cohen, B.D., Pollack, V., Barth, W., Hungerford, W. & Ung, E. (2005). Antiangiogenic and antitumor activity of a selective PDGFR tyrosine kinase inhibitor, CP-673,451. *Cancer Res*, **65**, 957-66.
- Rosen, E.M., Laterra, J., Joseph, A., Jin, L., Fuchs, A., Way, D., Witte, M., Weinand, M. & Goldberg, I.D. (1996). Scatter factor expression and regulation in human glial tumors. *Int J Cancer*, **67**, 248-55.
- Rossi, M.R., La Duca, J., Matsui, S., Nowak, N.J., Hawthorn, L. & Cowell, J.K. (2005). Novel amplicons on the short arm of chromosome 7 identified using high resolution array CGH contain over expressed genes in addition to EGFR in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer*, **44**, 392-404.

- Roversi, G., Pfundt, R., Moroni, R.F., Magnani, I., van Reijmersdal, S., Pollo, B., Straatman, H., Larizza, L. & Schoenmakers, E.F. (2005). Identification of novel genomic markers related to progression to glioblastoma through genomic profiling of 25 primary glioma cell lines. *Oncogene*.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, **132**, 365-86.
- Rubenstein, M., Shaw, M., Mirochnik, Y., Slobodskoy, L., Glick, R., Lichter, T., Chou, P. & Guinan, P. (1999). In vivo establishment of T98G human glioblastoma. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, **21**, 391-3.
- Saiki, M., Mima, T., Takahashi, J.C., Tani, S., Yukawa, H., Ueno, H., Mikawa, T., Itoh, N., Kikuchi, H., Hashimoto, N. & Miyatake, S. (1999). Adenovirus-mediated gene transfer of a truncated form of fibroblast growth factor receptor inhibits growth of glioma cells both in vitro and in vivo. *J Neurooncol*, **44**, 195-203.
- Sambrook, J.S. & Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Samuelson, A.V., Narita, M., Chan, H.M., Jin, J., de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Narita, M., Fuchs, M., Livingston, D.M. & Lowe, S.W. (2005). p400 is required for E1A to promote apoptosis. *J Biol Chem*, **280**, 21915-23.
- Sanlaville, D., Etchevers, H.C., Gonzales, M., Martinovic, J., Clement-Ziza, M., Delezoide, A.L., Aubry, M.C., Pelet, A., Chemouny, S., Cruaud, C., Audollent, S., Esculpavit, C., Goudefroye, G., Ozilou, C., Fredouille, C., Joye, N., Morichon-Delvallez, N., Dumez, Y., Weissenbach, J., Munnich, A., Amiel, J., Encha-Razavi, F., Lyonnet, S., Vekemans, M. & Attie-Bitach, T. (2005). Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome in fetuses with CHD7 truncating mutations correlates with expression during human development. *J Med Genet*.
- Sansal, I. & Sellers, W.R. (2004). The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol*, **22**, 2954-63.
- Sasahara, R.M. (1995). Efeito anti-tumorigênico de hormônios glucocorticóides sobre células C6 de glioma de rato: bases moleculares. In *Departamento de Bioquímica*. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- Sausville, E.A. (2004). Optimizing target selection and development strategy in cancer treatment: the next wave. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, **4**, 445-7.
- Savarese, T.M., Jang, T., Low, H.P., Salmonsens, R., Litofsky, N.S., Matuasevic, Z., Ross, A.H. & Recht, L.D. (2005). Isolation of immortalized, INK4a/ARF-deficient cells from the subventricular zone after in utero N-ethyl-N-nitrosourea exposure. *J Neurosurg*, **102**, 98-108.
- Scanlan, M.J., Welt, S., Gordon, C.M., Chen, Y.T., Gure, A.O., Stockert, E., Jungbluth, A.A., Ritter, G., Jager, D., Jager, E., Knuth, A. & Old, L.J. (2002). Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets. *Cancer Res*, **62**, 4041-7.
- Schadt, E.E., Li, C., Ellis, B. & Wong, W.H. (2001). Feature extraction and normalization algorithms for high-density oligonucleotide gene expression array data. *J Cell Biochem Suppl*, **Suppl 37**, 120-5.
- Schrock, E., Thiel, G., Lozanova, T., du Manoir, S., Meffert, M.C., Jauch, A., Speicher, M.R., Nurnberg, P., Vogel, S., Janisch, W. & et al. (1994). Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol*, **144**, 1203-18.
- Schuster, E.F. & Stoger, R. (2002). CHD5 defines a new subfamily of chromodomain-SWI2/SNF2-like helicases. *Mamm Genome*, **13**, 117-9.
- Seng, T.J., Ichimura, K., Liu, L., Tingby, O., Pearson, D.M. & Collins, V.P. (2005). Complex chromosome 22 rearrangements in astrocytic tumors identified using microsatellite and chromosome 22 tile path array analysis. *Genes Chromosomes Cancer*, **43**, 181-93.
- Setoguchi, T., Taga, T. & Kondo, T. (2004). Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle*, **3**, 414-5.
- Shamah, S.M., Stiles, C.D. & Guha, A. (1993). Dominant-negative mutants of platelet-derived growth factor revert the transformed phenotype of human astrocytoma cells. *Mol Cell Biol*, **13**, 7203-12.

- Shanahan, F., Seghezzi, W., Parry, D., Mahony, D. & Lees, E. (1999). Cyclin E associates with BAF155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest. *Mol Cell Biol*, **19**, 1460-9.
- Shannon, P., Sabha, N., Lau, N., Kamnasaran, D., Gutmann, D.H. & Guha, A. (2005). Pathological and molecular progression of astrocytomas in a GFAP:12 V-Ha-Ras mouse astrocytoma model. *Am J Pathol*, **167**, 859-67.
- Sharpless, N.E. (2005). INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*, **576**, 22-38.
- Shaw-Smith, C.J. (2005). Oesophageal atresia, tracheo-oesophageal fistula and the VACTERL association: review of genetics and epidemiology. *J Med Genet*.
- Sherr, C.J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, **116**, 235-46.
- Sherr, C.J. & Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-12.
- Shur, I. & Benayahu, D. (2005). Characterization and functional analysis of CReMM, a novel chromodomain helicase DNA-binding protein. *J Mol Biol*, **352**, 646-55.
- Silos-Santiago, I., Yeh, H.J., Gurrieri, M.A., Guillerman, R.P., Li, Y.S., Wolf, J., Snider, W. & Deuel, T.F. (1996). Localization of pleiotrophin and its mRNA in subpopulations of neurons and their corresponding axonal tracts suggests important roles in neural-glial interactions during development and in maturity. *J Neurobiol*, **31**, 283-96.
- Smith, D.I., Zhu, Y., McAvoy, S. & Kuhn, R. (2005). Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. *Cancer Lett*.
- 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., Massirer, K.B., Sogayar, M.C., Filho, F.C., Camargo, L.P., Cunha, M.A., De Souza, S.J., Faria, M., Jr., Giuliani, 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.
- Souttou, B., Ahmad, S., Riegel, A.T. & Wellstein, A. (1997). Signal transduction pathways involved in the mitogenic activity of pleiotrophin. Implication of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase pathways. *J Biol Chem*, **272**, 19588-93.
- Stefanik, D.F., Rizkalla, L.R., Soi, A., Goldblatt, S.A. & Rizkalla, W.M. (1991a). Acidic and basic fibroblast growth factors are present in glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, **51**, 5760-5.
- Stefanik, D.F., Rizkalla, L.R., Soi, A., Goldblatt, S.A. & Rizkalla, W.M. (1991b). Acidic and basic fibroblast growth factors are present in glioblastoma multiforme and normal brain. *Ann N Y Acad Sci*, **638**, 477-80.
- 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.
- Stiver, S.I. (2004). Angiogenesis and its role in the behavior of astrocytic brain tumors. *Front Biosci*, **9**, 3105-23.
- Stoica, G.E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D.J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A.T. & Wellstein, A. (2001). Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem*, **276**, 16772-9.

- Stoica, G.E., Kuo, A., Powers, C., Bowden, E.T., Sale, E.B., Riegel, A.T. & Wellstein, A. (2002). Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem*, **277**, 35990-8.
- Stopka, T., Zakova, D., Fuchs, O., Kubrova, O., Blafkova, J., Jelinek, J., Necas, E. & Zivny, J. (2000). Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia*, **14**, 1247-52.
- Strobeck, M.W., Knudsen, K.E., Fribourg, A.F., DeCristofaro, M.F., Weissman, B.E., Imbalzano, A.N. & Knudsen, E.S. (2000). BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7748-53.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. & Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15545-50.
- Sundaresan, V., Roberts, I., Bateman, A., Bankier, A., Sheppard, M., Hobbs, C., Xiong, J., Minna, J., Latif, F., Lerman, M. & Rabbitts, P. (1998). The DUTT1 gene, a novel NCAM family member is expressed in developing murine neural tissues and has an unusually broad pattern of expression. *Mol Cell Neurosci*, **11**, 29-35.
- Suzuki, T., Maruno, M., Wada, K., Kagawa, N., Fujimoto, Y., Hashimoto, N., Izumoto, S. & Yoshimine, T. (2004). Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system. *Brain Tumor Pathol*, **21**, 27-34.
- Tajul-Arifin, K., Teasdale, R., Ravasi, T., Hume, D.A. & Mattick, J.S. (2003). Identification and analysis of chromodomain-containing proteins encoded in the mouse transcriptome. *Genome Res*, **13**, 1416-29.
- Tamkun, J.W., Dearing, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, A.M., Kaufman, T.C. & Kennison, J.A. (1992). brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*, **68**, 561-72.
- Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S.R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M. & Amati, B. (2004). E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol*, **24**, 4546-56.
- Tavazoie, S., Hughes, J.D., Campbell, M.J., Cho, R.J. & Church, G.M. (1999). Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet*, **22**, 281-5.
- Therrien, M., Morrison, D.K., Wong, A.M. & Rubin, G.M. (2000). A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in Drosophila. *Genetics*, **156**, 1231-42.
- Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 5201-5.
- Toresson, H., Mata de Urquiza, A., Fagerstrom, C., Perlmann, T. & Campbell, K. (1999). Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development*, **126**, 1317-26.
- Trouche, D., Le Chalony, C., Muchardt, C., Yaniv, M. & Kouzarides, T. (1997). RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11268-73.
- Tsujiuchi, T., Sasaki, Y., Oka, Y., Kuniyasu, H. & Tsutsumi, M. (2004). Alterations of the Dutt1/Robo1 gene in lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Mol Carcinog*, **40**, 241-6.
- Uchinokura, S., Miyata, S., Fukushima, T., Itoh, H., Nakano, S., Wakisaka, S. & Kataoka, H. (2006). Role of hepatocyte growth factor activator (HGF activator) in invasive growth of human glioblastoma cells in vivo. *Int J Cancer*, **118**, 583-92.
- Ulbricht, U., Brockmann, M.A., Aigner, A., Eckerich, C., Muller, S., Fillbrandt, R., Westphal, M. & Lamszus, K. (2003). Expression and function of the receptor protein tyrosine phosphatase zeta and its ligand pleiotrophin in human astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, **62**, 1265-75.
- Umekage, T. & Kato, K. (1991). A mouse brain cDNA encodes a novel protein with the protein kinase C phosphorylation site domain common to MARCKS. *FEBS Lett*, **286**, 147-51.

- Vairapandi, M., Balliet, A.G., Hoffman, B. & Liebermann, D.A. (2002). GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol*, **192**, 327-38.
- Valentini, S.R. (1993). Bases moleculares da reversão fenotípica induzida por hormônios glicocorticóides nas células C6 de glioma de rato. In *Departamento de Bioquímica*. Universidade de São Paulo: São Paulo.
- Valentini, S.R. & Armelin, M.C. (1996). Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. *J Endocrinol*, **148**, 11-7.
- Varela, M., Ranuncolo, S.M., Morand, A., Lastiri, J., De Kier Joffe, E.B., Puricelli, L.I. & Pallotta, M.G. (2004). EGF-R and PDGF-R, but not bcl-2, overexpression predict overall survival in patients with low-grade astrocytomas. *J Surg Oncol*, **86**, 34-40.
- Vargesson, N., Luria, V., Messina, I., Erskine, L. & Laufer, E. (2001). Expression patterns of Slit and Robo family members during vertebrate limb development. *Mech Dev*, **106**, 175-80.
- Vassbotn, F.S., Andersson, M., Westermarck, B., Heldin, C.H. & Ostman, A. (1993). Reversion of autocrine transformation by a dominant negative platelet-derived growth factor mutant. *Mol Cell Biol*, **13**, 4066-76.
- 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.
- Vissers, L.E., van Ravenswaaij, C.M., Admiraal, R., Hurst, J.A., de Vries, B.B., Janssen, I.M., van der Vliet, W.A., Huys, E.H., de Jong, P.J., Hamel, B.C., Schoenmakers, E.F., Brunner, H.G., Veltman, J.A. & van Kessel, A.G. (2004). Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet*, **36**, 955-7.
- Vries, R.G., Bezrookove, V., Zuijderduijn, L.M., Kia, S.K., Houweling, A., Oruetebarria, I., Raap, A.K. & Verrijzer, C.P. (2005). Cancer-associated mutations in chromatin remodeler hSNF5 promote chromosomal instability by compromising the mitotic checkpoint. *Genes Dev*, **19**, 665-70.
- Wain, E.M., Mitchell, T.J., Russell-Jones, R. & Whittaker, S.J. (2005). Fine mapping of chromosome 10q deletions in mycosis fungoides and sezary syndrome: identification of two discrete regions of deletion at 10q23.33-24.1 and 10q24.33-25.1. *Genes Chromosomes Cancer*, **42**, 184-92.
- Walter, K.A., Hossain, M.A., Luddy, C., Goel, N., Reznik, T.E. & Laterra, J. (2002). Scatter factor/hepatocyte growth factor stimulation of glioblastoma cell cycle progression through G(1) is c-Myc dependent and independent of p27 suppression, Cdk2 activation, or E2F1-dependent transcription. *Mol Cell Biol*, **22**, 2703-15.
- Wanaka, A., Carroll, S.L. & Milbrandt, J. (1993). Developmentally regulated expression of pleiotrophin, a novel heparin binding growth factor, in the nervous system of the rat. *Brain Res Dev Brain Res*, **72**, 133-44.
- Wang, B., Xiao, Y., Ding, B.B., Zhang, N., Yuan, X., Gui, L., Qian, K.X., Duan, S., Chen, Z., Rao, Y. & Geng, J.G. (2003). Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell*, **4**, 19-29.
- Wang, L., Baiocchi, R.A., Pal, S., Mosialos, G., Caligiuri, M. & Sif, S. (2005). The BRG1- and hBRM-associated factor BAF57 induces apoptosis by stimulating expression of the cylindromatosis tumor suppressor gene. *Mol Cell Biol*, **25**, 7953-65.
- Wang, W., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A., Cairns, B.R. & Crabtree, G.R. (1996). Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev*, **10**, 2117-30.
- Wang, X., Nagl, N.G., Jr., Flowers, S., Zweitzig, D., Dallas, P.B. & Moran, E. (2004). Expression of p270 (ARID1A), a component of human SWI/SNF complexes, in human tumors. *Int J Cancer*, **112**, 636.
- Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*, **6**, 217-23; discussion 23-4.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S.,

- Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K.D., Deri, J., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Dickens, N.J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D.M., Eddy, S.R., Elnitski, L., Emes, R.D., Eswara, P., Eyraas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G.A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W.N., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Furey, T.S., Gage, D., Gibbs, R.A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T.A., Green, E.D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R.C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L.W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D.B., Johnson, L.S., Jones, M., Jones, T.A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E.K., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, **420**, 520-62.
- Weber, D., Klomp, H.J., Czubyko, F., Wellstein, A. & Juhl, H. (2000). Pleiotrophin can be rate-limiting for pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res*, **60**, 5284-8.
- Weber, R.G., Sabel, M., Reifengerger, J., Sommer, C., Oberstrass, J., Reifengerger, G., Kiessling, M. & Cremer, T. (1996). Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene*, **13**, 983-94.
- Westermarck, B., Heldin, C.H. & Nister, M. (1995). Platelet-derived growth factor in human glioma. *Glia*, **15**, 257-63.
- Wikstrand, C.J., Reist, C.J., Archer, G.E., Zalutsky, M.R. & Bigner, D.D. (1998). The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J Neurovirol*, **4**, 148-58.
- Williams, M.S. (2005). Speculations on the pathogenesis of CHARGE syndrome. *Am J Med Genet A*, **133**, 318-25.
- Wong, A.J., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Kinzler, K.W., Hamilton, S.R. & Vogelstein, B. (1987). Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6899-903.
- Wu, H., Barusevicius, A., Babb, J., Klein-Szanto, A., Godwin, A., Elenitsas, R., Gelfand, J.M., Lessin, S. & Seykora, J.T. (2005). Pleiotrophin expression correlates with melanocytic tumor progression and metastatic potential. *J Cutan Pathol*, **32**, 125-30.
- Xian, J., Aitchison, A., Bobrow, L., Corbett, G., Pannell, R., Rabbitts, T. & Rabbitts, P. (2004). Targeted disruption of the 3p12 gene, Dutt1/Robo1, predisposes mice to lung adenocarcinomas and lymphomas with methylation of the gene promoter. *Cancer Res*, **64**, 6432-7.
- Xiao, A., Yin, C., Yang, C., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P. & Van Dyke, T. (2005). Somatic induction of Pten loss in a preclinical astrocytoma model reveals major roles in disease progression and avenues for target discovery and validation. *Cancer Res*, **65**, 5172-80.
- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J. & Wang, W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*, **2**, 851-61.
- Yahanda, A.M., Bruner, J.M., Donehower, L.A. & Morrison, R.S. (1995). Astrocytes derived from p53-deficient mice provide a multistep in vitro model for development of malignant gliomas. *Mol Cell Biol*, **15**, 4249-59.
- Yang, Y., Ludwig, R.L., Jensen, J.P., Pierre, S.A., Medaglia, M.V., Davydov, I.V., Safiran, Y.J., Oberoi, P., Kenten, J.H., Phillips, A.C., Weissman, A.M. & Vousden, K.H. (2005). Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell*, **7**, 547-59.
- Yano, M., Ouchida, M., Shigematsu, H., Tanaka, N., Ichimura, K., Kobayashi, K., Inaki, Y., Toyooka, S., Tsukuda, K., Shimizu, N. & Shimizu, K. (2004). Tumor-specific exon creation of the HELLS/SMARCA6 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, **112**, 8-13.
- Yukawa, H., Takahashi, J.C., Miyatake, S.I., Saiki, M., Matsuoka, N., Akimoto, M., Yanamoto, H., Nagata, I., Kikuchi, H. & Hashimoto, N. (2000). Adenoviral gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes angiogenesis in rat brain. *Gene Ther*, **7**, 942-9.
- Zhang, L., Mabuchi, T., Satoh, E., Maeda, S., Nukui, H. & Naganuma, H. (2004). Overexpression of heparin-binding growth-associated molecule in malignant glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, **44**, 637-43; discussion 644-5.

- Zhang, X.Y., DeSalle, L.M., Patel, J.H., Capobianco, A.J., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A. & McMahon, S.B. (2005). Metastasis-associated protein 1 (MTA1) is an essential downstream effector of the c-MYC oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13968-73.
- Zhou, J., Chau, C.M., Deng, Z., Shiekhataar, R., Spindler, M.P., Schepers, A. & Lieberman, P.M. (2005). Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication. *Embo J*, **24**, 1406-17.
- Zhou, X.P., Li, Y.J., Hoang-Xuan, K., Laurent-Puig, P., Mokhtari, K., Longy, M., Sanson, M., Delattre, J.Y., Thomas, G. & Hamelin, R. (1999). Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations. *Int J Cancer*, **84**, 150-4.