**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**MECANISMOS MOLECULARES
ENVOLVIDOS NA RESPOSTA
ANTI-TUMORAL E
RESISTÊNCIA A ATRA**

ANA PAULA GUEDES HASEGAWA

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica**

PROFa. DRa. MARI CLEIDE SOGAYAR

SÃO PAULO

Data do depósito na CPG: 05/08/2005

Cinco de agosto de dois mil e cinco

*“É verdade que não é possível encontrar a
pedra filosofal: mas é bom que a procuremos.
Pois, no decorrer dessa procura,
Descobrimos muitos segredos úteis
Que não estávamos procurando.”*

Fontenelle

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Mari Sogayar, por ter me acolhido em seu laboratório e me orientado ao longo destes anos. Por seu entusiasmo pela ciência e empenho com o laboratório;

A todos os colegas e amigos do LBCM e UIPH, por todos os bons momentos vividos no laboratório: Ana Carolina, André, Angelita, Anna Carla, Denise, Fernanda Festa, Fernando, Gabriela, Ilana, Isis, Juan, Juliana, Karin, Leonardo, Letícia, Luciana Cruz, Luciana Gomes, Marina, Miguel, Renata, Rita e Tatiane; em especial à Theri, por ter dividido a bancada comigo durante estes anos;

Ao querido Christian Colin, por toda a ajuda e apoio, imprescindíveis para a realização deste trabalho. Por sua generosidade em compartilhar seu conhecimento, sua disponibilidade para ajudar e, acima de tudo, por sua inestimável amizade (Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui...);

Aos amigos Antero, Diana, Marcos, Sheila e Vitor por proporcionarem bons momentos de descontração e pela disposição para revisar a tese;

Ao Mário H. Bengtson, por ter me ensinado e ajudado nos primeiros passos do caminho da ciência;

A Débora, Helena, Isnar, Luana, Patrícia, Ricardo, Sandra e Zizi, pelo importante apoio e disponibilidade para ajudar;

À Profa. Sueli Marie e à Sueli Oba (FM-USP), por terem gentilmente cedido as amostras de gliomas humanos e à Sheila e à Zizi de Mendonça, por terem processado este material da melhor forma possível;

Aos amigos que já deixaram o laboratório, mas que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho: Ariadne, Fernanda Ortis, Jean, Katlin, Lúcia Helena, Maki, Mauro, Sylvia, Tatiana e Wagner;

Ao Dr. Martin Petkovich, por ter me recebido de portas abertas em seu laboratório e por me mostrar um modo diferente de ver a ciência e a vida;

Aos amigos do Pet's Lab, Ali, Don, Katie, Kristen e especialmente aos queridos Glenn e Tracie, por tornarem minha estada em Kingston um momento muito especial;

À FAPESP, pelo apoio financeiro no Brasil, e à CAPES, pelo financiamento de meu estágio no Canadá;

Aos meus queridos amigos, tios e primos, em especial aos meus priminhos Giovanni, Gustavo, Laís e Lúcia, por trazerem mais alegria à minha vida;

À minha irmã Adriana e meu irmão Márcio, por seu apoio e amizade;

À minha mãe Sonia, pelo exemplo de equilíbrio; ao meu pai Paulo, pelo exemplo de honestidade e caráter; por seu apoio constante e carinho;

Ao Júlio, por dividir comigo todos os momentos, bons ou ruins; por seu carinho, apoio e compreensão e por sempre acreditar em meu potencial;

Os meus mais profundos e sinceros agradecimentos.

I. ÍNDICE GERAL

I	Índice de Figuras e Tabelas.....	1
II	Abreviaturas.....	7
III	Resumo.....	9
IV	Abstract.....	11
1.	Introdução.....	13
1.1.	As células da glia e os gliomas.....	13
1.1.1.	Glioma.....	14
1.1.2.	Células C6 e ST1 como modelos experimentais.....	16
1.2.	Os retinóides e o ácido retinóico.....	19
1.2.1.	Retinóides e câncer.....	19
1.2.2.	Metabolismo de retinóides.....	21
1.2.3.	Receptores de retinóides.....	24
1.2.4.	Genes com expressão regulada por ácido retinóico.....	26
1.3.	Citocromos P450.....	27
1.4.	Citocromos P450 Induzidos por Ácido Retinóico – P450RAI ou Cyp26.....	30
1.5.	Resistência ao tratamento com ácido retinóico.....	32
2.	Objetivos.....	33
2.1.	Objetivos gerais.....	35
2.2.	Objetivos específicos.....	35
3.	Racional.....	36
4.	Materiais e Métodos.....	37
4.1.	Materiais.....	37
4.1.1.	Linhagens celulares.....	37
4.1.2.	Soluções e meios de cultura para células de mamífero.....	38
4.1.3.	Plasmídeos.....	38
4.1.4.	Meios de cultura para bactérias.....	41
4.1.5.	Isótopos radioativos.....	42
4.1.6.	Reagentes.....	42
4.1.7.	Soluções.....	42
4.1.8.	Primers.....	43
4.2.	Métodos.....	45
4.2.1.	Cultura e manutenção dos estoques celulares.....	45
4.2.2.	Amostras de gliomas.....	45
4.2.3.	Extração e purificação de RNA total de células de	

mamíferos.....	47
4.2.4.Clonagem do transcrito completo de <i>cyp26b1</i>	47
4.2.5.Seqüenciamento do transcrito completo de <i>cyp26b1</i> de rato.....	53
4.2.6.Predição de membros da família <i>Cyp26</i> e análise de similaridade protéica.....	54
4.2.7.Expressão de <i>cyp26b1</i> em células de mamífero.....	55
4.2.8.Isolamento de variante de C6 resistente ao tratamento com atRA.....	56
4.2.9.Análise fenotípica das células transfectantes ou resistentes ao tratamento com atRA.....	57
4.2.10. Análise da expressão gênica.....	60
4.2.11. Análise estatística.....	66
5. Resultados.....	67
5.1. Clonagem do cDNA correspondente ao transcrito completo de <i>cyp26b1</i> de rato.....	67
5.2. Seqüenciamento de <i>cyp256b1</i> de rato.....	68
5.2.1.Geração de fragmentos de <i>cyp26b1</i> por digestão com enzimas de restrição.....	69
5.2.2.Obtenção de cones aleatórios através de fragmentação randômica por ultra-som.....	70
5.2.3.Montagem da seqüência de <i>cyp26b1</i> de rato.....	71
5.3. Análise computacional.....	73
5.3.1.Estrutura genômica de <i>cyp26b1</i>	73
5.3.2.Determinação da fase aberta de leitura e da seqüência protéica conceitual de Cyp26B1.....	74
5.3.3.Predição de novos membros da família <i>Cyp26</i> em diversos organismos.....	76
5.3.4.Análise da similaridade protéica de rCyp26B1 com proteínas de outros organismos e outras proteínas da mesma família.....	77
5.4. Expressão de enzimas da família <i>Cyp26</i>	79
5.5. Análise funcional de Cyp26B1.....	89
5.5.1.Clonagem da porção codificante de Cyp26B1.....	89
5.5.2.Avaliação da eficiência de transfecção de células C6, ST1, T98G e P19.....	90
5.5.3.Transfecção estável da construção de expressão de Cyp26B1.....	92
5.5.4.Análise da influência da expressão de Cyp26B1 no crescimento celular.....	95
5.6. Isolamento de variante de C6 resistente ao tratamento com atRA.....	113
5.6.1.Enriquecimento da linhagem C6 para células resistentes ao tratamento com atRA.....	113

5.6.2. Isolamento de variantes clonais de C6 resistentes ao tratamento com atRA e caracterização por crescimento em substrato semi-sólido.....	115
5.6.3. Análise da responsividade da variante C6R ao tratamento com atRA através de curva de crescimento em substrato semi-sólido.....	120
5.6.4. Análise da capacidade tumorigênica de C6R.....	124
5.7. Caracterização molecular de C6R.....	125
5.7.1. Genes induzidos por atRA na variante ST1.....	125
5.7.2. Receptores e proteínas ligantes de ácido retinóico.....	131
6. Discussão.....	142
6.1. Clonagem e descrição do transcrito completo de Cyp26B1 de rato.....	142
6.2. Análise funcional de Cyp26B1.....	145
6.3. Obtenção de variantes de C6 resistentes ao tratamento com ácido retinóico.....	147
7. Anexos.....	155
7.1. Anexo I.....	155
7.2. Anexo II.....	157
7.3. Anexo III.....	158
8. Conclusões.....	163
9. Referências bibliográficas.....	165
<i>Curriculum Vitae</i>	

II. ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

A) Figuras

Figura 1	Metabolismo de retinóides.....	22
Figura 2	Vetor de clonagem pBlueScript SK ⁻	39
Figura 3	Vetor de entrada pENTR2B, do sistema Gateway.....	40
Figura 4	Vetor de expressão em células de mamíferos pDEST12.2, do sistema Gateway.....	41
Figura 5	Amplificação do cDNA correspondente ao transcrito completo de <i>cyp26b1</i> de rato.....	67
Figura 6	Digestão do cDNA correspondente ao transcrito completo de <i>cyp26b1</i> de rato com as enzimas Sau3A1, TaqI, HaeIII, RsaI, HinfI e AvaI.....	69
Figura 7	Fragmentação randômica do cDNA correspondente ao transcrito completo de <i>cyp26b1</i> de rato através de sonicação.....	71
Figura 8	Contribuição e distribuição das seqüências utilizadas para montagem do transcrito completo de <i>cyp26b1</i> de rato.....	72
Figura 9	Alinhamento da seqüência de <i>cyp26b1</i> com o genoma de rato, através da ferramenta Blat.....	73
Figura 10	Determinação da fase aberta de leitura (ORF) e da seqüência de aminoácidos teórica de Cyp26B1.....	75
Figura 11	Dendograma resultante do alinhamento múltiplo das seqüências protéicas de Cyp26s descritas na literatura, de Cyp26B1 de rato e dos diversos Cyp26s preditos por análise computacional.....	78

Figura 12	Análise da expressão de <i>cyp26b1</i> em células ST1 de glioma de rato.....	80
Figura 13	Análise da expressão de <i>cyp26a1</i> em células A172, HOG, T98G, U343MG, U343MG-A, U373MG e U87 de gliomas humanos.....	82
Figura 14	Análise da expressão de <i>cyp26b1</i> em células A172, HOG, T98G, U343MG, U343MG-A, U373MG e U87 de gliomas humanos.....	84
Figura 15	Análise da expressão de <i>cyp26a1</i> e de <i>cyp26b1</i> em amostras de cérebro normal e gliomas humanos.....	88
Figura 16	Fracionamento em gel de agarose do produto de amplificação da região codificante de <i>cyp26b1</i>	89
Figura 17	Avaliação da eficiência de transfecção de células C6 e T98G, através de transfecção transitória de vetor de expressão de EGFP.....	91
Figura 18	Avaliação da expressão da região codificante de <i>cyp26b1</i> nas populações transfectantes estáveis de células T98G, através de Northern blot.....	94
Figura 19	Avaliação da expressão da região codificante de <i>cyp26b1</i> nas populações transfectantes estáveis de células P19, através de Northern blot.....	94
Figura 20	Curvas de crescimento de clones transfectantes de células C6, tratados ou não com atRA.....	97/98
Figura 21	Curvas de crescimento de populações transfectantes de células T98G, tratados ou não com atRA.....	101
Figura 22	Curvas de crescimento de populações transfectantes de células P19, tratados ou não com atRA.....	104
Figura 23	Avaliação da síntese de DNA de células C6, T98G e P19 e dos respectivos transfectantes, tratadas ou não com atRA.....	107
Figura 24	Avaliação da capacidade de crescimento em substrato semi-sólido de células C6, T98G e P19 e dos respectivos transfectantes, tratadas ou não com atRA.....	110

Figura 25	Avaliação da eficiência do protocolo de enriquecimento da população polimórfica de C6 para células resistentes ao tratamento com atRA.....	114
Figura 26	Avaliação da sensibilidade de células C6 e dos clones resistentes ao tratamento com atRA, através de ensaio de crescimento em substrato semi-sólido.....	116
Figura 27	Avaliação da influência do tratamento prévio de células C6 e dos clones resistentes na capacidade de formação de colônias em meio semi-sólido.....	118
Figura 28	Curvas de crescimento em substrato sólido das células C6, ST1 e C6R, tratadas ou não com atRA.....	121
Figura 29	Densidade de saturação e tempo de dobramento de células C6, ST1 e C6R, tratadas ou não com atRA.....	122
Figura 30	Análise da capacidade tumorigênica de células C6 e C6R, através de injeção subcutânea em camundongos do tipo <i>nude</i>	124
Figura 31	Expressão relativa, em células C6 e C6R, de genes previamente descritos anteriormente como induzidos em células ST1 pelo tratamento com atRA.....	126/127/128/129/130
Figura 32	Expressão relativa de receptores de retinóides em células C6 e C6R, tratadas ou não com atRA.....	132/133/134/135/136/137
Figura 33	Expressão relativa de proteínas de ligação de ácido retinóico, CRABP-1 e CRABP-2, em células C6 e C6R, tratadas ou não com atRA.....	140/141

B) Tabelas

Tabela 1	Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.....	46
Tabela 2	Resultados da análise da expressão de Cyp26B1 em células ST1 de glioma de rato, não tratadas (controle) e tratadas com atRA.....	80
Tabela 3	Resultados da análise da expressão de Cyp26A1 em linhagens celulares de glioblastoma humanos, não tratadas (controle) e tratadas com atRA.....	83
Tabela 4	Resultados da análise da expressão de Cyp26B1 em linhagens celulares de glioblastoma humanos, não tratadas (controle) e tratadas com atRA.....	85
Tabela 5	Tempo de dobramento e densidade de saturação em substrato sólido de populações transfectantes de células T98G, tratados ou não com atRA.....	99
Tabela 6	Tempo de dobramento e densidade de saturação em substrato sólido de populações transfectantes de células P19, tratados ou não com atRA.....	102
Tabela 7	Tempo de dobramento e densidade de saturação de células P19 parental e das populações transfectantes, tratadas ou não com atRA.....	103
Tabela 8	Análise da síntese de DNA de células C6, T98G e P19, estavelmente transfectadas com vetor de expressão de Cyp26B1 e com o respectivo vetor vazio.....	108
Tabela 9	Avaliação da capacidade de crescimento em substrato semi-sólido de células C6, T98G e P19, estavelmente transfectadas com vetor de expressão de Cyp26B1 e com o respectivo vetor vazio.....	111
Tabela 10	Eficiência de plaqueamento em substrato semi-sólido de células C6 parental e da população policlonal resistente ao tratamento com atRA.....	114

Tabela 11	Eficiência de plaqueamento em substrato semi-sólido dos clones resistentes ao tratamento com atRA.....	116
Tabela 12	Avaliação da influência do tratamento prévio de células C6 e dos clones resistentes na formação de colônias em substrato semi-sólido.....	119
Tabela 13	Resultados da análise da expressão de Cyp26B1 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	126
Tabela 14	Resultados da análise da expressão de Eya2 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	127
Tabela 15	Resultados da análise da expressão de Gem na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	128
Tabela 16	Resultados da análise da expressão de Okl38 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	129
Tabela 17	Resultados da análise da expressão de Spi3 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	130
Tabela 18	Resultados da análise da expressão de RAR α na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	132
Tabela 19	Resultados da análise da expressão de RAR β na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	133
Tabela 20	Resultados da análise da expressão de RAR γ na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	134
Tabela 21	Resultados da análise da expressão de RXR α na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	135

Tabela 22	Resultados da análise da expressão de RXR β na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	136
Tabela 23	Resultados da análise da expressão de RXR γ na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	137
Tabela 24	Resultados da análise da expressão de CRABP-1 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	140
Tabela 25	Resultados da análise da expressão de CRABP-2 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.....	141

III. ABREVIATURAS

AMPC	Monofosfato de Adenosina Cíclico
ATP	Trifosfato de Adenosina
atRA	Ácido retinóico <i>all-trans</i>
cDNA	DNA complementar
CRABP	<i>Cellular Retinoic Acid Binding Protein</i>
CRBP	<i>Cellular Retinoid Binding Protein</i>
CYP	Citocromo P450
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno bisoxietilenonitrilo tetracético
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FGFR	Receptor de FGF
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC	Glicocorticóide
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
IL	Interleucina
LB	Meio de Luria-Bertani
MMP	Metaloproteinases de matriz
MOPS	Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfônico
nm	nanômetro
NTC	Non template control – Controle negativo
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P450RAI	<i>Cytochrome P450 Retinoic Acid-Inducible</i>
pb	Pares de Bases
PBSA	Solução salina tamponada pH 7,2
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor de PDGF
PLP	<i>Proteolipid Protein</i>
RA	Ácido retinóico
RALDH	<i>Retinaldehyde Dehydrogenase</i>
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>

RARE	<i>Retinoic Acid Responsive Element</i>
RBP	<i>Retinoid Binding Protein</i>
RDA	<i>Representational Difference Analysis</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcrição reversa – Reação de polimerase em cadeia
RXR	<i>Retinoid-X Receptor</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SSC	Solução salina contendo citrato de sódio, pH 7,0
SSH	<i>Subtractive Suppressive Hybridization</i>
SSPE	Solução salina contendo sódio, fosfato e EDTA, pH 7,0
SPI	Inibidor de serina protease
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA, pH 7,5
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TCA	Ácido Tricloroacético
TE	Tampão Tris-EDTA, pH 8,0
TGF	Fator de crescimento transformante
TGFbR	Receptor de TGF beta
UTR	<i>"Untranslated region"</i> – Região não-traduzida
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde

III RESUMO

Os gliomas representam o tipo de tumor primário mais comum do sistema nervoso central. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas e de radioterapia e nos protocolos de quimioterapia, não há tratamento eficiente disponível.

O ácido retinóico na forma *all-trans* (atRA) é um agente anti-proliferativo utilizado para o tratamento de alguns tipos de lesões pré-malignas e tumores, como a leucemia promielocítica. Entretanto, sua utilização no tratamento clínico de tumores sólidos, incluindo os gliomas, é limitada, devido ao rápido desenvolvimento de resistência aos efeitos anti-tumorais do atRA.

Para endereçar este problema, foi proposto: a) clonar e analisar a função de *cyp26b1* de rato, uma enzima da família dos citocromos P450 envolvida na metabolização de ácido retinóico, previamente descrito em nosso laboratório como potencialmente envolvido na resposta de células de glioma ao tratamento com atRA; b) gerar e caracterizar uma variante da linhagem celular C6 de glioma de rato resistente aos efeitos anti-proliferativos de atRA.

O cDNA de *cyp26b1* de rato, até então desconhecido, foi amplificado, clonado e seqüenciado com sucesso. A seqüência protéica correspondente é conservada e agrupa-se no dendrograma com outras proteínas Cyp26B1, mesmo de organismos distantes como *zebrafish*, em detrimento de outras proteínas parálogas da família Cyp26. *Cyp26b1* é fortemente induzida por atRA em células de glioma de rato e humano, de forma dose-dependente. Embora seja expresso em amostras de cérebros humanos normais e de glioma, não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes graus de matlignidade tumoral, ou em comparação com cérebro normal.

A super-expressão de *cyp26b1* de rato através de transfecção estável de células de glioma de rato e humano, bem como de células P19 de teratocarcinoma de camundongo, não alterou significativamente as características de crescimento celular, tanto em substrato sólido quanto em substrato semi-sólido.

O tratamento prolongado de células C6 de glioma de rato com atRA levou à obtenção de uma população policlonal resistente aos efeitos anti-proliferativos de atRA, a partir da qual uma linhagem celular clonal resistente foi isolada com sucesso. Esta variante clonal, denominada linhagem celular C6R, apresenta inibição de crescimento por atRA diminuída, quando comparada com a linhagem celular C6 parental e com a variante ST1. Além disso, esta variante também mostrou uma tendência, embora não significativa estatisticamente, de gerar tumores maiores quando injetados no subcutâneo de camundongos do tipo *nude*.

A expressão de genes previamente descritos como induzidos pelo tratamento com atRA em células ST1 é fortemente inibida na linhagem celular C6R. Além disso, menor expressão de $RAR\beta$, $RAR\gamma$ e CRABP-1 foi também observada em células C6R, enquanto que expressão muito maior de $RXR\gamma$ e CRABP-2 foi encontrada nas células resistentes a atRA, em comparação com as células C6 parentais.

Como conclusões gerais deste trabalho, foi proposto que *cyp26b1* parece estar envolvido no metabolismo e detoxificação de atRA e parece não ser efector da inibição de crescimento induzida por atRA, nem estar relacionado com a resistência de células de glioma ao tratamento com atRA. Por outro lado, o isolamento e caracterização de uma linhagem celular resistente ao tratamento com atRA sugere que a resistência está relacionada à expressão diferencial de receptores de retinóides e de proteínas de ligação ao ácido retinóico.

IV ABSTRACT

Gliomas are among the most common primary tumors of the central nervous system. Despite the advances in surgical and radiotherapy procedures and chemotherapy protocols, efficient treatment is still not available.

Retinoic acid is a anti-proliferative agent used for treatment of a number of pre-malignant lesions and tumors, as promyelocytic leukemia. However, its clinical use in treatment of solid tumors, including gliomas, is impaired by the rapid development of resistance to the anti-tumoral effects of atRA.

In order to address this problem, we proposed: a) to clone and analyze the role of rat *cyp26b1*, a member of cytochrome P450 superfamily involved in the metabolization of retinoic acid, which has previously been described by our group as being potentially involved in the response of glioma cells to retinoic acid treatment; b) to generate and characterize a variant of rat C6 glioma cell line resistant to anti-proliferative effects of atRA.

The previously unknown cDNA of rat *cyp26b1* was successfully amplified, cloned and sequenced. The protein is conserved and clustered in dendrograms with other *cyp26b1* proteins, even from distant organisms as zebrafish, in detriment of other *cyp26* paralogs. *Cyp26b1* is strongly induced by atRA in rat and human glioma cells, in a dose-dependent fashion. Although expressed in human normal brains and glioma samples, no significant differences were found among different tumor grades nor comparing to normal brain.

Stable-transfection and overexpression of rat *cyp26b1* in rat and human glioma cell lines, as well as P19 mouse teratocarcinoma cell line,

did not significantly modified cell growth properties, either on solid or semi-solid substrates.

Prolonged treatment of C6 rat glioma cell line with atRA leads to isolation of an atRA-resistant polyclonal cell population, from which a resistant clonal cell line was successfully isolated. This clonal variant, named C6R cell line, displayed diminished growth inhibition by atRA compared to the parental C6 cell line and the variant ST1 cell line. In addition, this variant also showed a trend, although not quite statistically significant, to generate larger tumors when xenografted s.c. into nude mice.

Expression of genes previously described as being induced by atRA-treatment in ST1 cells is strongly impaired in the C6R resistant cell line. In addition, lower expression of RAR β , RAR γ and CRABP-1 was also observed in C6R cells, whereas a much higher expression of RXR γ and CRABP-2 was found in the resistant cells when compared to the parental C6 cells.

As general conclusions of this work, we found that *cyp26b1* is more likely to be involved in primary atRA metabolism and detoxification and does not seem to be an effector of atRA-induced cell growth arrest nor to be related to the resistance of glioma cells to atRA treatment. On the other hand, isolation and characterization of an atRA-resistant cell line suggests that atRA resistance is more likely to be due to differential expression of retinoid receptors and retinoic acid binding proteins.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As células da glia e os gliomas

Em 1846, Virchow reconheceu, pela primeira vez, um componente intersticial frágil e não-nervoso constituído por células estreladas ou alongadas, morfologicamente diferente de neurônios, às quais ele denominou neuroglia (do inglês, *nerve glue*, ou “cola de nervos”). Pela definição clássica, as células gliais diferem dos neurônios principalmente por não apresentarem contatos sinápticos e também por manterem, em algum grau, a capacidade de proliferação durante toda a vida, particularmente em resposta a danos.

No início do século XX, foram reconhecidos tipos celulares distintos, que atualmente são classificados em três grandes grupos de células gliais: (i) células gliais verdadeiras ou macroglia, composto por astrócitos e oligodendrócitos, de origem ectodérmica; (ii) microglia, de origem mesodérmica; e (iii) células ependimais, também de origem ectodérmica, que têm como precursores os mesmos da macroglia.

A formação das células gliais, genericamente denominado gliogênese, ocorre através de diferenciação de células pluripotentes do sistema nervoso central em precursores restritos de glia, os glioblastos, que são capazes de se diferenciar em todos os tipos de células gliais. Os glioblastos, por sua vez, diferenciam-se principalmente em dois tipos celulares: em precursores de astrócitos, que dão origem aos astrócitos tipo I; e em células denominadas O2A, que dão origem aos astrócitos tipo II e oligodendrócitos.

Atualmente, uma função dinâmica é atribuída às células gliais, em contrapartida à função de sustentação do tecido nervoso atribuído no passado. A cada tipo celular é inferida uma função específica. Os astrócitos representam aproximadamente 50% das células da glia e estão associados à sustentação e compactação de outros elementos do sistema nervoso central (SNC), ao processo de reparo após uma situação de trauma e em mecanismos de transporte de metabólitos.

Os oligodendrócitos correspondem a aproximadamente 40% das células gliais e estão envolvidos no processo de mielinização do sistema nervoso central. Este tipo celular apresenta baixa capacidade regenerativa, sendo que dano causado a alguns oligodendrócitos pode provocar uma área considerável de desmielinização primária. A função das células da microglia é ainda relativamente obscura, mas é sabido que as mesmas encontram-se normalmente em estado de repouso; é proposto que, em situações específicas, como durante algumas doenças envolvendo alterações no SNC, as células tornem-se bastante móveis e ativas, com atividade macrofágica.

1.1.1 Glioma

Os tumores de células da neuroglia, genericamente denominados gliomas, representam o tipo de tumor primário mais comum do SNC e são caracterizados por rápido crescimento com invasão do parênquima cerebral (revisto em KONDO et al, 2003).

A transformação maligna de células gliais é um processo complexo, ainda não completamente compreendido, onde a inativação de genes supressores de tumor e a ativação e/ou super-expressão de oncogenes

são passos fundamentais, em conjunto com anormalidades na progressão do ciclo celular, alterações nas vias de transdução de sinais e angiogênese.

A classificação patológica dos gliomas é feita considerando similaridades das células tumorais com células gliais maduras não-neoplásicas, embora seja incerto se os gliomas são originados a partir de células gliais maduras ou células progenitoras neuroectodérmicas. Em geral, os gliomas apresentam muitas características de células precursoras, como a expressão de marcadores expressos durante o desenvolvimento e alta capacidade de migração e invasão (MAHER et al, 2001).

De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde, as três classes principais são astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas, classificados histologicamente segundo similaridades com células astrocíticas, oligodendrocíticas e de características mistas. A análise da região mais maligna dos tumores permite a graduação em uma escala crescente de malignidade, de acordo com quatro características principais: atipia nuclear, número de células em mitose, proliferação microvascular e necrose.

Os mais freqüentes tipos de gliomas são os astrocitomas, que em ordem crescente de anaplasia são denominados astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma multiforme (GBM - grau IV). A classificação para oligodendrogliomas e oligoastrocitomas mistos inclui dois graus: baixo grau (grau II) e anaplásico (grau III), mas a validade desta classificação ainda é discutível (revisto em BEHIN et al, 2003).

Os gliomas de grau III e IV são muito agressivos, altamente invasivos, neurologicamente destrutivos, normalmente apresentando

regiões de invasividade e hemorragia, sendo considerados entre os mais mortais dos tumores humanos. A sobrevida média do paciente com GBM é de menos de um ano, mesmo após duas décadas de considerável progresso nas técnicas cirúrgicas, na quimioterapia e radioterapia (KONDO et al, 2004). Embora os gliomas raramente formem metástases em locais distantes do organismo, a natureza invasiva do tumor torna bastante difícil a retirada do tumor com margens livres e, não raro, há recorrência do tumor após a cirurgia. A combinação de radioterapia e quimioterapia após a remoção cirúrgica do tumor aumenta consideravelmente a sobrevida do paciente, embora ainda não exista uma terapia realmente efetiva para o tratamento deste tipo de tumor.

1.1.2 Células C6 e ST1 como modelos experimentais

As células C6 de glioma de rato foram isoladas e estabelecidas em cultura a partir de tumores induzidos em ratos Wistar-Furth por exposição a N,N'-metilnitrosouréia (BENDA et al, 1968) e originam tumores morfológicamente similares a glioblastomas multiformes (GBM) quando injetados em cérebros de ratos neonatos (AUER et al, 1981). Esta linhagem é considerada um modelo experimental bastante útil para o estudo do crescimento e dos processos de invasão, migração e angiogênese de glioblastomas (revisto em GROBBEN et al, 2002).

Hormônios glicocorticóides são capazes de promover alteração morfológica e inibição de crescimento em células C6. O estudo do mecanismo de ação de hormônios glicocorticóides e de fatores de crescimento sobre o controle da proliferação tumoral levou o grupo da Dra. Mari Sogayar a isolar variantes da linhagem C6, as quais apresentam diferenças morfológicas e variação na sensibilidade ao tratamento com

hormônios glicocorticóides (ARMELIN & ARMELIN, 1983; ARMELIN et al, 1983). Dentro deste contexto, as variantes ST1 e P7 são particularmente interessantes, por suas características hiper-responsiva e resistente ao tratamento com hormônios glicocorticóides, respectivamente.

A variante ST1 caracteriza-se por apresentar alterações fenotípicas marcantes quando tratada com doses fisiológicas de hormônios glicocorticóides. Dependência de soro e ancoragem para o crescimento, restauração da composição e arquitetura celular e incapacidade de formação de tumor em camundongos imunodeprimidos do tipo *nude* são as principais características apresentadas por células ST1 quando as mesmas são submetidas ao tratamento com glicocorticóides (ARMELIN & ARMELIN, 1978; ARMELIN & ARMELIN, 1983; ARMELIN et al., 1983).

Quando tratadas com ácido all-trans retinóico (atRA), as células C6 também apresentam alteração morfológica e inibição de crescimento de aproximadamente 60 a 90% em monocamada (FISHER et al, 1987) e diminuição do tamanho de tumores provocados pela injeção de células no córtex de ratos (RODTS & BLACK, 1994). O achatamento celular e a inibição de crescimento em monocamada são acompanhados pela indução da expressão da proteína proteolipídica (PLP) e da glicoproteína associada à mielina, marcadores conhecidos de diferenciação de oligodendrócitos (ZHU et al, 1992, LÓPEZ-BARAHONA et al, 1993), sugerindo que o tratamento de C6 com atRA promove a diferenciação das mesmas a oligodendrócitos. Entretanto, o tratamento destas mesmas células com AMPc resulta em expressão do marcador de astrócitos GFAP, sugerindo que a linhagem C6 representa um tumor de células O2A, capazes de diferenciação tanto em astrócitos quanto em oligodendrócitos (ZHANG et al, 2001). A variante ST1 responde de forma semelhante ao tratamento com atRA, apresentando forte inibição de crescimento em monocamada e

em suspensão e alterações morfológicas marcantes, promovendo uma profunda alteração fenotípica de células acentuadamente tumorais para células com características de células normais (BENGTSON, 2002).

Devido a sua alta responsividade ao tratamento com hormônios glicocorticóides e atRA, a variante ST1 vem sendo utilizada, em nosso laboratório, para o estudo do mecanismo de ação destas substâncias e das bases moleculares associadas com a reversão fenotípica, através da investigação dos genes diferencialmente expressos entre células tratadas e não-tratadas com estes agentes (Bengtson, 2002, VALENTINI et al, 1994; SASAHARA, 1995; VALENTINI & ARMELIN, 1996; VEDDOY & SOGAYAR, 2002).

Os efeitos de ácido retinóico sobre células ST1 foram analisados, em uma primeira etapa, através da identificação de genes regulados por este agente diferenciador. A construção de bibliotecas de subtração enriquecidas para genes induzidos por ácido retinóico, através das técnicas de SSH (*Subtractive Suppressive Hybridization*) e RDA (*Representational Difference Analysis*), permitiu a clonagem e identificação de ESTs representantes de 11 genes regulados por ácido retinóico: p450rai-2, spi3, vegf, cdv-3a, okl38, eya2, gem, p21, retSDR1, aldose redutase-like e um gene novo, com 61% de identidade com uma fosfatase de galinha (BENGTSON, 2002). Estes genes estão relacionados com os efeitos do ácido retinóico sobre o crescimento e diferenciação dos gliomas, portanto o estudo funcional destes genes é fundamental para a compreensão do mecanismo de ação desta substância, além da possibilidade de revelar novos alvos para futuro desenvolvimento de terapia gênica e de novas drogas anti-tumorais.

1.2 Os retinóides e o ácido retinóico

Os retinóides constituem uma classe de mais de 3.000 substâncias naturais e sintéticas com estrutura derivada da vitamina A. Estes compostos são essenciais à vida e têm papéis importantes no desenvolvimento embrionário, formação de gametas, desenvolvimento ósseo e cardíaco, visão, apoptose, proliferação e diferenciação celular (DELUCA & ZILE, 1975, SUMMERBELL & MADEN, 1990). Além disso, os retinóides estão envolvidos em muitos processos no desenvolvimento e maturação do SNC (SUCOV & EVANS, 1995).

O mecanismo pelo qual os retinóides, em particular o ácido retinóico, são capazes de exercer seus efeitos reside em sua habilidade de regular a expressão gênica através de um evento mediado por receptores nucleares (revisto em CHAMBON, 1996).

1.2.1 Retinóides e câncer

A capacidade dos retinóides de modular a proliferação e diferenciação de células pré-neoplásicas e neoplásicas é uma propriedade biológica importante destas moléculas. Estudos utilizando modelos experimentais celulares e animais, levantamentos epidemiológicos e clínicos mostram evidências de que o ácido retinóico e alguns de seus derivados sintéticos constituem agentes farmacológicos importantes na terapia e quimioprevenção de tumores (revisto em SOPRANO et al, 2004).

A conexão entre os retinóides e o desenvolvimento de tumores ocorreu logo após o descobrimento da vitamina A e sua estrutura química. Nas décadas de 1950 e 1960, vários estudos demonstraram que a deficiência de vitamina A induz um aumento no número de tumores

espontâneos e quimicamente induzidos em animais. Estes estudos foram seguidos por outros que demonstraram que a adição de doses farmacológicas desta vitamina à dieta pode diminuir a incidência de tumores quimicamente induzidos em animais. De fato, estudos epidemiológicos sugerem uma correlação inversa entre a ingestão diária de vitamina A ou beta-caroteno e o desenvolvimento de vários tumores, incluindo pulmão, cabeça e pescoço e mama (revisto em NILES, 2004).

Nas últimas décadas, um grande progresso foi alcançado em estudos básicos e clínicos dos efeitos dos retinóides sobre tumores. Em termos terapêuticos, o ácido *all-trans* retinóico é conhecidamente eficaz no tratamento de leucemia promielocítica aguda envolvendo a translocação t(15;17) (HUANG et al, 1988). Além disso, o uso de ácido *13-cis* retinóico combinado com interferon- α tem se mostrado eficaz no tratamento de tumores avançados cutâneos e cervicais. Estudos pré-clínicos e clínicos mostram, ainda, que os retinóides podem inibir a progressão de certas lesões pré-neoplásicas, como as de cabeça e pescoço, pulmão e mama, para lesões malignas (revisto em ALTUCCI & GRONEMEYER, 2001).

Os retinóides também exercem efeitos anti-tumorais em linhagens celulares transformadas, *in vitro*, quando as mesmas são injetadas em animais e em tumores quimicamente induzidos. Na maioria das linhagens celulares sensíveis ao tratamento, o ácido retinóico resulta em inibição do crescimento celular, diminuição da síntese de DNA, alterações morfológicas, aumento no tempo de dobramento e redução da formação de colônias em ensaios de crescimento em suspensão de agarose (SOPRANO et al, 2004).

Clinicamente, sua utilização como agentes anti-neoplásicos ainda é limitada a apenas poucos tipos de tumores, principalmente devido ao rápido desenvolvimento de resistência ao tratamento. Entretanto,

sinergismo entre retinóides e outros agentes utilizados em quimioterapia anti-tumoral tem sido mostrada em diversos trabalhos. A pequena incidência de efeitos colaterais graves, comparada com aquela obtida com outras drogas anti-tumorais, e a possibilidade de ação sinérgica com as mesmas indica a possibilidade de utilização de retinóides em terapias anti-tumorais combinadas (revisto em ALTUCCI et al, 2001).

1.2.2 Metabolismo de retinóides

O estoque de retinóides encontrado nos organismos animais é originado da dieta na forma de carotenóides ou retinóides pré-formados, uma vez que os mesmos não são capazes de sintetizar retinóides *de novo*. Estas substâncias são submetidas a uma série de conversões metabólicas, no lúmen e mucosa intestinal, que resultam na conversão dessas moléculas a retinol. O retinol, absorvido junto com outros lipídios pela mucosa intestinal, é empacotado na forma de retinil-ésteres nos quilomícrons nascentes, sendo secretados para o sistema linfático.

O conteúdo dos quilomícrons é absorvido principalmente pelo fígado, mas também pela medula óssea. No fígado, as células do parênquima e as células estreladas são as principais responsáveis pelo armazenamento e metabolismo de retinóides. Além destas funções, as células estreladas são responsáveis pela síntese e secreção de Proteína de Ligação de Retinóides – RBP (*Retinol Binding Protein*). Esta proteína é formada por uma única cadeia polipeptídica com peso molecular de aproximadamente 21 kDa, apresentando um único sítio de ligação para retinol.

FIGURA 1: Metabolismo e modo de ação dos retinóides.

Durante o metabolismo e armazenamento hepático, os retinil-ésteres são hidrolisados a retinol, que, por sua vez, pode sofrer novas reações de esterificação. Parte dos retinóides ingeridos na dieta, ou o retinol não-esterificado, é conjugado a RBP para a distribuição para os tecidos, sendo especialmente absorvido por tecidos dependentes de retinóides, como retina, pele e outros epitélios.

O fluxo de retinol do plasma para as células é determinado pela concentração de retinol livre no plasma. O mecanismo pelo qual o retinol é dissociado do complexo RBP e entra nas células ainda não é bem

compreendido. Há algumas evidências da existência de receptores de RBP na membrana celular (BLOMHOFF et al., 1992), mas este achado ainda é bastante controverso, pois retinol livre atravessa facilmente a membrana plasmática.

No interior das células, os retinóides, substâncias altamente hidrofóbicas e lábeis, encontram-se ligados a proteínas celulares ligantes de retinóides. Estas proteínas são denominadas de acordo com os ligantes naturais mais comumente associados às mesmas; CRBP – *Cellular Retinol-Binding Protein*, I e II, que se liga preferencialmente ao retinol; e CRABP – *Cellular Retinoic Acid Binding Protein*, I e II, cujo ligante fisiológico é o ácido retinóico. Estas proteínas são membros de uma grande família de proteínas de ligação de compostos hidrofóbicos, que também incluem muitas proteínas ligantes de ácidos graxos. Embora as duas proteínas apresentem alto grau de homologia, elas diferem nos padrões de expressão temporal e espacial, sugerindo que cada proteína tenha diferentes funções.

Uma vez que o retinol é absorvido pelas células, é oxidado, primeiramente, a retinaldeído e, então, a ácido retinóico. Membros da família das álcool desidrogenases citossólicas de cadeia média catalisam a primeira reação e a conversão de retinaldeído a ácido retinóico é catalisada por retinaldeído desidrogenases – RALDHs 1, 2 e 3.

A degradação do ácido retinóico nas células é realizada através da ação de enzimas da super-família dos citocromos P450, denominadas P450RAI (*cytochrome P450 Retinoic Acid Inducible*) ou Cyp26, que degradam o ácido retinóico a formas mais polares inativas (ROSS et al, 2000; NIEDERREITHER et al, 2002). A concentração crítica de RA é determinada pela presença e atividade de RALDHs (para produção de RA) e P450RAIs (para degradação de RA). Portanto, estas duas famílias de

enzimas apresentam papéis fundamentais em muitos eventos mediados por retinóides, especialmente durante a embriogênese, regulando, de maneira bastante fina, a concentração e localização de RA no embrião em desenvolvimento (ZHAO et al, 2005).

1.2.3 Receptores de retinóides

Os receptores de ácido retinóico são representados por membros da grande família dos receptores heterodiméricos não-esteroídicos. Estes receptores estão agrupados em duas famílias, RAR (*Retinoic Acid Receptor*) e RXR (*Retinoid-X Receptor*). Cada família apresenta, ainda, três tipos de receptores diferentes – alfa, beta e gama – os quais, por sua vez, apresentam diversas isoformas, geradas por utilização de diferentes promotores e *splicing* alternativo. Os membros de ambas as famílias são ativados por ácido retinóico na forma 9-cis, enquanto que a forma *all-trans* ativa apenas receptores da classe RAR (revisto em CHAMBON, 1996).

Os RARs e os RXRs apresentam a estrutura modular conservada dos receptores nucleares. Baseado na homologia entre eles e com outros membros da super-família dos receptores nucleares, a sequência de aminoácidos dos RARs e RXRs pode ser dividida em seis regiões, denominadas com letras de A a F. As regiões A e F, correspondentes às regiões N e C-terminal das proteínas, são as regiões que apresentam menor grau de conservação; a região A, assim como a região B, parece estar relacionada com a transativação, uma vez que a deleção destas regiões resulta em perda da capacidade dos receptores de induzir a expressão de genes-repórter. A região central C, contendo 66 aminoácidos com conservação acima de 90%, contém dois motivos dedo de zinco (*zinc finger*), correspondendo à região de ligação com o DNA. A região E,

contendo 220 aminoácidos, também é altamente conservada entre os receptores da mesma classe. Esta região é funcionalmente complexa, pois contém o domínio de ligação de ácido retinóico, a região de ativação transcricional dependente de ligante e a superfície de dimerização. As funções das regiões D e F ainda não estão estabelecidas (CHAMBON, 1996).

Os receptores da família RAR combinam-se com receptores da família RXR, formando heterodímeros funcionais, que se ligam a seqüências específicas na região promotora dos genes, denominada RAREs (*Retinoic Acid Responsive Elements*), onde funcionam como moduladores da expressão gênica, de acordo com a presença ou ausência de seu ligante. A seqüência consenso dos RAREs é caracterizada por repetições do motivo (A/G)GGTCA, separados por um (DR1 - como no promotor de CRABPII), dois (DR2 - promotor de CRABPI) ou cinco nucleotídeos (DR5 - promotor de RAR β) (revisto em SUN & LOTAN, 2002).

Na ausência de ácido retinóico, o receptor recruta co-repressores transcricionais com atividade de histona desacetilase. A desacetilação do complexo de histonas resulta na condensação da cromatina e repressão da transcrição. Por outro lado, a ligação do agonista resulta em alterações conformacionais no receptor, deslocando os repressores e recrutando proteínas com atividade intrínseca de histona acetilase. O resultado funcional é a acetilação do complexo de histonas e relaxamento da cromatina, permitindo a montagem do aparato transcricional multiprotéico. Esses ativadores e repressores transcricionais são comuns a múltiplas vias de sinalização celulares, o que proporciona uma ligação direta entre as múltiplas vias de sinalização críticas na proliferação celular, diferenciação e apoptose, além de uma relação importante entre estas vias e a estrutura da cromatina dos genes alvo (WEI, 2003).

Além de combinar-se com receptores da família RAR, os receptores RXR podem ainda combinar-se com membros de outras classes de receptores nucleares, como receptores de hormônio tireoidiano e de vitamina D. De fato, os receptores da família RXR podem associar-se com 11 classes de receptores nucleares diferentes (revisto em BLUMBERG & EVANS, 1998). A formação de heterodímeros RAR/RXR permite que, após a ativação de RAR pela ligação de ácido retinóico, ocorra uma mudança conformacional que permite a ligação de RXR com seu ligante, o que não ocorre quando RXR combina-se com receptores nucleares de outras classes. Quando ambos os receptores estão ativados pelos seus ligantes, há um efeito sinérgico na transcrição do gene alvo (SHINOHARA et al, 1999).

1.2.4 Genes com expressão regulada por ácido retinóico

Os efeitos pleiotrópicos dos retinóides devem-se à modulação da transcrição de diversos genes importantes para vários processos biológicos. Nas últimas décadas, mais de 500 genes foram descritos como moléculas-alvo, com expressão regulada por ácido retinóico.

Em alguns casos, a regulação é direta, ou seja, a transcrição gênica é modulada diretamente pela ligação do receptor dimérico ao elemento responsivo localizado na região promotora do gene. Em outros casos, a regulação é indireta, refletindo a ação de fatores de transcrição intermediários.

Vários estudos têm sido realizados em diferentes modelos de estudos para identificar os genes cuja expressão é regulada por retinóides,

em particular o ácido retinóico na sua forma *all-trans* (YANG et al, 2003, LEE et al, 2002, LI et al, 2003, MERRILL et al, 2004).

Entre os genes conhecidos como diretamente induzidos por atRA, devem ser destacados os próprios receptores da classe RAR (α , β e γ), RBP2, CRABP-2 e alguns membros da família de fatores de transcrição Hox. Uma grande quantidade de genes tem sua expressão regulada indiretamente por ácido retinóico durante vários processos fisiológicos, dentre os quais devem ser destacados vários fatores de crescimento (FGF, PDGF, VEGF), interleucinas (IL-2, IL-9), proteínas de matriz extracelular (colágenos tipo 1, 4 e 7) e algumas metaloproteinases de matriz (MMP-1, MMP-3, MMP-9). Entretanto, para a maior parte dos genes, o mecanismo de regulação da expressão não é completamente conhecido. Dentro desta categoria, devem ser citados oncogenes (*myc*, *fos*, *jun*) e vários receptores para fatores de crescimento (FGFR, PDGFR, TGFbR).

Dentre os genes cuja expressão é regulada por ácido retinóico, devem ser destacados genes cujo produto atua diretamente na sinalização de ácido retinóico, dentre eles membros da família de receptores RAR, proteínas de ligação da família RBP, CRABP e enzimas metabolizadoras de ácido retinóico da família Cyp26. A regulação, principalmente transcricional, da expressão destas proteínas gera mecanismos de controle dos níveis adequados de ácido retinóico dentro das células e permite a resposta adequada de cada tipo celular à presença desta substância (revisto em Ross, 2003).

1.3 Citocromos P450

A superfamília dos citocromos P450 é constituída de um conjunto de proteínas hemínicas altamente diversificadas. Estas proteínas foram

descobertas em 1958, pela absorção máxima de luz a 450 nm, o que ocorre devido à complexação *in vitro* do grupo heme com duas moléculas exógenas de dióxido de carbono.

Em bactérias, os citocromos P450 são solúveis e formados por uma cadeia de aproximadamente 400 aminoácidos. As enzimas eucarióticas estão normalmente ligadas às membranas mitocondrial interna e do retículo endoplasmático, através de uma região N-terminal hidrofóbica e de outras interações menos compreendidas.

A reação mais comumente catalisada por citocromos P450 é a hidroxilação de substratos lipofílicos. Conseqüentemente, as proteínas são freqüentemente denominadas hidroxilases; entretanto, este tipo de enzima podem catalisar uma grande diversidade de reações, incluindo N-oxidação, sulfoxidação, epoxidação, N-, S- e O-dealquilações, peroxidação, desaminação e desalogenação (WHITE & COON, 1980; COON, 2005).

A hidroxilação é comumente catalisada através da adição de um átomo de oxigênio ao substrato, sendo que o outro átomo da molécula de O₂ contribui para a formação de uma molécula de água. Este é um processo bastante complexo e exige a doação de dois elétrons de um doador. O doador é diferente para as proteínas procarióticas e eucarióticas e, para as últimas, depende da localização do citocromo P450 na célula. Na membrana do retículo endoplasmático, NADPH citocromo P450 redutase é o doador de elétrons padrão, embora o citocromo b5 possa também participar da reação. Na mitocôndria, ferredoxina (adrenodoxina) e ferredoxina redutase (adrenodoxina redutase) formam uma curta cadeia de transporte de elétrons para o fornecimento dos mesmos. Os doadores bacterianos são de ambos os tipos (revisto em Meunier et al, 2004).

Mais de 1.500 seqüências de citocromos P450 já foram descritas. Para auxiliar na comunicação, uma nomenclatura padronizada tem sido adotada. Esta nomenclatura é baseada na evolução das seqüências protéicas, sendo que as seqüências similares são agrupadas em famílias e subfamílias. A base para a nomenclatura de citocromos P450 é a designação CYP. As famílias são designadas por um número e subfamílias por uma letra. Membros individuais em uma subfamília são numerados consecutivamente, de acordo com a comunicação ao comitê de nomenclatura. O primeiro citocromo P450 nomeado de acordo com estas regras foi designado CYP1A1. Quando este sistema foi estabelecido, blocos de nomes de famílias foram reservados para diferentes grupos taxonômicos: famílias 1-49 para animais, 51-69 para eucariotos inferiores, 71-99 para plantas e acima de 101 para bactérias. Esta alocação original foi muito restrita e teve que ser estendida a números com três algarismos: CYP301-499 para animais, CYP501-699 para eucariotos inferiores, CYP701-999 para plantas e as bactérias permaneceram na faixa CYP101-299 (Nebert et al, 1987; Nebert et al, 1991; Nelson et al, 2004).

O número de P450s está constantemente aumentando, exceto em plantas, onde aparentemente o número exato foi atingido recentemente. Em abril de 2000, 513 seqüências de plantas eram conhecidas. Em maio de 2004, este número aumentou para 1.107. Para eucariotos, o número em maio de 2004 era de 1.513. Bactérias e eucariotos inferiores apresentavam aproximadamente 100 seqüências descritas em 2000, mas este número aumentou consideravelmente para mais de 1.000 com o seqüenciamento completo de genomas de organismos destas classes.

Em outubro de 2004, uma nova revisão dos citocromos P450 de rato foi iniciada e 108 seqüências foram identificadas nos bancos de dados de seqüências de nucleotídeos e proteínas. Algumas destas seqüências não

adotavam a nomenclatura padronizada para esta classe de enzimas (Nelson et al, 2004).

As funções de enzimas P450 são bastante variadas. Em mamíferos, elas são essenciais para o metabolismo de drogas, homeostase sanguínea, biossíntese de colesterol e metabolismo de esteróides. Elas são responsáveis por um grande número de doenças humanas (NEBERT & RUSSELL, 2002). Em plantas, estão envolvidas na síntese de fitohormônios, fitoalexina, pigmentos das pétalas de flores e, talvez, em centenas de funções desconhecidas. Em fungos, são responsáveis pela biossíntese de ergosterol e estão intimamente envolvidas na patogênese, por permitir a detoxificação de substâncias de defesa de plantas. P450s de bactérias também catalisam reações de síntese e catabolismo de antibióticos.

O fato dos citocromos P450 estarem fisicamente ligados a membranas dificultou a obtenção de estruturas cristalizadas de uma enzima representativa da família. A estrutura geral é globular, quase triangular, com a metade C-terminal, mais conservada, rica em α -hélices e a porção N-terminal mais rica em folhas β . O domínio conservado de P450 inclui um sítio de ligação do grupo heme, a aproximadamente 50 aminoácidos da extremidade C-terminal, normalmente representado por FXXGXXXCXG (revisto em Meunier et al, 2004).

1.4 Citocromos P450 Induzidos por Ácido Retinóico – P450RAI ou Cyp26

A família dos citocromos P450 induzidos por ácido retinóico – P450RAI ou CYP26 – foi primeiramente descrita em humanos por White e colaboradores, em 1996 (WHITE et al., 1996; WHITE et al, 1997). Antes

disso, alguns trabalhos indicavam a importância dos citocromos P450 na metabolização de retinóides, mas a atividade era atribuída a membros das famílias CYP 1 e 2, já conhecidas, ou a uma enzima genericamente denominada *retinoic acid 4-hydroxylase*.

Em 1999, Nelson descreveu a seqüência de um novo membro da família de P450RAI humano, a qual foi denominada P450RAI-2 ou CYP26B1, para diferenciar da seqüência já descrita, que passou a ser denominada P450RAI-1 ou CYP26A1. Esta descrição foi apenas com base em predições de programas computacionais, com base no rascunho do genoma humano disponível (NELSON, 1999). A predição foi confirmada através da clonagem dos transcritos humano a partir de cDNA de retina (WHITE et al., 2000) e de camundongo (MACLEAN et al, 2001). Em 2003, uma nova subfamília foi descrita, sendo denominada CYP26C1 (TAHAYATO et al., 2003; TAIMI et al., 2004).

As enzimas da família CYP26 são responsáveis pela metabolização de ácido retinóico a compostos mais polares, principalmente através da oxidação do carbono 4, formando os ácidos 4-oxo-retinóico e 4-hidroxi-retinóico, e também dos carbonos 3, 16 e 18, embora menos freqüentemente (CHITHALEN et al, 2002).

As enzimas CYP26A1 e Cyp26B1 exibem afinidade comparáveis a ácido retinóico; em ensaios de competição, foi demonstrado que, para ambas as enzimas, o ácido *all-trans* retinóico é o substrato preferencial, seguido pelo ácido retinóico nas formas 9-cis e 13-cis. A baixa afinidade por outros retinóides naturais, como retinaldeído e retinol, sugere que estes não são ligantes destes citocromos em condições fisiológicas (WHITE et al., 2000).

Embora a atividade enzimática dos CYP26s seja similar, a expressão dos mesmos segue padrões bastante distintos, tanto no desenvolvimento embrionário quanto em tecidos adultos, sugerindo que as enzimas possuam diferentes papéis fisiológicos. Cyp26A1 parece estar relacionado com a diferenciação do neuroepitélio cefálico, formação do tubo neural dorsal e do broto caudal. Para Cyp26B1, é proposto um papel importante na vascularização, formação dos brotos límbicos e diferenciação de elementos do cérebro posterior, especialmente do cerebelo. Cyp26C1 parece estar ligado com a formação e septação do coração (REIJINTJES et al, 2004).

A possibilidade de que condições patológicas como câncer possa envolver expressão aberrante de Cyp26A1 tem sido levantada em vários estudos. Expressão elevada desta enzima e atividade catabólica de atRA aumentada foi detectada em células de adenocarcinoma epitelial de mama (VAN HEUSDEN et al, 1998) e células derivadas de carcinoma de células escamosas de tumores de cabeça e pescoço (KLAASSEN et al, 2001). Além disso, a super-expressão de Cyp26A1 parece diminuir a sensibilidade de vários tipos celulares ao tratamento com substâncias pró-apoptóticas em combinação com atRA, através de mecanismo ainda não compreendido (OSANAI & PETKOVICH, 2005). Entretanto, o envolvimento de Cyp26B1 em processos patológicos não foi descrita por nenhum grupo.

1.5 Resistência ao tratamento com ácido retinóico

Evidências de estudos laboratoriais, pré-clínicos, epidemiológicos e fases iniciais de estudos clínicos sustentam fortemente o uso de retinóides na quimioprevenção e tratamento de tumores. Apesar do sucesso da terapia baseada em atRA para o tratamento de leucemia promielocítica

aguda, o promissor sucesso do uso de retinóides para o tratamento de uma enorme gama de outros tumores, em especial tumores sólidos, ainda não foi atingido. Além da restrição encontrada por qualquer terapia baseada em um único agente, a resistência intrínseca ou adquirida a este agente limita a atividade dos retinóides em protocolos de tratamentos clínicos. De fato, o rápido desenvolvimento de resistência aos retinóides praticamente inviabiliza a utilização desta classe de substâncias nos protocolos terapêuticos, com exceção de alguns tipos de tumores de pele (FREEMANTLE et al, 2003).

Devido à grande importância dos retinóides no tratamento de pacientes com leucemia, o mecanismo de resistência deste tipo de tumor ao tratamento tem sido intensivamente estudado.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o desenvolvimento da resistência: i) concentrações plasmáticas reduzidas após administração prolongada, devido ao aumento de metabolização hepática ou aumento do seqüestro intracelular pela proteína celular de ligação de ácido retinóico – CRABP; ii) aumento da metabolização da droga dentro das células-alvo; iii) seleção de células previamente resistentes dentro da massa tumoral; iv) ocorrência de mutações em genes cruciais para a resposta anti-tumoral; v) alteração da expressão de genes de resposta ao tratamento por inativação epigenética.

O metabolismo é um fator crucial na manutenção de níveis efetivos de ácido retinóico. Uma forte relação entre a indução do metabolismo e a resistência clínica progressiva ao tratamento com ácido retinóico foi demonstrada em pacientes com leucemia promielocítica aguda (MUINDI et al, 1992). A relação entre a sensibilidade ao tratamento com retinóides e o metabolismo de ácido retinóico parece ser bastante complexo, particularmente após a identificação das enzimas P450 induzidas por ácido

retinóico (ARMOSTRONG et al, 2005). É possível que o tratamento com atRA, por um longo período, leve à manutenção de níveis bastante elevados destas enzimas, levando as células à resistência ao tratamento com atRA (ZHANG et al, 2000).

Neste contexto, a utilização de modelos celulares para o estudo dos mecanismos de resistência dos tumores aos agentes quimioterápicos é de grande importância, uma vez que sistemas controlados resultam em um número restrito de variáveis. Algumas linhagens celulares tumorais já foram isoladas e descritas como sendo resistentes ao tratamento com ácido retinóico. Dentre elas, a maior parte corresponde a linhagens de leucemia (HL60R, NB4R2, NB4.306, UF-1), mas também foram descritas algumas linhagens de tumores mamários (MCF7, MDA-MB-231), câncer de cólon (HCT 166) e carcinoma escamoso de cérvix (SiHa).

O estabelecimento de uma linhagem celular de glioma resistente ao tratamento com ácido retinóico pode ser uma ferramenta extremamente importante para o estudo do papel de enzimas Cyp26, além de outros mecanismos que culminem com a resistência tumoral ao tratamento com retinóides. A compreensão destes mecanismos pode, em última instância, levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, estendendo os benefícios do tratamento anti-tumoral com atRA e/ou outros retinóides para os pacientes com tumores resistentes, dentre eles os gliomas dos mais variados graus de malignidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar as bases moleculares da ação anti-tumoral de atRA, através da utilização de técnicas de Genoma Funcional e da obtenção e caracterização de células resistentes ao tratamento com esta substância.

2.2 Objetivos específicos

- a) Clonar e sequenciar o novo transcrito Cyp26B1 de rato;
- b) Verificar o nível de expressão de membros da família Cyp26 em modelos celulares de glioma de rato e humano e em amostras de tumores humanos;
- c) Gerar construções plasmideais para expressão de Cyp26B1 em células de glioma de rato (C6, ST1) e humano (T98G) e células de teratocarcinoma de camundongo (P19) e investigar a função desta proteína na proliferação celular e na resposta ao tratamento com atRA;

Obter variante da linhagem C6 resistente aos efeitos anti-proliferativos de atRA e investigar as possíveis causas do fenótipo resistente.

3 RACIONAL

O ácido retinóico tem sido empregado com sucesso no tratamento de pacientes com leucemias, lesões pré-malignas e alguns tipos de tumores orais e cutâneos. Apesar disto, sua utilização na terapia anti-tumoral é bastante limitada, devido ao rápido desenvolvimento de resistência, especialmente no caso de tumores sólidos. As enzimas metabolizadoras de ácido retinóico da família Cyp26 têm sido apontadas como sendo importantes no processo de resistência tumoral a este tratamento. O estudo funcional de Cyp26B1 e a obtenção e caracterização de uma variante da linhagem C6 de glioma de rato resistente ao tratamento com atRA podem fornecer elementos importantes para o desenvolvimento de terapias anti-tumorais mais eficazes para o tratamento de gliomas humanos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Linhagens celulares

C6: linhagem de glioma de rato induzido quimicamente por metilnitrosouréia (ATCC#: CCL 107; BENDA et al, 1968)

ST1: clone derivado da linhagem ST1 de glioma de rato, hipersensível ao tratamento com hormônio glicocorticóide, obtida em nosso laboratório (ARMELIN *et al.*, 1982; 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* (ATCC#: CRL 1690; STEIN, 1979)

A172: linhagem derivada de glioblastoma multiforme humano, com crescimento independente de ancoragem e incapaz de formar tumores *in vivo* (ATCC#: 1620; GIARD et al, 1973)

P19: linhagem de teratocarcinoma embrionário de camundongo. Podem ser diferenciadas em neurônios e células similares a glia, quando tratadas com ácido retinóico, e em células similares a cardiomiócitos e células musculares esqueléticas, na presença de DMSO (ATCC#: CRL 1825)

U343-MG: linhagem celular de astrocitoma humano, deficiente em p16 (Ink4a) (DIRKS et al, 1997)

U343-MG-A: linhagem celular de astrocitoma humano, deficiente em p16 (Ink4a) (DIRKS et al, 1997)

U373-MG: linhagem celular de glioblastoma multiforme humano, altamente invasiva e capaz de formar tumores quando injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos imunodeprimidos do tipo nude (DE RIDDER et al, 1987).

U87: linhagem de astrocitoma humano – grau III, capaz de formar tumores quando injetada subcutaneamente no dorso de camundongos imunodeprimidos do tipo nude (astrocitoma anaplásico) (ATCC #: HTB-14; PONTEN & MACINTYRE, 1968)

HOG: linhagem celular de oligodendroglioma humano (POST & Dawson, 1992)

4.1.2 Soluções e meios de cultura para células de mamífero

Meio de cultura: DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Médium” - Gibco BRL - Life Technologies)

Soro fetal bovino (SFB): (Cultilab Materiais para Cultura de Células, Campinas, São Paulo)

Solução Salina: PBSA (“Phosphate Buffered Saline”, sem cálcio ou magnésio), solução salina tamponada pH 7,2, composta por NaCl a 140mM, KCl a 2,7mM, Na₂HPO₄ a 8mM e KH₂PO₄ a 1,5mM.

Tripsina: (ICN Pharmaceuticals Inc., Gibco Limited)

4.1.3 Plasmídeos

pBlueScript SK⁻: Vetor de clonagem, de alto número de cópias, com seleção branca/azul por α -complementação (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) (Figura 2).

FIGURA 2: Vetor de clonagem pBlueScript SK (-), Stratagene.

pENTR2B: Vetor de entrada do sistema Gateway, de alto número de cópias, contendo sítios de recombinação attL flanqueando os múltiplos sítios de clonagem e o gene tóxico *ccdB* para seleção positiva de recombinantes (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA) (Figura 3).

FIGURA 3: Vetor de entrada pENTR2B, do sistema Gateway (Invitrogen)

pDEST12.2: Vetor de expressão em células de mamífero do Sistema Gateway, de alto número de cópias, contendo sítios de recombinação attR flanqueando o gene de resistência a cloranfenicol e o gene tóxico *ccdB* (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA) (Figura 4).

FIGURA 4: Vetor de expressão em células de mamíferos pDEST12.2, do sistema Gateway (Invitrogen)

4.1.4 Meios de cultura para bactérias

Meio LB (Luria-Bertani): Triptona a 10g/L, extrato de levedura a 5g/L e NaCl a 10g/L, pH=7,5. Para o preparo de meio sólido em placas, adicionou-se Agar a 1,5g/L.

LB-ágar: meio LB contendo 15g/L de ágar.

Meio SuperBroth: Triptona a 32g/L, extrato de levedura a 20g/L, NaCl a 5g/L, pH=7,5.

Ampicilina: a solução estoque foi preparada a 100mg/ml, filtrada e estocada congelada, protegida da luz.

Kanamicina: a solução estoque foi preparada a 50mg/mL, filtrada e estocada congelada.

4.1.5 Isótopos radioativos

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

Solução de [^3H]-timidina: 5 $\mu\text{Ci/ml}$ de timidina radioativa; $2 \times 10^6\text{M}$ de timidina fria (Amersham Biosciences)

4.1.6 Reagentes

Ácido all-trans retinóico (atRA): (Sigma, St. Louis, USA)

Geneticina: (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA)

Higromicina B: (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA)

4.1.7 Soluções

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.*, 1999; Sambrook *et al.*, 1989).

Gel de agarose: agarose 0,8 a 2,0%, dependendo da aplicação; TAE 0,5x.

SSC 20x: NaCl 3M; citrato trissódico dihidratado 300mM; pH 7,0.

Solução de cloreto de cézio: cloreto de cézio 5,7M; acetato de sódio 25mM; pH 5,0.

Solução I para lavagem de membrana de Northern blot: SSC 2x; SDS 0,1%.

Solução II para lavagem de membrana de Northern blot: SSC 0,1x; SDS 0,1%.

TAE 50x: Tris 2M, ácido acético 1M, EDTA 50mM, pH 8,0.

Tampão de amostra para DNA: formamida deionizada 98%; EDTA 10mM; xileno cianol 0,025%; azul de bromofenol 0,025%.

Tampão de lise para extração de RNA: isotiocianato de guanidina 4M; citrato de sódio 25mM pH 7,0; β -mercaptoetanol 0,1M.

TE: Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; pH 8,0.

4.1.8 Primers

4.1.8.1 Primers para amplificação de rCyp26B1

5'P450F	TCG CAG TCT CCA GCC CCT TT
P450cdsF	GGA CTA GTC GAC CGC CAT GCT CTT TGA GGG CTT
P450R316	CTG GTG TTC GCC CAG TAG GA
P450cdsR	GAG AGC GGC CGC TAG ACC AAA GAA CTT GA
3'ESTP450F	TGC ATT CTG GGC AAC CGT TTT
FIH12R	ACA TCA AAA CCA CAC GAC AGC CAA GAC A
3'ESTP450R	TGT GAG TCC CCA CAG TTT CTT A

4.1.8.2 Primers para Real-Time PCR

r/mCyp26A1-F	CTC CAA CCT GCA TGA TTC CT
r/mCyp26A1-R	CGC CTC TCG GTT GAA
r/mCyp26B1-F	ATT CCA TTG GCG ACA TCC A
r/mCyp26B1-R	CAA GTG CCT CAT GGC TGA AG
r/mCyp26C1-F	CTC TGG ACG TTC CCT TCA G
r/mCyp26C1-R	CTC CAG GTG CCG ATG CA
hCyp26A1-F	GCG CAC CAT TCT GGG ATC T
hCyp26A1-R	GAT CAC CGG CAC GTA GCA TT
hCyp26B1-F	TCC CCA AAG GCT GGA GTG TCA TGT ATA GC

hCyp26B1-R	GGG TCG AAC ACG TTC ACG TCT T
hCyp26C1-F	ATG CAG GAG CTG AAG GAG TC
hCyp26C1-R	GCT GCA GTA GCA GCA GGA C
rRARa-F	AGC CTT GCT TTG TTT GTC AGG
rRARa-R	CAC CTT GTT GAT GAT GCA GTT
rRARb-F	CGC CTG CAG AAG TGC TTT G
rRARb-R	GCT CTC TGT GCA CTC CTG CTT T
rRARg-F	CCA AGG ATG CTC ATG AAA ATC A
rRARg-R	GGC CTG GAA TCT CCA TCT TGA
rRXRa-F	GGG CAT GAG TTA GTA GCA GAC ATG
rRXRa-R	AGC CTC GAC CCG TTG GA
rRXRb-F	GCG TGG GAG CCA TCT TTG
rRXRb-R	CGC AGG CAG CCA AGC T
rRXRg-F	CCT TGG AGG ACC AGG TCA TTC
rRXRg-R	TGC CAT CCT GGACAG AAA CC
rCRABP1-F	GAG ATC AAC TTC AAG GTC GGA GAA
rCRABP1-R	GGT GCA GTG GAT CTT GTT CTC AT
rCRABP2-F	TGT TCG AAC CAC GGA GAT TAA CTT
rCRABP2-R	TTC ACT CTC CCA TTT CAC CAA ACT
rHPRT-F	GCC CTT GAC TAT AAT GAG CAC TTC AG
rHPRT-R	GTA GAT TCA ACT TGC CGC TGT CTT
hHPRT-F	TTT GTT GTA GGA TAT GCC CTT GAC T
hHPRT-R	CTC AAC TTG AAC TCT CAT CTT AGG CTT TGT
rGAPDH-F	TCC CAT TCT TCC ACC TTT GAT G
rGAPDH-R	GTT GCT GTA GCC ATA TTC ATT GTC A
hGAPDH-F	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA
hGAPDH-R	CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA
r/m/h 18S-F	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA
r/m/h 18S-R	GCT GGA ATT ACC GCG GCT

4.2 Métodos

4.2.1 Cultura e manutenção dos estoques celulares

As linhagens celulares utilizadas foram cultivadas em frascos plásticos de cultura, em meio DMEM, contendo 2 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% CO₂. Estoques celulares foram congelados na presença de 10% DMSO (dimetilsulfóxido) e mantidos em nitrogênio líquido.

4.2.2 Amostras de gliomas

Astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecidos cerebrais não-tumorais (obtidos a partir de lobotomias para tratamento de epilepsia) foram coletados rapidamente após a intervenção cirúrgica (Faculdade de Medicina – USP, tendo sido fornecidas pelo Laboratório de Investigação em Neurologia, coordenado pela Profa. Dra. Sueli Marie) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O termo de consentimento de doação, seguindo as normas institucionais da Faculdade de Medicina – USP, foi obtido de todos os pacientes. Alíquotas dos tecidos foram puerizados em cadinho de porcelana, mantido na presença de nitrogênio líquido, lisados com isotiocianato de guanidina e mantidos à -70°C até o isolamento de RNA. Os diferentes astrocitomas foram catalogados por graus, de acordo com o sistema WHO. A tabela 1 mostra os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.

TABELA 1: Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.

Dados dos pacientes				Dados clínicos			
Número	Identificação	Idade (anos)	Sexo	Registro	Data da cirurgia	Anátomo-patológico	Sobrevida (meses)
332	MSM	23	F	3359015D	25/07/02	Normal	-
337	JNS	41	M	2243166K	01/08/02	Normal	-
349	AGCC	41	M	55301488G	21/08/02	Normal	-
368	SSC	30	M	3281997D	26/09/02	Normal	-
400	ABF	45	M	7024322B	27/11/02	Normal	-
411	LKS	37	F	77062249A	19/12/02	Normal	-
462	ZZP	51	F	77063508H	20/03/03	Normal	-
352	JRS	35	M	13578917K	23/08/02	Grau I	-
363	RFC	13	M	6063214G	18/09/02	Grau I	-
421	IAPV	16	F	13473553G	15/01/03	Grau I	-
436	WGG	18	M	13570687I	10/02/03	Grau I	-
463	SEM	18	F	13449456G	21/03/03	Grau I	-
495	ASJM	8	F	13492358C	21/05/03	Grau I	-
501	RJB	32	M	13491797C	28/05/03	Grau I	-
570	KBRP	8	F	13594605C	01/09/03	Grau I	-
594	JCFS	18	M	3367062G	24/09/03	Grau I	-
601	JJS	21	M	1359908G	06/10/03	Grau I	-
101	JNO	24	F	7047105H	04/06/01	Grau II	-
250	MBC	31	F	13562412F	11/03/02	Grau II	13
267	AMM	44	M	13574538G	01/04/02	Grau II	-
328	CHR	39	M	77063187A	17/07/02	Grau II	-
341	ML	29	M	3361902H	19/08/02	Grau II	-
346	RTP	23	M	77062139H	15/08/02	Grau II	-
392	ARV	25	F	3233880E	11/11/02	Grau II	-
452	MRS	42	M	77062882E	10/03/03	Grau II	-
453	JOJ	29	M	3144835K	11/03/03	Grau II	-
467	MAM	41	F	13484936E	27/03/03	Grau II	-
490	NNS	37	M	13491090E	13/05/03	Grau II	-
577	RNN	35	F	13592815B	05/09/03	Grau II	-
28	GAB	53	M	3003852K	30/10/00	Grau III	-
34	MGCJ	18	M	3324020E	20/11/00	Grau III	-
73	MCV	24	F	7042702A	16/03/01	Grau III	-
106	ACSF	68	M	13538111G	22/06/01	Grau III	7
233	OAA	58	F	13567029I	15/02/02	Grau III	1
338	LKH	37	F	13580020H	05/08/02	Grau III	14
360	ICVK	32	F	77063981H	13/09/02	Grau III	-
410	AAS	29	M	13472055H	19/12/02	Grau III	-
428	FCR	22	M	13454723D	24/01/03	Grau III	-
451	AFL	34	M	13482045E	07/03/03	Grau III	-
478	ASM	36	M	77066277G	11/04/03	Grau III	-
514	LFF	37	M	13498164D	16/06/03	Grau III	-
35	MPS	53	M	1352122H	24/11/00	Grau IV	45
74	UC	75	M	7045824G	19/03/01	Grau IV	17
89	MJDAS	49	F	13516802C	26/04/01	Grau IV	38
170	ACO	50	M	13554147K	19/10/01	Grau IV	8
208	EFC	63	M	2869282K	04/01/02	Grau IV	6
256	CDS	42	M	13572856A	21/03/02	Grau IV	3
269	ELAD	65	F	13574725E	12/04/02	Grau IV	12
297	MCE	79	F	13445637B	23/05/02	Grau IV	11
317	MJO	72	F	2357547B	24/06/02	Grau IV	3
356	JS	74	M	5163770G	30/08/02	Grau IV	12
370	WAS	45	M	13581612B	27/09/02	Grau IV	12
380	SDS	62	M	13462498E	21/10/02	Grau IV	-
384	CSS	45	M	1356103K	25/10/02	Grau IV	5
391	IPP	54	F	13581546D	07/11/02	Grau IV	13
397	MCS	59	F	2995994F	20/11/02	Grau IV	5
435	JCPS	35	M	13473986A	07/02/03	Grau IV	13
440	MAC	76	M	3058444F	13/02/03	Grau IV	-
442	MSS	69	M	13473990D	17/02/03	Grau IV	4
450	CMT	62	F	13481051K	06/03/03	Grau IV	-
487	CFA	69	M	13490296G	06/05/03	Grau IV	-

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

Células C6, ST1, T98G ou A172 foram cultivadas em diferentes condições (tratadas ou não com atRA) em placas P150 e lisadas com solução de 4M de isotiocianato de guanidina, 25mM de citrato de sódio (pH 7,0) e 0,1M de betamercaptoetanol. Os lisados foram transferidos para tubos de polialômero contendo solução de cloreto de cério a 5,7M e 25mM de acetato de sódio (pH 5,0) e centrifugados a 130.000 x *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 260nm, utilizando como valor padrão 1 Abs_{260nm} = 40µg/mL de RNA. O grau de pureza da preparação foi avaliado pela relação Abs_{260nm}/Abs_{280nm}, que deve ser próxima a 2,0 para ácidos nucleicos.

4.2.4 Clonagem do transcrito completo de *cyp26b1*

4.2.4.1 Transcrição reversa

RNA total extraído das células ST1 tratadas com atRA por 10h, purificado de acordo com o protocolo descrito no item 2.2.7, foi usado na reação de transcrição reversa com a enzima SuperScript II (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, o RNA foi desnaturado a 70°C e anelado com *primer* oligo(dT)₁₈. Após 2 min à temperatura ambiente, foi adicionado ao tubo de reação um “mix” contendo dNTPs, tampão da enzima, DTT e inibidor de RNase (RNaseOUT, Invitrogen). A reação foi incubada a 42°C por 1h e, após este período, inativada por calor. Após esta etapa, foram acrescentadas ao tubo de

reação 2U de RNase H, seguido de incubação a 37°C por 20 min, para eliminação do RNA ligado às fitas de cDNA recém-sintetizadas.

4.2.4.2 Amplificação do transcrito completo de cyp26b1 de rato e clonagem no vetor pBlueScript Sk⁻.

Os cDNAs sintetizados foram utilizados como molde para a amplificação dos cDNAs de interesse. Estas reações foram feitas utilizando enzima *Platinum Taq HiFidelity* (Invitrogen), para serem minimizados erros durante a amplificação dos cDNAs. O protocolo do PCR foi o mesmo sugerido pelo fabricante da enzima. Os *primers* utilizados para a amplificação do transcrito completo de Cyp26B1 foram:

Primer 5'P450F: TCG CAG TCT CCA GCC CCT TT, desenhado com base em uma EST clonada como diferencialmente expressa.

Primer 3'ESTP450R: TGT GAG TCC CCA CAG TTT ATT A, desenhado com base em uma EST clonada como diferencialmente expressa.

O transcrito completo de Cyp26B1 foi preenchido e fosforilado, em reação catalisada por Klenow (5U – Fermentas) e T4 Polinucleotídeo quinase (10U – Fermentas), fragmentado em gel de agarose 1% e purificado em colunas GFX (Amersham Biosciences)

O vetor pBlueScript SK⁻ foi submetido à digestão com a enzima de restrição EcoRV, seguida de reação de desfosforilação, através de incubação com a enzima CIAP (fosfatase alcalina bovina), para reduzir a restauração do vetor sem a entrada de inserto. Após a fragmentação em

gel de agarose, a banda correspondente ao vetor linear foi purificada do gel, utilizando-se colunas GFX.

A ligação de Cyp26B1 e do vetor foi realizada através de reação catalisada pela enzima T4 DNA Ligase (Fermentas), em tampão 10mM Tris-acetato, 10mM acetato de magnésio, 50mM acetato de potássio, 500mM ATP, à temperatura ambiente, por 16h.

4.2.4.3 Amplificação da região codificante de cyp26b1 e clonagem no vetor pENTR2B.

A região codificante de rCyp26B1 foi amplificada em reação de PCR, utilizando como molde o cDNA sintetizado, em reação catalisada pela enzima Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen). Os *primers* utilizados nesta reação foram:

Primer P450cds F: GGA CTA GTC GAC CGC CAT GCT CTT TGA GGG CTT, desenhado com base na sequência humana descrita de Cyp26B1

Primer P450cds R: GAG AGC GGC CGC TAG ACC AAA GAA CTT GA, desenhado com base na sequência obtida de Cyp26B1

O produto amplificado foi purificado com o auxílio de colunas GFX e submetido a reação de digestão com as enzimas de restrição SalI e NotI, cujos sítios específicos estavam presentes nos *primers* F e R, respectivamente. O produto da reação de digestão foi fracionado em gel de agarose 1% e o fragmento desejado foi purificado a partir do gel através de colunas GFX.

O vetor pENTR2B foi, por sua vez, digerido com as enzimas SalI e NotI, desfosforilado por ação da enzima CIAP e purificado após

fragmentação em gel de agarose. A ligação entre o vetor e o inserto, coesiva e direcional, foi realizada em reação catalisada pela enzima T4 DNA ligase.

4.2.4.4 Preparo de bactérias eletrocompetentes e eletroporação

Para a preparação de bactérias eletrocompetentes, 10 mL de uma cultura fresca de *E. coli* DH10B, crescida por 16 h, foram inoculados em 1 L de meio LB e incubados a 37°C até Abs_{600} de 0,7. Neste ponto, as bactérias foram transferidas para gelo e coletadas por centrifugação a 4.000 x *g* por 15 min. em centrífuga refrigerada. O meio de cultura foi drenado completamente e as células ressuspensas em 1L de água gelada estéril. Os passos de coleta e ressuspensão foram repetidos por 3 vezes, sendo que o litro de água foi trocado por 0,5L de água, 20mL de 10% glicerol gelado e, por fim, 2mL de 10% glicerol gelado. A seguir, as bactérias foram aliquotadas e estocadas a -70°C até o momento do uso.

Para a eletroporação, 50µL de bactérias eletrocompetentes foram transferidas para cubetas próprias para eletroporação geladas, de 2mm de espessura, às quais foi acrescido 1µL da ligação. Após 1 min no gelo, a cubeta foi colocada no aparelho eletroporador EC 100 (EC Apparatus Corporation) e submetida a uma tensão de 2,8kV, 120Ω. As bactérias foram imediatamente ressuspensas em 1mL de meio LB e crescidas a 37°C por 1h a 200 rpm. Após este período, as bactérias foram plaqueadas em LB ágar contendo o antibiótico apropriado para seleção, dependendo do plasmídeo utilizado.

4.2.4.5 Rastreamento dos clones bacterianos (PCR de colônia)

Clones bacterianos isolados foram repicados para poços de placas de 96 poços contendo 100µL de meio SuperBroth, suplementado com antibiótico de seleção específico para cada plasmídeo utilizado na transformação bacteriana, e incubados a 37°C por 16h.

As bactérias crescidas, congeladas na presença de 15% de glicerol ou não, foram repicadas (~1µL) para placas de PCR contendo 14µL de mix de PCR. Este mix continha: 1.226µL de H₂O, 150µL de tampão de PCR 10x, 45µL de MgCl₂ a 50M, 19µL de dNTP (10mM cada), 25µL de cada *primer* a 10µM e 10µL de *Taq* a 5U/µL, para cada 100 reações. A seguir, a reação foi submetida às temperaturas de: 95°C por 5 min, para lise inicial das bactérias; 40 ciclos de 95°C por 30 seg para desnaturação, 55°C por 30 seg para anelamento e 72°C por 1 min para extensão; e 72°C por 5 min para extensão final. O produto desta reação foi fracionado em gel de agarose 1%, em tampão TAE diluído 0,5x e analisado quanto à presença do fragmento do tamanho esperado.

Para clonagens em vetores de expressão em células de mamífero, os clones positivos para os cDNAs de interesse foram rastreados quanto à orientação em relação ao promotor do vetor. Para isto, foi usada uma estratégia por PCR, onde cada clone bacteriano selecionado foi submetido a 2 reações de PCR: a primeira com um *primer* para a região promotora do plasmídeo e outro *primer* 5' interno, desenhado especificamente para o cDNA de interesse; na segunda reação, foram utilizados o mesmo *primer* usado para a região promotora do plasmídeo e o *primer* 3' interno, específico para o cDNA de interesse. Assim, caso fosse observada amplificação na primeira reação, o inserto estaria clonado na orientação inversa. Caso a amplificação se desse na segunda reação, e não na primeira, o inserto estaria clonado na orientação correta em relação ao promotor plasmideal.

4.2.4.6 Preparação de DNA plasmideal em pequena e média escalas (mini e midiprep, respectivamente) a partir dos clones bacterianos selecionados.

Os clones bacterianos selecionados foram pré-inoculados em 3ml de meio LB ou SuperBroth, adicionado do antibiótico correspondente para cada tipo de plasmídeo, e incubados a 37°C, sob agitação de 200-250rpm, por 16h. O inóculo foi feito diretamente em 5ml, no caso das *minipreps*, ou através da diluição (1/100) destas pré-culturas em 50ml de meio para bactéria acrescido de antibiótico e incubado a 37°C sob agitação.

Para a preparação dos DNAs plasmideais em baixa escala foram utilizados os kits CONCERT Rapid Miniprep (Invitrogen Life Technologies), QIAprep Spin (Qiagen) ou Wizard Miniprep Kit (Promega), conforme a disponibilidade. Para a preparação em média escala, foi utilizado o kit QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen). Os DNAs resultantes foram quantificados por espectrofotometria a 260nm, sendo que 1 OD_{260nm} equivale a 50µg/ml de DNA. A pureza destes DNAs foi determinada utilizando a relação entre as absorbâncias em 260 e 280nm, considerando-se uma pureza satisfatória a relação Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ de pelo menos 2,0. A identidade dos DNAs foi analisada através de digestão com as enzimas de restrição apropriadas e eletroforese em gel de agarose.

4.2.5 Sequenciamento do transcrito completo de *cyp26b1* de rato

4.2.5.1 Sequenciamento de clones originados por restrição de Cyp26B1 com enzimas de restrição

O transcrito completo de Cyp26B1 foi submetido à digestão com as enzimas de restrição *Ava*I e *Hinf*I, cujos sítios são relativamente freqüentes no genoma de mamíferos. O produto destas reações foi submetido à reação de preenchimento e fosforilação, catalisada pelas enzimas Klenow e T4 polinucleotídeo quinase, e utilizados em reação de ligação com o vetor pBlueScript SK⁻, digerido com *Eco*RV e desfosforilado.

O produto desta ligação foi utilizado para a transformação de bactérias eletrocompetentes e os clones bacterianos obtidos foram rastreados por PCR de colônia. Clones bacterianos contendo fragmentos de diferentes tamanhos de Cyp26B1 foram submetidos ao sequenciamento automatizado de DNA.

4.2.5.2 Sequenciamento de clones originados por fragmentação randômica de Cyp26B1 por sonicação

O transcrito completo de Cyp26B1 foi submetido à fragmentação aleatória por sonicação (2 ou 3 pulsos de 45 seg, na potência máxima). O produto sonicado foi fragmentado por eletroforese em gel de agarose 2% e os fragmentos contendo 0,75 a 1,5kb foram purificados do gel. Estes fragmentos foram submetidos à reação de preenchimento e fosforilação, purificados com o auxílio de colunas GFX e clonados no sítio *Eco*Rv do vetor pBlueScript SK⁻. O *screening* das colônias positivas foi feito através

de PCR de colônia. Clones bacterianos contendo fragmentos de Cyp26B1 em torno de 1kpb foram submetidos ao sequenciamento de DNA.

4.2.5.3 Sequenciamento automatizado de DNA

Aproximadamente 30ng do produto de PCR de colônia ou do plasmídeo contendo como inserto a seqüência de interesse foi utilizado como molde para a reação de sequenciamento, utilizando o kit "BigDye terminator V3.0" (Applied Biosystems). As reações foram montadas com *primers* específicos para os vetores nos quais os insertos estavam clonados e *primers* específicos para as seqüências clonadas, no caso de construções com a região codificante e o transcrito completo de CYP26B1, além da porção 5' do transcrito clonada na orientação inversa em relação ao promotor do plasmídeo.

O kit utilizado baseia-se no uso da metodologia do sequenciamento com dideoxinucleotídeos marcados com fluorescência, acoplado a PCR com apenas um *primer*. O produto desta reação foi corrido no aparelho de sequenciamento automatizado ABI3700 (Perkin Elmer).

4.2.6 Predição de membros da família Cyp26 e análise de similaridade protéica

As seqüências protéicas de diversos membros da família Cyp26 ainda não conhecidos foram preditas através de ferramentas de bioinformática, utilizando as seqüências genômicas e ESTs presentes nos bancos de dados públicos.

Para tanto, as seqüências protéicas de Cyp26A1, Cyp26B1 e Cyp26C1 já conhecidas foram alinhadas com a seqüência de DNA genômico dos organismos de interesse, utilizando as ferramentas BLAT e BLAST. Além disso, a seqüência protéica foi também alinhada com o banco de ESTs traduzido, utilizando a ferramenta BLAST.

A seqüência do DNA genômico e/ou as seqüências de ESTs que apresentavam alta similaridade com cada proteína Cyp26 conhecida foi traduzida, sendo considerada a seqüência predita para tal proteína e organismo.

As seqüências protéicas preditas, juntamente com as seqüências de Cyp26 conhecidas, foram alinhadas utilizando o programa ClustalW de alinhamentos múltiplos.

4.2.7 Expressão de cyp26b1 em células de mamífero

4.2.7.1 Curva de sobrevivência aos antibióticos utilizados na seleção de transfectantes estáveis

4×10^4 células/cm² foram plaqueadas em poços de placas de 24 poços e tratadas com diferentes concentrações dos antibióticos utilizados para a seleção de transfectantes estáveis. O meio foi substituído a cada 3 dias, durante 15 dias. Após este período, a menor concentração de antibiótico capaz de matar todas as células foi considerada a concentração ideal para a seleção dos transfectantes.

4.2.7.2 Transfecção de linhagens de glioma com as construções de interesse.

As transfecções das construções de interesse nas linhagens de glioma foram feitas utilizando o kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen). As

células a serem transfectadas foram plaqueadas na densidade de 8×10^4 células/cm² em meio DMEM acrescido de 10% SFB, 24h antes da transfecção.

Cerca de 8µg do plasmídeo de interesse foram diluídos com 300µl de meio DMEM sem soro. Paralelamente, 12µl da solução Lipofectamine 2000 foi diluída no mesmo volume de meio e incubada à temperatura ambiente por 1 minuto. A seguir, as duas soluções foram combinadas e incubadas em repouso por 20 minutos, para permitir a formação dos complexos DNA-lipossomos. Após esta incubação, os complexos foram adicionados sobre as células a serem transfectadas, que tiveram seus meios de cultura previamente trocados por meio DMEM sem soro. Após 6h de incubação a 37°C, o volume adequado de SFB foi adicionado em cada placa para a obtenção de meio contendo 10% SFB.

Para a seleção de clones ou populações mistas estavelmente transfectadas com a construção de interesse, as células transfectadas foram tripsinizadas e re-plaqueadas em novas placas P60, nas diluições 1/2, 1/4, 1/10, 1/25, 1/50 e 1/100 da placa original. Após 24h da diluição, o antibiótico adequado, cuja marca de resistência encontrava-se no plasmídeo utilizado na transfecção, foi adicionado ao meio de cultura, na concentração adequada para a seleção de transfectantes estáveis. A seleção era feita até a morte de todas as células de um controle não transfectado, plaqueado e diluído conforme as células submetidas à transfecção.

4.2.8 Isolamento de variante de C6 resistente ao tratamento com atRA

Para o enriquecimento da população mista de C6 para células resistentes ao tratamento com atRA, estas foram cultivadas em meio

DMEM contendo 5% SFB e submetidas ao tratamento com 10^{-5} M atRA durante 16 semanas. A densidade celular foi controlada, de forma a manter as células em torno de 50 a 75% da confluência.

Para o isolamento dos clones resistentes, a população mista enriquecida para células resistentes ao tratamento com atRA foi plaqueada na densidade de 10 células/cm² em placas P35mm. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% SFB e 10^{-5} M atRA por 7 a 10 dias, até o aparecimento de colônias macroscópicas. Com o auxílio de anéis de clonagem, impregnados na base com graxa de silicone estéril, as colônias foram isoladas e tripsinizadas individualmente. As células de cada colônia foram transferidas para poços de placas de 12 poços e cultivadas em meio DMEM.

4.2.9 Análise fenotípica das células transfectantes ou resistentes ao tratamento com atRA

4.2.9.1 Crescimento em suspensão de agarose

Poços de bandejas com 24 poços foram preenchidos com 0,5mL de agarose 0,6% em DMEM/10% SFB. Sobre esta camada de agarose foram plaqueados 100μL de meio contendo células diluídas nas concentrações 10^5 , 10^4 e 10^3 células/mL, em triplicata para o controle e para as células a serem tratadas. Rapidamente, para evitar a adesão das células, foi adicionado 1,0mL de solução semi-sólida de agarose 0,3% em DMEM/10% SFB. Após 24 horas, foram adicionados 500μL de DMEM contendo a concentração desejada de SFB no controle e a mesma quantidade de DMEM com diferentes concentrações de atRA para as condições tratadas. Esta camada superior de meio líquido foi trocada a cada 3 dias, acrescentando atRA às condições tratadas. Depois de 17 dias, as colônias foram contadas em aumento de 40 vezes em microscópio invertido (Nikon

Fluophot). Após 30 dias do plaqueamento, as colônias foram fixadas com a adição de formaldeído e novamente contadas com o auxílio de microscópio. A eficiência de plaqueamento em suspensão, ou seja, o número de colônias formadas em relação ao número de células plaqueadas, foi comparado entre as diferentes condições.

4.2.9.2 Curvas de crescimento em substrato sólido

5×10^3 células/cm² foram plaqueadas em placas P35mm ou poços de placas de 6 poços, em meio DMEM suplementado com 5% SFB. No primeiro dia após o plaqueamento (dia 1), duas placas foram coletadas através de tripsinização, para a contagem inicial. O meio das outras placas foi trocado para os meios de tratamento, suplementado com 0,5, 2 ou 5% SFB, na presença ou ausência de 10^{-5} M atRA. O meio das placas foi trocado a cada 2 dias, mantendo o tratamento inicial.

Duas placas de cada tratamento foram coletadas nos dias 3, 5, 7 e 9 após o plaqueamento. A coleta é realizada através da lavagem das placas com PBSA e adição de 0,4 ml de solução de tripsina e 0,5 ml de PBSA. Quando as células se apresentaram individualizadas e despregadas da placa, a suspensão foi adicionada a 0,1 ml de formaldeído 37%, contido em um tubo de 1,5ml, para fixação das células. Os tubos foram mantidos a 4°C até o momento da contagem das células.

A contagem das células foi feita com o auxílio de contador eletrônico (CC-530 CELM), através de diluições apropriadas em solução salina, feita com o auxílio do diluidor variável DV-250 (CELM).

4.2.9.3 Análise da síntese de DNA por ensaio de incorporação de [3H]-timidina

Células de glioma cultivadas em DMEM contendo 2% ou 10% de SFB foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células/cm², em bandejas de 48 poços. Após 24h, as células foram tratadas com atRA, quando era o caso, em quadruplicata, para as concentrações finais desejadas. O meio foi trocado a cada 48h, para a renovação das concentrações iniciais de atRA. 6h antes do tempo total de tratamento, foram adicionados a cada poço 9µl de solução de [³H]-timidina (5µCi/ml; 2×10^6 M). As culturas foram incubadas por 6h a 37°C. A seguir, o meio de cultura foi removido e as culturas foram lavadas com TCA 5% gelado por duas vezes, secos brevemente por inversão sobre papel toalha e as células lisadas por adição de solução de NaOH 0,5M e incubação por 30 minutos. A seguir, foi colocado, em cada poço, um pedaço de papel de filtro grosso (1x1,5cm), no qual o DNA marcado se adsorve. Os filtros são transferidos para um recipiente do tipo Becker de vidro, onde são lavados, sucessivamente, com TCA 5%, etanol e acetona gelados, para a eliminação da timidina marcada não incorporada ao DNA. Após a secagem, os filtros foram colocados em *vials* contendo 5ml de líquido de cintilação e a contagem foi realizada em cintilador beta.

4.2.9.4 Ensaio de tumorigênese em camundongos do tipo nude

2×10^6 células foram injetadas, subcutaneamente, na região dorsal de 5 camundongos imunodeprimidos do tipo *nude*. O crescimento dos tumores foi analisado a cada 3 dias, com o auxílio de um paquímetro. 21 dias após a injeção, os animais foram sacrificados e os tumores

resultantes foram extraídos cirurgicamente e pesados com o auxílio de uma balança analítica.

4.2.10 *Análise da expressão gênica*

4.2.10.1 Northern blot

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

Alíquotas de 20µg dos diferentes RNAs foram desnaturadas a 65°C por 15 min em solução de 2,2M formaldeído e 50% formamida, para impedir a formação de estruturas secundárias. Após a adição de tampão de amostra, os RNAs foram fracionados por eletroforese em gel de 1% de agarose, 2,2M de formaldeído, em tampão MOPS 1x. 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 10x. Após a transferência, os RNAs foram fixados à membrana a 80°C por 2h.

4.2.10.1.2 *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 45µL de solução contendo 50ng do fragmento de DNA a ser marcado foram desnaturados e usados para ressuspender “beads”. As “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 *primers* 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 *primers* específicos para a sequência a ser marcada ou para o plasmídeo onde a mesma se encontrava clonada e dCTP marcado radioativamente com ^{32}P .

As sondas foram então purificadas dos nucleotídeos livres em colunas "MicroSpin" S-300 ou GFX (Amersham Biosciences).

4.2.10.1.3 Hibridização e lavagem dos filtros

Os filtros foram pré-hibridizados (SSPE 5x, formamida a 50%, Denhardt 5x, SDS a 0,1% e DNA de esperma de salmão desnaturado a $100\mu\text{g/mL}$) a 42°C por 1-4h. A seguir, os filtros foram hibridizados a 42°C por 16h (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 2x/SDS 0,1%, à temperatura ambiente, e 4 vezes em SSC 0,1x/SDS 0,1%, a 56°C por 30 min.

4.2.10.1.4 Autoradiografia

Os filtros foram envoltos em filme plástico e utilizados para exposição, por diferentes períodos de tempo, de telas do PhosphorImager.

Estas telas são sensíveis a emissões radioativas, que são armazenadas na forma de moléculas de fosfato excitadas. A leitura é realizada através do STORM (Molecular Dynamics), que tem a capacidade de adquirir imagens das telas PhosphorImager, transferindo-a para computador, onde a intensidade das bandas podem ser quantificadas através do programa ImageMaster (Amersham Biosciences).

4.2.10.2 Real Time-PCR

O Real time-PCR é uma técnica poderosa e rápida para avaliar o nível de expressão gênica entre diferentes amostras. O sistema de real time-PCR é baseado na detecção e quantificação de uma fluorescência repórter. Este sinal aumenta de forma diretamente proporcional à quantidade de produto da reação de PCR. A detecção da intensidade de fluorescência a cada ciclo permite a monitoração da reação de PCR durante a fase exponencial, quando o primeiro aumento significativo na quantidade de produto correlaciona-se à expressão do gene de interesse. Quanto maior o número inicial de moléculas de ácido nucléico-alvo, mais cedo a fluorescência poderá ser observada (SILVERMAN & KOOL, 2005).

Estabelecendo-se um ponto de corte de fluorescência (threshold), significativamente acima do nível basal, é possível determinar o parâmetro C_T (threshold cycle), definido como o número do ciclo da reação no qual a emissão de fluorescência excede o ponto de corte fixado.

Existem três sistemas fluorescentes principais para a monitoração da amplificação do DNA durante a reação de real time-PCR: (1) hidrólise de sondas específicas; (2) hibridização de sondas específicas; e (3) agentes que se ligam ao DNA.

A avaliação da expressão de genes de interesse para o presente trabalho foi realizada através de reação de *Real Time-PCR*, utilizando o

reagente SYBR Green Dye (Applied Biosystems). Esta substância possui afinidade pela *minor groove* da dupla fita de DNA e emite fluorescência no comprimento de onda de 520nm; quando não está ligado ao DNA, esta fluorescência é fraca, mas quando o reagente liga-se à dupla fita de DNA, a intensidade aumenta cerca de 100 vezes, permitindo a detecção do produto da reação de PCR em tempo real (Livak & Schmittgen, 2001).

Diferentes enfoques podem ser utilizados para quantificar a amostra-alvo: quantificação absoluta e quantificação relativa. A quantificação absoluta implica na construção de uma curva-padrão a partir de RNA de concentração conhecida. Utilizando esta curva para a extrapolação dos dados obtidos para as amostras, é possível determinar o número de cópias do transcrito de interesse na amostra analisada .

O método de comparação de C_T , utilizando o cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizado neste trabalho, compara a quantidade relativa de sequência-alvo com relação a uma amostra referência escolhida entre as amostras testadas, denominada amostra calibradora. Para normalizar a expressão gênica em relação à quantidade de amostra em cada reação, um controle interno com expressão invariável deve ser utilizado como referência. A medida de expressão gênica, resultante da utilização desta metodologia, é relativa à expressão da amostra calibradora. Para que este método seja válido, a eficiência de amplificação do gene-alvo e do controle interno deve ser aproximadamente igual (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

4.2.10.2.1 Desenho dos primers para Real Time-PCR

Os *primers* utilizados nas reações de Real Time-PCR foram desenhados com o auxílio do programa *PrimerExpress* (Applied Biosystems). As principais características destes oligos, fundamentais para o funcionamento das reações, são: a) amplificação de um fragmento cujo

tamanho máximo não exceda 200 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 *primers* 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.

4.2.10.2.2 Síntese de cDNA

2,0 µg de RNA total foi utilizado como molde para a transcrição reversa. Após o anelamento dos *primers* - oligo dT e *random primers*, a síntese de cDNA foi realizada por 2h a 42°C, utilizando a enzima transcriptase reversa SuperScriptII (Invitrogen). Após a síntese de cDNA, foram adicionados 60µl de TE a cada reação. Para a quantificação da expressão gênica através de Real Time-PCR, as amostras foram diluídas 40 vezes com água livre de nucleases.

4.2.10.2.3 Reações de amplificação

As reações de Real-time PCR foram realizadas utilizando a tecnologia SYBR Green, em aparelho ABI Prism 5700 (Applied Biosystems). Cada reação foi feita em um poço de uma placa de 96 poços específica, em volume final de 12µl, contendo 6µl de "SYBR Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems) e quantidade adequada de *primer*.

A determinação da quantidade adequada de cada par de *primers* foi realizada através de reações utilizando as concentrações de 100, 150,

200, 300, 400, 600 e 800 nM de cada *primer* e uma amostra conhecidamente positiva para o gene a ser estudado, bem como reações na ausência de qualquer amostra amplificável (NTC, do inglês, Non Template Control). As reações de amplificação do RNA ribossomal 18S, utilizado como controle interno, foram realizadas utilizando 150nM de concentração final de *primer*. Todas as demais reações foram realizadas com 400nM do *primer* de interesse.

As reações de Real Time-PCR foram realizadas em duplicata, em um volume final de 12 μ l. Foram utilizados 3 μ l do cDNA sintetizado anteriormente (item 4.2.9.2.2), 3 μ l do mix de *primers* F e R (4 vezes concentrado em relação à concentração final de reação) e 6 μ l do Master Mix PCR (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 60 segundos (anelamento dos *primers* e extensão).

4.2.10.2.4 *Análise da expressão dos genes de interesse*

A análise dos dados foi realizada através da quantificação relativa da expressão gênica em relação a uma amostra calibradora, através do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). O ponto de corte de 0,1 foi definido manualmente, determinando o C_t 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 média geométrica de quatro controles internos, a saber, o RNA ribossomal 18S e os genes de expressão constitutiva - GAPDH, β -actina e HPRT.

4.2.11 *Análise estatística*

Os dados dos experimentos estão apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão. O número de repetições variou para cada experimento, sendo no mínimo 3 repetições. As diferenças entre as médias dos grupos foi testada por ANOVA, seguido pelos testes Tukey, ou t de student. Valores de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os cálculos foram realizados utilizando o programa Prism, versão 3.03 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 Clonagem do cDNA correspondente ao transcrito completo de *cyp26b1* de rato

A clonagem do transcrito completo de *cyp26b1* de rato foi realizada através de "long-distance" RT-PCR, conforme descrito no item 4.2.3 de Métodos, utilizando os *primers* 5'P450F e 3'ESTP450R. O produto amplificado foi fracionado em gel de agarose 1%, em tampão TAE 0,5x (figura 5).

FIGURA 5: Amplificação do cDNA correspondente ao transcrito completo de *cyp26b1* de rato, utilizando cDNA preparado a partir de RNA total purificado de células ST1 tratadas com atRA por 10h. Eletroforese em gel de agarose 1%. PM corresponde ao marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Fermentas).

Como pode ser observado na figura 5, houve amplificação de um fragmento de aproximadamente 4,5 kpb, compatível com o tamanho dos transcritos humanos e de camundongo, cujas sequências já foram descritas.

O produto desta amplificação foi clonado no vetor pBlueScript SK⁻ (Invitrogen) e utilizado na transformação de bactérias eletrocompetentes, conforme descrito em Métodos.

5.2 Sequenciamento de *cyp26b1* de rato

Três clones independentes contendo a construção pBlueScript SK⁻ foram utilizados para a determinação da sequência correspondente ao transcrito completo de *cyp26b1*. Para a realização das reações de seqüenciamento foram utilizados como molde, preferencialmente, plasmídeos purificados, uma vez que a qualidade da seqüência obtida é superior à obtida quando o molde é produto de PCR não purificado.

Assim, preparações de plasmídeo pBlueScript-*cyp26b1* foram primeiramente submetidos ao seqüenciamento, utilizando-se os *primers* específicos para o vetor de clonagem, assim como aqueles utilizados para a amplificação do fragmento clonado, conforme descrito em Métodos. Devido ao tamanho do transcrito, o seqüenciamento direto não foi suficiente para obter a seqüência completa do mesmo e, portanto, foram adotadas diferentes estratégias para a geração de subclones menores, que permitissem o completo sequenciamento do cDNA em questão.

5.2.1 Geração de fragmentos de *cyp26b1* por digestão com enzimas de restrição

Com o propósito de gerar fragmentos de menor tamanho, permitindo, assim, o seqüenciamento de porções mais interiores do inserto clonado, os insertos das construções dos 3 clones foram submetidos à digestão com várias enzimas de restrição que reconheçam sequências degeneradas e/ou reconhecessem sítios de restrição de 4-5 bases, a saber: *Sau3AI*, *TaqI*, *HaeIII*, *RsaI*, *HinfI* e *AvaI*. A figura 6 mostra o resultado da digestão de um dos clones com as enzimas acima citadas.

FIGURA 6: Digestão do cDNA correspondente ao transcrito completo de *cyp26b1* com as enzimas *Sau3AI*, *TaqI*, *HaeIII*, *RsaI*, *HinfI* e *AvaI*. Eletroforese em gel de agarose 1%. PM corresponde ao marcador de peso molecular DNA Ladder Mix (Fermentas).

As digestões que originaram fragmentos de tamanhos mais homogêneos e adequados para a finalidade proposta foram àquelas realizadas com as enzimas *AvaI* e *HinfI*. Assim, os fragmentos originados pela digestão com estas enzimas foram clonados em pBlueScript SK⁻

A clonagem dos fragmentos gerados pela digestão do transcrito de *cyp26b1* de rato com as enzimas *AvaI* e *HinfI* resultou em clones contendo insertos de variados tamanhos, além de uma quantidade pequena de clones transformados com vetor vazio, que no PCR de colônia dão origem a produtos de amplificação de aproximadamente 250 pares de base.

Trinta e cinco clones, provenientes da digestão com cada enzima de restrição e apresentando insertos com diferentes tamanhos, foram utilizados como molde para reações de sequenciamento.

5.2.2 Obtenção de clones aleatórios através de fragmentação randômica por ultra-som.

Para a obtenção de um número maior de clones contendo fragmentos adicionais de *cyp26b1*, o transcrito completo de *cyp26b1* de rato foi submetido à fragmentação randômica por sonicação (figura 7). Os fragmentos que apresentavam tamanho entre 750 pb e 1,5kb foram clonados em pBlueScript SK⁻ e utilizados como molde para reações de sequenciamento.

FIGURA 7: Fragmentação randômica do cDNA correspondente ao transcrito completo de *cyp26b1* através de sonicação. Eletroforese em gel de agarose 2%. PM corresponde ao marcador de peso molecular, 1Kb DNA Ladder (Fermentas)

5.2.3 Montagem da sequência de *cyp26b1* de rato

A montagem do transcrito de *cyp26b1* de rato foi feita utilizando o pacote de programas Phred-Phrap/Consed (Ewing & Green, 1998; Ewing et al, 1998; Gordon et al, 1998), além do programa Cap3 (Huang & Madan, 1999), ambos disponibilizados na internet por nosso laboratório (<http://mariwork.iq.usp.br/ferramentas>).

Para a montagem da sequência de *cyp26b1*, através do pacote de programas Phred-Phrap/Consed, foram utilizadas apenas leituras que apresentavam mais de 400 bases com qualidade maior ou igual a 20, de acordo com a pontuação do Phred, totalizando 112 leituras. Este critério foi adotado porque foi verificado que sequências com baixa qualidade interferem na montagem da sequência completa, resultando na formação de vários *contigs* menores, em detrimento do transcrito completo único.

Para a confirmação da montagem, utilizando o programa Cap3, foi feita a retirada manual das seqüências de DNA correspondentes ao vetor. Além disso, foram também retiradas manualmente as bases com qualidade menor do que 20 das leituras utilizadas para a montagem.

Foi obtido um *contig* de 4.552 nucleotídeos (Anexo I), compatível com o tamanho esperado de *cyp26b1*, estimado a partir de ensaios de Northern blot. Na figura 8 estão esquematizadas a contribuição e distribuição das diferentes seqüências utilizadas (sequenciamento a partir do transcrito completo clonado, clones randômicos gerados por sonicação e clones gerados por digestão com enzimas de restrição) na montagem final do transcrito.

FIGURA 8: Contribuição e distribuição das seqüências utilizadas para montagem do transcrito completo de *cyp26b1*.

5.3 Análise computacional

5.3.1 Estrutura genômica de *cyp26b1*

Para a delimitação das regiões correspondentes aos introns e exons do gene *cyp26b1* de rato, a sequência obtida do cDNA completo clonado foi comparada ao rascunho do genoma de rato, disponível no banco de dados do BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>), conforme mostra a figura 9.

A sequência de cDNA de *cyp26b1*, contendo 4.552 nucleotídeos, é codificada por 6 exons presentes no cromossomo 4, na região 4q34 (114428810-114445630). Nesta região, estão contidos três marcadores cromossômicos, a saber, BF420219, BF398420 e D4GOT92.

FIGURA 9: Alinhamento da sequência de *cyp26b1* com o genoma de rato, através da ferramenta BLAT – montagem de Janeiro/2003. A sequência alinhada está destacada em vermelho. Várias predições gênicas estão ainda apresentadas. As caixas largas representam os *exons* putativos, enquanto que as linhas finas, com ou sem setas, representam os *introns*. Sequências obtidas através de diversos programas de predição gênica e regiões homólogas a mRNAs de outros organismos já descritos também estão representados.

5.3.2 Determinação da fase aberta de leitura (ORF - Open Reading Frame) e da sequência protéica conceitual de Cyp26B1.

A busca das fases abertas de leitura de cyp26b1 foi realizada através do programa ORF Finder do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). A maior fase aberta de leitura encontrada nesta sequência de cDNA contém 1.539 nucleotídeos, distribuídos nos 6 exons, que codifica uma proteína de 512 aminoácidos (Figura 10 e Anexo II). A região 3' não traduzida - 3' UTR, contendo aproximadamente 2,7 kb, é completamente codificada pelo último exon do transcrito; como o descrito para a maior parte dos genes de mamíferos, este exon é o maior do transcrito, contendo 3.248 nucleotídeos.

A sequência protéica conceitual de Cyp26B1 foi analisada quanto à presença de domínios protéicos conservados, utilizado-se vários programas:

- CDD - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)
- Swiss-Prot (<http://us.expasy.org/sprot>)
- PROSITE (<http://us.expasy.org/prosite>)
- Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) e
- Hits (<http://hits.isb-sib.ch>).

Todos os programas apontaram a presença de um domínio conservado de citocromo P450, que abrange a maior parte dos aminoácidos da proteína, especificamente os aminoácidos 50 a 490, com algumas variações entre os programas utilizados.

ATGCTGCTTTGAGGGGCTTGGAGTGTGGTGTGGGGCTGGGCAACCTCTGGCGGCTGGCTGGTGTG
M L F E G L E L V S A L A T L A A C C L V
TCGGTGAAGCTGCTTTGCGGGCTGTGGCAAGCTGTGGGCAAGCTGGGCTGGGCTGCAAC
S V T L L L A V S Q Q L N Q L R W A A T
CGGCAAGAGAGCTGCAAGCTGTGCTACCCCAAGGGCTGCAATGGGATTCGGCTGATGGGA
R D K S C K L P I P K G S M G F P L I G
GAGAAGCTGGTCAAGCTGTGTGCAAGGGTTCGGGCTGCAAGTGTGGGCTGGGCTGAGAAGTAT
E T G H W L L Q G S G F Q S S R R E K Y
GGCAAGCTTTCAAGCAACAACCTAAGTGGGGCGGCTGTGATTCGGCTGAGCGCTGGGG
G N V F K T H L L G R P L I R V T G A E
AAGCTGGGCAAGCTGCTGCTGGGCAACAACCTAGTGGGCAAGCGAGTGGGCTGGGCGAGG
N V R K I L L G E H Q L V S T E W P R S
GCAAGCTGTGTGTGTGGGCAACAACCTGGGCGCAACCTCCATGGGCGACATCCAACCGCAAC
A R V L L G P N T V A N S I G D I H R N
AAGCGCAAGGTCTCTCCCAAGCTCTCAGCAATGAGGCACTCGAGAGCTAAGTGGCAAC
K R K V F S K I F S H E A L E S Y L L P K
ATCCAACTGGTGTGCTGAGGCAACAACCTGAGCGCTGGGCAAGCGAGCTGAGGCGCAATCAAT
I Q L V I Q D T L R A W S S Q P E A I N
GTGTATCAGGAGGCGCAAGCAACTCACTCTCCGAATGGCGGTGGGCTGTGTGTGGGCTG
V Y Q E A Q R L T F R M A V R V L L G G F
AGCATCGCGGAGGAGGAGCTGGGAAACCTCTTTGAGGTGTACCAAGAGTTGTGTGGGAAT
S I P E E D L G N L F E V Y Q Q F V E N
GTCTTCTCTGTGCGGTGGAGCTGCCCTTCAGCGGTGCAACCGGAGGGGCACTCAAGCTG
V F T S L P V D L P F S G Y R R G I Q A R
CAGATCTCTCAGAAGGGCTGAGAGAAGGGTGTCCGTGGAAGGCTTCAGTGTACCCAGGG
Q I L Q K G L E K A V R E K L Q C T Q G
AAGAGCTACTCAGACGCGCTGGCACTCTCATTTGAGGAGCAAGGAGCAAGGCAAGGCAAGG
K D Y S D A D L D I L I E S S K E H G K E
ATGACATCGAGGAGGAGTGAAGGATGGGACCTGGAGCTGATCTTCGAGCGCTATGCACT
M T M Q E L K D G T L E L I F A A Y A T
ACGGCGAGTGGCAAGCACTCTCTGATCATGCACTACCGAAGAACCTCGAGTGTCTGGAA
T A S A S T S L I M Q L L K H P A V L E
AAGCTACGGGGAGGAAGCTGGGGCCCAAGGGCTGCTGCAATGGTGGTGGCTGCGCTGGAG
K L R E E L R A Q G L L H G G G C P C E
GGCAACCTGGCTGGGAGCATCTGAGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG
G T L R L D M L S L G L R Y L D C V I K E
GTGATGAGGCTCTTCAAGCGCGCTCTCAGGAGGCTCAAGCACTGTGTGTGAGCACTTGAA
V M R L F T F V S S G G Y R T V L Q T F E
CTGGTGTGTTCCAGATCCCAAGGGGTGAGTGTGCAATGATAGCAATCGGTGGAACCTAAC
L D G F Q I P K G W S V M Y S I R D T H
GACAAGAGCTGTGTGCTCAAGAGTGTGAATGTGTTTGAGCTGGAGCGCTGCAAGCGAGG
D T A P V F K D V N V F D F D P D R F S Q A
CGCAGTGAAGGATAAGGATGGCGCGCTCCATCCCATCTGGGCTGGTGTGGGAGG
R S E D K D G R F H Y L P F G G G V R T
TGCTGTGGGCAACACTGGGCAAGTGTCTCTGAGAGTGTGGCGAGTGGCTGTGGCTGAG
C L G K H L A K L F L K V L A V E L A S
ACAAGCGCGCTTCAGAGCTGGGCAACCGGAGCTCTCCCTGCACTCACTCTGGTCCCTGTCTG
T C S R F E L A T R T F P R I T L V P V L
CAACCGTGGAGTGGCTCAGTGTCAAGTCTCTTGTGTGAGCTCAACTCAACTCAGAACTGAGAT
H P V D G L S V K F F G L D S N Q N E T
CTCGCTGAGACAGGCGCATGTGTGAGTGTCAAGGTGTAG
L P E T E A M L S A T V -

FIGURA 10: Determinação da fase aberta de leitura (ORF) e da sequência de aminoácidos teórica de Cyp26B1, através do programa ORFfinder do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Na parte superior, estão representadas todas as fases abertas de leitura encontradas, nas seis fases de leitura. Na parte inferior, pode ser observada a sequência de nucleotídeos da maior fase de leitura encontrada, com a sequência de aminoácidos correspondente.

A presença de uma ORF que codifica uma proteína de 512 aminoácidos, número compatível com as enzimas Cyp26B1 de camundongo e humana e a presença do domínio conservado de citocromos P450 indicam que o transcrito clonado corresponde, efetivamente, ao de interesse.

5.3.3 Predição de novos membros da família Cyp26 em diversos organismos

Em humanos, são conhecidos três membros da família Cyp26, a saber: Cyp26A1, Cyp26B1 e Cyp26C1, sendo que este último ainda não foi descrito em outros organismos.

A disponibilidade das seqüências genômicas de várias espécies, juntamente com ferramentas de alinhamento de Bioinformática, possibilitou a predição de membros da família Cyp26 em vários organismos.

Para a predição da seqüência de Cyp26C1 de rato, a seqüência de aminoácidos da proteína humana correspondente foi alinhada ao genoma de rato, utilizando o BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Foi obtido alinhamento, com alta similaridade, com uma região do cromossomo 1 do genoma de rato. A região codificante do possível transcrito de *cyp26c1* de rato é codificada por 7 *exons*, na região 1q53, entre os nucleotídeos 242151232 e 242143809. A seqüência dos nucleotídeos do DNA genômico de rato que alinhavam com a seqüência protéica de hCyp26C1 foi submetida à tradução *in silico*, resultando na seqüência protéica hipotética de rCyp26C1. Esta seqüência foi submetida à

análise de domínios conservados do NCBI. A presença do domínio protéico conservado de citocromos P450 sugere que a predição estava correta.

Da mesma forma, os membros da família Cyp26 foram preditos para vários organismos, incluindo enzimas de *Drosophila*, zebrafish, xenopus, galinha e cachorro, entre outros, como apresentado no Anexo III.

5.3.4 Análise da similaridade da proteína rCyp26B1 com proteínas de outros organismos e outras proteínas da mesma família

A seqüência protéica teórica de Cyp26B1 foi analisada quanto à similaridade com os outros membros já descritos da família Cyp26 de rato e de outras espécies, além de todas as seqüências de Cyp26 preditas.

O alinhamento de rCyp26A1 (NP_569092.1) e rCyp26B1, através da ferramenta Blast 2 sequences do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) , mostra que as duas proteínas apresentam 44% de identidade e 62% de similaridade de aminoácidos. As proteínas ortólogas humana e de camundongo apresentam maior similaridade com rCyp26B1, a saber, 99% de identidade no caso de mCyp26B1 (NM_175475) e 95% de identidade para hCyp26B1 (NP_063938.1).

O alinhamento múltiplo dos vários membros já descritos da família Cyp26 e das seqüências preditas neste trabalho, através da ferramenta ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), representado na figura 11, mostra que a conservação é mais alta entre os vários ortólogos do que entre os parálogos, sugerindo que os eventos de duplicação tenham ocorrido antes da divergência funcional entre Cyp26A1, Cyp26B1 e Cyp26C1.

FIGURA 11: Dendrograma resultante do alinhamento múltiplo das seqüências protéicas de Cyp26s descritas na literatura, de Cyp26B1 de rato e dos diversos Cyp26 preditos por análise computacional, através do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Nas caixas em vermelho, azul e verde estão agrupados todos os representantes de Cyp26B1, Cyp26C1 e Cyp26A1, respectivamente.

5.4 Expressão de enzimas da família Cyp26

A expressão dos três transcritos da família *cyp26* foi analisada nas células de interesse através de Real Time-PCR. Primeiramente, o perfil de expressão de *cyp26a1*, *cyp26b1* e *cyp26c1* foi analisado em células ST1 de glioma de rato tratadas por diferentes períodos de tempo com atRA, sendo utilizado como controle interno o RNA ribossomal 18S, conforme descrito em Métodos. Os *primers* utilizados para a amplificação foram desenhados com base nas seqüências disponíveis no banco de dados do NCBI. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 12 e na tabela 2.

FIGURA 12: Análise da expressão de *cyp26b1* em células ST1 não tratadas (controle) e tratadas por diversos períodos de tempo com atRA, nas concentrações 10⁻⁶M e 10⁻⁵M, através de Real Time-PCR. O calibrador utilizado foi a amostra controle (sem tratamento com atRA). Gráfico representativo de 3 experimentos independentes.

TABELA 2: Resultados da análise da expressão de Cyp26B1 em células ST1 de glioma de rato, não tratadas (controle) e tratadas com atRA.

Amostra		C _t (desvio)	2 ^{-ΔΔC_t} (desvio)
Controle		22,110 (0,087)	1,000 (0,059)
10 ⁻⁶ M atRA	1h	18,678 (0,069)	4,670 (0,228)
	2h	17,887 (0,532)	10,221 (3,256)
	6h	17,509 (0,107)	10,234 (1,940)
	24h	16,579 (0,146)	18,050 (1,919)
	48h	17,799 (0,220)	10,563 (1,735)
	72h	20,123 (1,080)	5,152 (3,703)
10 ⁻⁷ M atRA	1h	18,580 (0,226)	6,150 (1,042)
	2h	18,360 (0,087)	8,932 (0,554)
	6h	17,052 (0,328)	15,400 (3,928)
	24h	16,467 (0,226)	18,963 (2,199)
	48h	15,259 (0,316)	30,851 (4,421)
	72h	15,015 (0,099)	35,380 (2,523)

O tratamento de ST1 com atRA resulta em indução significativa na expressão de *cyp26b1* ($P < 0,001$, $n = 3$), tanto na concentração de 10⁻⁶M quanto 10⁻⁵M. Quando as células são tratadas com 10⁻⁶M atRA, a expressão máxima é detectada 24h após o tratamento, com indução de cerca de 18 vezes, quando comparada com as células ST1 não tratadas (controle). Após este tempo de tratamento, ocorre uma progressiva diminuição nos níveis transcricionais de *cyp26b1*. O tratamento com 10⁻⁵M atRA, por sua vez, promove indução de *cyp26b1*, sendo que a expressão máxima detectada ocorreu em 72h de tratamento, onde pôde ser

detectada indução de cerca de 35 vezes em relação às células controle. A expressão de *cyp26a1* e de *cyp26c1* não pôde ser detectada em células ST1 através desta metodologia.

Com o objetivo de avaliar se a indução de *cyp26b1* pelo tratamento de células ST1 com atRA é um fenômeno célula- ou espécie-específico, a expressão de *cyp26a1* e *cyp26b1* foi avaliada nas linhagens A172, HOG, T98G, U343MG, U343MG-A, U373MG e U87 de glioma humano, tratadas (ou não) com diferentes concentrações de atRA por 24h.

A expressão de *cyp26a1* (figura 13 e tabela 3) foi detectada apenas em células U373MG tratadas com atRA, mas não em células cultivadas na ausência desta substância. Estes níveis de expressão é, em termos absolutos, maiores do que os apresentados por *cyp26b1* nestas mesmas células e, embora a expressão de *cyp26a1* também seja induzida pelo tratamento destas células com atRA, não apresenta o aumento característico dependente da dose apresentada pela indução de *cyp26b1*.

FIGURA 13: Análise da expressão de *cyp26a1* em células A172, HOG, T98G, U343MG, U343MG-A, U373MG e U87 de glioma humano, tratadas ou não com diferentes concentrações de atRA por 24h, através de Real Time-PCR. Como calibrador, foi utilizada a amostra U373MG, 10⁻⁷M atRA.

TABELA 3: Resultados da análise da expressão de Cyp26A1 em linhagens celulares de glioblastoma humanos, não tratadas (controle) e tratadas com atRA.

Amostra		C _t	Desvio C _t	2 ^{-ΔΔC_t}	Desvio 2 ^{-ΔΔC_t}
A172	Controle	40	0	-	0
	10 ⁻⁷ M atRA	40	0	-	0
	10 ⁻⁶ M atRA	40	0	-	0
	10 ⁻⁵ M atRA	40	0	-	0
HOG	Controle	40	0	-	0
	10 ⁻⁷ M atRA	40	0	-	0
	10 ⁻⁶ M atRA	40	0	-	0
	10 ⁻⁵ M atRA	40	0	-	0
T98G	Controle	40	0	-	0
	10 ⁻⁷ M atRA	38,69	0,8452	0,00046	0,0012
	10 ⁻⁶ M atRA	38,66	0,8874	0,00045	0,0012
	10 ⁻⁵ M atRA	40	0	-	0
U343MG	Controle	40	0	-	0
	10 ⁻⁷ M atRA	40	0	-	0
	10 ⁻⁶ M atRA	40	0	-	0
	10 ⁻⁵ M atRA	40	0	-	0
U343MG-A	Controle	40	0	0,00037	0
	10 ⁻⁷ M atRA	34,79	0,5798	0,01710	0,0085
	10 ⁻⁶ M atRA	34,49	0,3889	0,01563	0,0049
	10 ⁻⁵ M atRA	37,90	1,9802	0,00714	0,0488
U373MG	Controle	39,64	0,3020	0,00032	0,0001
	10 ⁻⁷ M atRA	28,09	0,0495	1	0,0534
	10 ⁻⁶ M atRA	29,25	0,0919	0,92018	0,0938
	10 ⁻⁵ M atRA	28,48	0,1626	0,98623	0,1181
U87	Controle	40	0	-	0
	10 ⁻⁷ M atRA	40	0	-	0
	10 ⁻⁶ M atRA	40	0	-	0
	10 ⁻⁵ M atRA	40	0	-	0

FIGURA 14: Análise da expressão de *cyp26b1* em células A172, HOG, T98G, U343MG, U343MG-A, U373MG e U87 de glioma humano, tratadas ou não com diferentes concentrações de atRA por 24h, através de Real Time-PCR. A expressão em cada linhagem utilizou um calibrador, a saber, A172 10⁻⁷M atRA, HOG controle, T98G controle, U343MG controle, U343MG-A controle, U373MG controle e U87 controle.

TABELA 4: Resultados da análise da expressão de Cyp26B1 em linhagens celulares de glioblastoma humanos, não tratadas (controle) e tratadas com atRA.

Amostra		C_t	Desvio C_t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	Desvio $2^{-\Delta\Delta C_t}$
A172	Controle	40	0	0,022	0,0106
	10^{-7} M atRA	33,973	0,4596	1	0,3751
	10^{-6} M atRA	33,470	0,3394	1,705	0,5452
	10^{-5} M atRA	32,135	0,1485	3,758	0,5456
HOG	Controle	33,715	0,4596	1	0,4068
	10^{-7} M atRA	32,743	0,1060	2,219	0,3851
	10^{-6} M atRA	32,380	0,4808	1,803	0,7871
	10^{-5} M atRA	32,085	0,1909	2,362	0,1559
T98G	Controle	33,150	0,9192	1	0,8920
	10^{-7} M atRA	30,645	0,1626	4,056	0,5499
	10^{-6} M atRA	30,302	0,1414	5,028	0,5239
	10^{-5} M atRA	30,321	0,3394	4,790	1,2732
U343MG	Controle	34,540	0,2970	1	0,2343
	10^{-7} M atRA	32,913	0,2828	2,751	0,6032
	10^{-6} M atRA	32,025	0,2475	3,811	0,8213
	10^{-5} M atRA	30,452	0,2051	11,713	2,0326
U343MG-A	Controle	34,365	0,0070	1	0,0453
	10^{-7} M atRA	33,785	0,4454	1,753	0,6365
	10^{-6} M atRA	33,172	0,1555	2,378	0,2849
	10^{-5} M atRA	31,497	0,3253	6,589	1,6820
U373MG	Controle	37,157	0,6788	1	0,6008
	10^{-7} M atRA	37,106	0,9687	0,953	0,9139
	10^{-6} M atRA	35,491	0,1343	3,160	0,4091
	10^{-5} M atRA	34,165	0,0495	3,364	0,2312
U87	Controle	30,991	0,7212	1	0,6644
	10^{-7} M atRA	28,864	0,0012	6,190	0,6711
	10^{-6} M atRA	27,470	0,2687	12,467	2,8860
	10^{-5} M atRA	27,218	0,1131	16,223	1,3475

A expressão de *cyp26b1* (figura 14 e tabela 4) foi detectada em todas as linhagens de glioma humano analisadas. Além disso, todas as linhagens humanas apresentaram indução da expressão de *cyp26b1* em resposta ao tratamento com atRA. A indução é dose-dependente para todas as linhagens celulares de glioblastoma multiforme (A172, T98G, U343MG, U343MG-A, U373MG e U87), mas não para a linhagem HOG de oligodendroglioma humano, na qual o tratamento com as três concentrações de atRA utilizadas – a saber, 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M – levou à indução de cerca de 2 vezes nos níveis de *cyp26b1*.

A expressão de *cyp26b1* não pôde ser detectada em células A172 não tratadas com atRA; entretanto, o tratamento induziu, em pelo menos 3.000 vezes, os níveis deste transcrito. Em termos absolutos, a maior expressão de *cyp26b1* foi encontrada em células U87, que apresentam níveis de expressão absoluta cerca de 150 vezes maiores do que as outras células testadas, na ausência de atRA, e cerca de 10 a 100 vezes maiores quando comparadas às mesmas células tratadas com atRA. As células U373 apresentaram níveis absolutos de expressão de *cyp26b1* menores do que os apresentados pelas demais linhagens celulares.

Não foi possível detectar a expressão de *cyp26c1* nas linhagens de glioma humano através da metodologia utilizada.

Para avaliar a possibilidade de correlação com amostras clínicas de gliomas de diferentes graus, a expressão de *cyp26a1* e de *cyp26b1* foi avaliada em amostras de tumores, extraídos cirurgicamente de pacientes e classificados de acordo com suas características morfológicas, cedidos pela Profa. Sueli Kazue Nagahashi Marie, do LIM-15 da FM-USP. A expressão de *cyp26b1* foi detectada em todas as

amostras analisadas (figura 15A), porém não foi possível estabelecer uma relação entre os níveis de expressão de *cyp26b1* e a classificação morfológica dos tumores ou a sobrevida dos pacientes.

A expressão de *cyp26a1* foi detectada na maior parte das amostras de gliomas humanos, com exceção de algumas amostras de gliomas de graus I e II (figura 15B). Entretanto, assim como para Cyp26B1, não foi possível estabelecer uma relação entre a expressão de Cyp26A1 e a classificação morfológica ou a sobrevida dos pacientes.

FIGURA 15: Análise da expressão de Cyp26A1 (quadro A) e Cyp26B1 (quadro B) em amostras de cérebro normal e de gliomas humanos por Real Time-PCR. Os dados de expressão foram normalizados utilizando-se como controle interno os RNAs ribossomal 18S e os transcritos de *hprt* e *gapdh*. Os tumores foram classificados de acordo com as características histológicas em graus I, II, III e IV de malignidade. As amostras normais correspondem a amostras de cérebro de pacientes submetidos a lobotomia para tratamento de epilepsia.

5.5 Análise funcional de Cyp26B1

5.5.1 *Clonagem da porção codificante de Cyp26B1*

Para a realização dos ensaios funcionais de *cyp26b1*, foi proposto a super-expressão desta proteína nas linhagens C6, ST1, T98G e P19. Para tanto, a porção codificante de Cyp26B1, contendo 1.539 nucleotídeos, foi amplificada através de RT-PCR, utilizando os *primers* P450cdsF e P450cdsR, conforme descrito em Métodos. O produto de amplificação, mostrado na figura 16, foi clonado no vetor de entrada pENTR2B (sistema Gateway, Invitrogen). Três clones positivos foram selecionados para sequenciamento, visando a confirmação da ausência de mutações.

FIGURA 16: Fracionamento em gel de agarose 1% do produto de amplificação da região codificante de rCyp26B1.

A transferência da região codificante de *cyp26b1* do vetor de entrada pENTR2B para o vetor de expressão em células de mamífero pDEST12.2 foi realizada através de reação de transposição *in vitro*, catalisada pela enzima LR clonase (sistema Gateway, Invitrogen). Uma das colônias positivas, apresentando a seqüência da região codificante de *cyp26b1* correta, foi utilizada para o crescimento de bactérias para extração plasmideal em média escala (*midiprep*) de alta pureza, para transfecção de células de mamífero.

5.5.2 Avaliação da eficiência de transfecção de células C6, ST1, T98G e P19

A eficiência de transfecção das linhagens celulares C6 e ST1, T98G e P19 foi avaliada através da transfecção transitória de uma construção de expressão da proteína fluorescente EGFP, conforme mostra a figura 17. As células T98G, apresentada nos quadros A e B, e as células P19 (figura não apresentada) apresentam eficiência de transfecção relativamente alta, como pode ser observado pela quantidade de células que expressam a proteína EGFP. Já as linhagens C6, apresentada nos quadros C e D, e a variante ST1 (não apresentada) apresentam eficiência de transfecção muito baixa, como pode ser observado pelo baixo número de células que expressam a proteína fluorescente. Para a linhagem ST1, muitos campos de observação no microscópio não apresentam sequer uma célula fluorescente, mesmo após tentativas de otimização do protocolo de transfecção.

FIGURA 17: Microscopia de contraste de fase (quadros A e C) e de fluorescência (quadros B e D) de células T98G (quadros A e B) e C6 (quadros C e D) transfectadas transitoriamente com vetor de expressão de EGFP, para avaliar mostrando a eficiência de transfecção de cada linhagem celular. Estão apresentados campos representativos das células após 48h da transfecção.

5.5.3 Transfecção estável da construção de expressão de *Cyp26B1*

5.5.3.1 Células C6 e ST1 de glioma de rato

As linhagens celulares ST1 e C6 de glioma de rato não apresentaram morte celular completa em nenhuma das concentrações de antibiótico utilizadas. Na experiência anterior do laboratório, estas linhagens apresentam sub-populações de células naturalmente resistentes aos antibióticos utilizados para a seleção de clones transfectantes estáveis. A morte destas células ocorre apenas em concentrações extremamente altas destes compostos, capazes de induzir células transfectantes mais sensíveis à morte. Uma maneira de contornar este problema é a seleção dos transfectantes estáveis com dois antibióticos, os quais devem necessariamente atuar por mecanismos diferentes. Assim, foram realizadas curvas para dupla seleção, utilizando Geneticina, nas concentrações de 0,3 a 1,0 mg/ml e Higromicina, nas concentrações de 0,25 a 0,50 µg/ml. Ambas as células mostraram-se sensíveis à combinação de 350 µg/ml de Higromicina e 500 µg/ml de Geneticina, combinação que foi posteriormente utilizada para a seleção de clones transfectantes estáveis em células C6 e ST1.

Com o intuito de promover uma super-expressão de *Cyp26B1* em células C6 e ST1, estas células foram transfectadas com a construção pDEST12.2-*cyp26b1*cds, assim como o respectivo vetor vazio, que possuem um cassete de resistência para geneticina, foram co-transfectados com o vetor pX343 vazio, que confere resistência a higromicina. Após a transfecção, as células estavelmente transfectadas foram selecionadas com 350 µg/ml de Higromicina e 500 µg/ml de Geneticina.

Após três tentativas, não foi possível isolar uma população policlonal transfectante. Apenas sete clones foram obtidos para as células C6 transfectadas com a construção pDEST12.2-Cyp26B1cds e três clones transfectados com vetor vazio.

5.5.3.2 Células T98G de glioblastoma humano

A construção pDEST12.2-Cyp26B1cds e o respectivo vetor vazio foram transfectados em células T98G. Células estavelmente transfectadas foram selecionadas, através do tratamento com 500 µg/ml de Geneticina. Como a eficiência de transfecção destas células é bastante satisfatória, foram selecionadas populações mistas estavelmente transfectadas, ao invés de clones. No total, foram geradas duas populações mistas transfectadas com o vetor vazio e cinco populações mistas referentes à construção pDEST12.2-Cyp26B1cds.

Estas populações mistas foram testadas quanto à expressão do transgene através de Northern blot, como mostrado na figura 18, podendo ser observado que a expressão da região codificante de Cyp26B1, com aproximadamente 1,5 kb, só pode ser detectada nas populações mistas transfectadas com o vetor de expressão da mesma, mas não nas células controle, não transfectadas ou transfectadas com o respectivo vetor vazio. Entretanto, a expressão ectópica de Cyp26B1 é significativamente inferior à expressão deste gene em células ST1 tratadas com 10^{-5} M atRA por 24h, condição utilizada como controle positivo do experimento de Northern blot.

FIGURA 18: Avaliação da expressão da região codificante de Cyp26B1, por Northern blot, nas populações transfectantes estáveis de T98G por Northern blot. 1- T98G parental; 2 a 6- populações mistas (1 a 5) de T98G, transfectadas com o vetor de expressão de Cyp26B1; 7- população mista (1) transfectada com vetor vazio de T98G; 8- controle positivo, ST1 tratada com 10^{-5} M atRA por 24h.

FIGURA 19: Avaliação da expressão da região codificante de Cyp26B1, por Northern blot, nas populações transfectantes estáveis de P19. 1- controle positivo, ST1 tratada com 10^{-5} M atRA por 24h; 2- P19 parental; 3 e 4- populações mistas de P19 (1 e 2) transfectadas com vetor vazio; 5 a 8- populações mistas de P19 (1 a 4) transfectadas com o vetor de expressão de Cyp26B1.

5.5.3.3 Células P19 de teratocarcinoma de camundongo

Células P19 de teratocarcinoma embrionário foram transfectadas com a construção pDEST-Cyp26B1cds e com o respectivo vetor vazio e os transfectantes estáveis foram selecionados através do tratamento com 400µg/ml de Geneticina. Assim como em T98G, estas células apresentam alta eficiência de transfecção, possibilitando a utilização de populações mistas para os experimentos de análise funcional. Foram isoladas, ao todo, quatro populações mistas transfectadas com a construção para super-expressão de Cyp26B1 e duas populações transfectadas com o vetor vazio. A confirmação da expressão ectópica de Cyp26B1 foi feita através de Northern blot, cujos resultados são apresentados na figura 19.

Todas as populações transfectadas com a construção de expressão de Cyp26B1 apresentam uma banda de aproximadamente 1,5kb, correspondente à região codificante de Cyp26B1, embora de intensidade variável. Assim como o observado para T98G, a expressão do transgene é significativamente menor do que a expressão de Cyp26B1 em células ST1 tratadas com 10^{-5} M atRA por 24h.

5.5.4 *Análise da influência da expressão de Cyp26B1 no crescimento celular*

5.5.4.1 Curva de crescimento em substrato sólido

A influência da expressão de Cyp26B1 na capacidade proliferativa de células C6, T98G e P19 foi avaliada através de ensaio de curva de crescimento em substrato sólido.

5.5.4.1.1 Células C6

O tratamento de células C6 parentais com atRA resulta em inibição da proliferação celular, com aumento no tempo de dobramento e diminuição da densidade de saturação.

Células C6 parentais e os clones transfectantes, correspondentes à construção de expressão de Cyp26B1 e ao vetor vazio, apresentam diferenças significativas no crescimento em substrato sólido, como pode ser observado na figura 20 e na tabela 2. Os clones transfectantes apresentam crescimento bastante heterogêneo, com diferenças significativas entre clones transfectados com o mesmo vetor. Apesar da disto, todos os clones apresentam tempo de dobramento maior e menor densidade de saturação quando comparados à linhagem parental C6, evidenciando menor capacidade de proliferação celular. O tratamento de dos clones transfectantes com atRA promove significativa inibição da proliferação celular, mais acentuada do que o observado para a linhagem C6 parental.

Não foi possível, através do experimento de curva de crescimento, observar nenhuma diferença significativa da proliferação celular de células transfectadas com a construção de expressão de Cyp26B1 ou com o respectivo vetor vazio.

Figura 20: Curvas de crescimento dos clones transfectados estavelmente com a construção de expressão de Cyp26B1, tratados ou não com 10^{-5} M atRA.

Figura 20: continuação

TABELA 5: Tempo de dobramento e densidade de saturação de células C6 parental e dos clones transfectantes, tratados ou não com atRA.

Célula	atRA	Tempo de dobramento (h)	Densidade de saturação (células/cm ²) x 10 ⁶
C6 parental	-	21,9	85,4
	+	24,4	37,6
pDEST-C1	-	39,9	14,1
	+	67,9	54,2
pDEST-C2	-	26,2	40,0
	+	46,9	0,4
pDEST-C3	-	57,5	0,08
	+	Indeterminado	0,01
Cyp26-C1	-	50,0	0,3
	+	93,5	0,04
Cyp26-C2	-	28,9	19,0
	+	40,0	10,6
Cyp26-C3	-	30,7	40,0
	+	53,5	17,4
Cyp26-C4	-	Indeterminado	0,01
	+	Indeterminado	0,01
Cyp26-C5	-	38,3	38,6
	+	Indeterminado	0,01
Cyp26-C6	-	37,6	21,5
	+	58,9	16,7
Cyp26-C7	-	29,5	61,1
	+	62,0	0,7

5.5.4.1.2 Células T98G

O tratamento de células T98G com 10^{-5} M atRA resultou em aumento do tempo de dobramento, tanto para a linhagem parental, quanto para as populações transfectantes correspondentes à construção de expressão de Cyp26B1 e ao respectivo vetor vazio. Para a maior parte das células, o tratamento resultou, ainda, em diminuição na densidade de saturação, com exceção das populações 1 e 4, transfectadas com a construção de expressão de Cyp26B1. Não foi possível, através deste experimento, constatar nenhuma diferença significativa na proliferação de células T98G em resposta à expressão de Cyp26B1.

Figura 21: Curvas de crescimento de células T98G parental e transfectadas estavelmente com o vetor vazio (T98G-pDEST-1 e -2) e com a construção para expressão de *cyp26b1* (T98G-Cyp26-1 a -5), tratadas ou não com *atRA* 10^{-5}M .

TABELA 6: Tempo de dobramento e densidade de saturação de células T98G parental e das populações transfectantes, tratadas ou não com atRA.

Célula	atRA	Tempo de dobramento (h)	Densidade de saturação (cel/cm ²) x 10 ⁶
T98G parental	-	18,8	102,0
	+	31,4	28,3
T98G-pDEST-1	-	26,7	27,2
	+	37,7	13,0
T98G-pDEST-2	-	19,8	77,4
	+	32,3	1,37
T98G-Cyp26-1	-	34,5	10,4
	+	36,3	24,7
T98G-Cyp26-2	-	23,4	31,5
	+	30,1	17,1
T98G-Cyp26-3	-	29,8	28,2
	+	29,8	11,2
T98G-Cyp26-4	-	30,4	6,26
	+	52,6	15,2
T98G-Cyp26-5	-	31,2	15,8
	+	31,7	12,0

5.5.4.1.3 Células P19

Da mesma forma que o observado para células C6 e T98G, o tratamento de células P19 parentais com atRA promove inibição da proliferação celular, evidenciado pelo aumento no tempo de dobramento e diminuição na densidade de saturação. Não há diferenças estatisticamente significantes entre o crescimento das células P19 parentais e transfectadas estavelmente com o vetor vazio (P19-pDEST-1 e -2) e com a construção de expressão de *cyp26b1* (P19-Cyp26-1 a -5).

TABELA 7: Tempo de dobramento e densidade de saturação de células P19 parental e das populações transfectantes, tratadas ou não com atRA.

	atRA	Tempo de dobramento (h)	Densidade de saturação (cel/cm ²) x 10 ⁶
P19 parental	-	15,8	168,0
	+	27,6	10,7
P19-pDEST-1	-	20,5	68,9
	+	36,5	9,58
P19-pDEST-2	-	22,1	32,5
	+	28,5	14,3
P19-Cyp26-1	-	17,1	142,0
	+	26,3	10,7
P19-Cyp26-2	-	21,0	119,0
	+	32,1	18,8
P19-Cyp26-3	-	29,2	28,6
	+	29,8	9,13
P19-Cyp26-4	-	15,7	144,0
	+	25,9	13,5
P19-Cyp26-5	-	15,2	248,0
	+	27,4	32,2

Figura 22: Curvas de crescimento de células P19 parental e transfectadas estavelmente com o vetor vazio (P19-pDEST-1 e -2) e com a construção de expressão de *cyp26b1* (P19-Cyp26-1 a -5), tratadas ou não com atRA $10^{-5}M$.

5.5.4.2 Ensaio de síntese de DNA por incorporação de timidina tritiada

Com a finalidade de complementar os resultados das curvas de crescimento, a influência da expressão de Cyp26B1 na síntese de DNA de células C6, T98G e P19 foi avaliada através de ensaio de incorporação de timidina tritiada, conforme protocolo descrito em Métodos. O resultado está apresentado na figura 23.

5.5.4.2.1 Células C6

Células C6 transfectadas, tanto com o vetor vazio quanto com o vetor de expressão de *cyp26b1*, apresentam diminuição da incorporação de timidina tritiada, nas condições tratadas e não tratadas com 10^{-5} M atRA, em relação às células parentais nas mesmas condições. Esta diminuição tende a ser mais acentuada em células transfectadas com o vetor vazio.

Corroborando com os dados obtidos nos ensaios de curvas de crescimento, o tratamento com atRA de células C6 não transfectadas levam a uma diminuição na incorporação de timidina tritiada, o que reflete uma menor síntese de DNA, resultado da inibição do crescimento celular causada por este tratamento. A mesma resposta pode ser observada para a maioria dos clones transfectados, tanto com o vetor vazio, quanto para a maioria dos clones que expressam *cyp26b1*. Entretanto, o clone C5 apresentara maior incorporação de timidina tritiada quando tratados com atRA das células tratadas em relação à condição controle. Estes resultados estão em concordância com os dados obtidos nos experimentos de curva de crescimento, pois o tratamento das células com atRA leva a uma inibição do crescimento celular em substrato sólido.

5.5.4.2.2 Células T98G

Os transfectantes de T98G, tanto correspondentes ao vetor vazio quanto à construção de expressão de Cyp26B1, apresentaram significativa diminuição na incorporação de timidina tritiada em relação à linhagem parental não-transfectada ($P < 0,001$, $n = 3$).

O tratamento com atRA também levou a uma diminuição na incorporação de timidina, tanto para a linhagem parental quanto para as populações transfectadas com o vetor vazio ($P < 0,001$), refletindo a inibição de crescimento celular causada pelo tratamento. Entretanto, as populações que expressam Cyp26B1 apresentaram aumento dos níveis de incorporação de timidina induzida pelo tratamento com atRA, o que pode refletir uma menor sensibilidade destas células ao tratamento.

5.5.4.2.3 Células P19

Ao contrário do que era esperado, baseando-se nos dados de curva de crescimento, o tratamento de células P19 com atRA levou a um aumento nos níveis de incorporação de timidina tritiada ($P < 0,05$), tanto na linhagem parental quanto nas populações transfectantes. Os transfectantes, tanto contendo o vetor vazio, quanto com a construção de expressão de Cyp26B1, não apresentaram alterações neste perfil de incorporação de timidina tritiada em relação às células P19 parentais.

Figura 23: Avaliação da síntese de DNA, através de ensaio de incorporação de timidina tritiada, de células C6, T98G e P19 e dos respectivos transfectantes contendo o vetor vazio (C6, T98G e P19-pDEST) e a construção de expressão de *cyp26b1* (C6, T98G e P19-Cyp26), tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h.

TABELA 8: Análise da síntese de DNA de células C6, T98G e P19, estavelmente transfectadas com vetor de expressão de Cyp26B1 e com o respectivo vetor vazio.

		Controle		atRA	
		Incorporação relativa (%)	desvio	Incorporação relativa (%)	desvio
C6	Parental	100	3,06	88,90	3,26
	pDEST-C1	59,18	4,10	57,76	3,24
	pDEST-C2	61,22	2,45	53,06	4,12
	pDEST-C3	48,98	3,10	46,94	4,05
	Cyp26-C1	56,33	4,15	57,96	4,10
	Cyp26-C2	68,57	3,27	61,22	4,02
	Cyp26-C3	81,63	4,08	64,49	3,05
	Cyp26-C4	77,55	4,16	63,27	1,83
	Cyp26-C5	48,98	2,08	62,45	3,20
	Cyp26-C6	79,59	2,04	71,43	1,02
	Cyp26-C7	67,35	0,61	59,18	1,63
T98G	Parental	100	2,70	69,42	2,78
	pDEST-1	63,89	2,81	61,10	2,72
	pDEST-2	83,33	4,17	56,39	0,83
	Cyp26-1	48,30	2,22	53,86	4,17
	Cyp26-2	52,78	2,78	66,67	1,11
	Cyp26-3	44,45	2,75	86,11	5,56
	Cyp26-4	69,42	3,89	92,78	2,78
	Cyp26-5	27,76	3,06	66,62	0,83
P19	Parental	100	4,81	120,05	7,26
	pDEST-1	72,05	1,23	163,87	3,24
	pDEST-2	64,59	2,38	135,93	6,37
	Cyp26-1	100,02	3,16	192,30	23,81
	Cyp26-2	103,89	4,74	120,03	8,12
	Cyp26-3	99,75	3,95	212,74	9,53
	Cyp26-4	90,43	5,58	119,46	4,15
	Cyp26-5	172,26	14,34	151,91	2,36

5.5.4.3 Crescimento em suspensão de agarose

A influência da expressão de Cyp26B1 foi também avaliada através de ensaio de crescimento em suspensão de agarose, cujos resultados estão apresentados na figura 24 e tabela 8. O ensaio de crescimento em suspensão de agarose é o experimento *in vitro* que melhor se relaciona à capacidade tumorigênica de células em cultura e, portanto, é um ótimo parâmetro para avaliar o papel de *cyp26b1* na tumorigênese.

5.5.4.3.1 Células C6

O tratamento de células C6 parentais com atRA resulta em uma significativa diminuição na capacidade de formação de colônias em substrato semi-sólido ($P < 0,001$, $n=3$). Por outro lado, a transfecção destas células, não apenas com a construção para expressão de Cyp26B1, como também com o respectivo vetor vazio, resulta em uma inibição praticamente completa da capacidade de crescimento em suspensão de agarose, tanto na presença quanto na ausência de atRA.

5.5.4.3.2 Células T98G

O tratamento das células T98G com atRA resulta em diminuição na capacidade de crescimento em suspensão de agarose, tanto de células parentais, quanto das duas populações transfectantes ($P < 0,001$). As células parentais apresentaram uma maior capacidade de formação de colônias em suspensão de agarose do que as populações transfectantes ($P < 0,05$), tanto na presença quanto na ausência de atRA. Não houve diferenças significativas entre o crescimento de células transfectadas com o vetor vazio e com a construção para expressão de Cyp26B1.

Figura 24: Avaliação da capacidade de crescimento em substrato semi-sólido de células C6, T98G e P19 e os respectivos transfectantes, contendo o vetor vazio pDEST ou a construção de expressão de *cyp26b1*, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h.

TABELA 9: Avaliação da capacidade de crescimento em substrato semi-sólido de células C6, T98G e P19, estavelmente transfectadas com vetor de expressão de Cyp26B1 e com o respectivo vetor vazio.

		Controle		atRA	
		Eficiência de plaqueamento (%)	desvio	Eficiência de plaqueamento (%)	desvio
C6	Parental	32,05	6,94	15,78	3,43
	pDEST-C1	2,04	1,05	0	0
	pDEST-C2	5,03	1,95	0	0
	pDEST-C3	2,97	0,51	0	0,42
	Cyp26-C1	0,09	0,44	0	0
	Cyp26-C2	3,85	1,03	0	0
	Cyp26-C3	5,87	2,07	2,15	1,03
	Cyp26-C4	1,05	0,59	0	0
	Cyp26-C5	2,53	1,52	0	0
	Cyp26-C6	3,94	2,06	0	0
	Cyp26-C7	2,06	0,08	0	0
T98G	Parental	32,51	2,38	18,03	5,01
	pDEST-1	25,76	1,84	12,54	3,17
	pDEST-2	24,62	3,02	13,22	1,28
	Cyp26-1	22,47	2,17	11,01	1,63
	Cyp26-2	27,83	1,89	12,39	1,79
	Cyp26-3	25,11	5,43	10,51	1,57
	Cyp26-4	21,45	3,09	13,50	1,48
	Cyp26-5	24,38	1,30	14,08	1,74
P19	Parental	35,02	6,95	10,04	2,50
	pDEST-1	27,56	4,10	4,44	1,47
	pDEST-2	28,14	2,13	5,10	1,05
	Cyp26-1	25,89	5,01	4,28	1,61
	Cyp26-2	23,85	2,46	7,81	1,22
	Cyp26-3	26,43	3,52	8,23	1,38
	Cyp26-4	24,61	1,39	7,91	0,88
	Cyp26-5	21,95	2,40	7,57	1,07

5.5.4.3.3 Células P19

O tratamento das populações transfectantes de P19, assim como da célula parental, com atRA resulta em diminuição da capacidade de formação de colônia em substrato semi-sólido ($P < 0,001$, $n=3$). As células parentais apresentaram maior capacidade de formação de colônia em substrato semi-sólido do que as populações transfectantes ($P < 0,001$, $n=3$) na ausência de atRA. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o crescimento de células transfectadas com o vetor vazio ou com o vetor de expressão de Cyp26B1, tanto na presença quanto na ausência de atRA.

5.6 Isolamento de variante de C6 resistente ao tratamento com atRA

5.6.1 Enriquecimento da linhagem C6 para células resistentes ao tratamento com atRA

Visando a obtenção de variantes da linhagem C6 resistentes ao tratamento com atRA, estas células foram submetidas ao tratamento com 10^{-5} M atRA por 16 semanas.

Para verificar a eficiência do tratamento no enriquecimento da população para células resistentes ao tratamento com atRA, foi realizado ensaio de crescimento em suspensão de agarose em meio contendo 5% SFB, na presença ou ausência de tratamento com atRA 10^{-5} M, cujos resultados estão apresentados na figura 25 e na tabela 9.

Através deste experimento, verificou-se que o tratamento contínuo das células C6 por 16 semanas com atRA foi efetivo no enriquecimento para células resistentes na população mista de C6. Na célula parental, o tratamento com atRA resulta em inibição de aproximadamente 90% no crescimento em suspensão, enquanto que na população enriquecida, esta inibição é significativamente menor ($P < 0,001$, $n=4$), em torno de 20%.

TABELA 10: Eficiência de plaqueamento em substrato semi-sólido de células C6 parental e da população policlonal resistente ao tratamento com atRA.

	Controle	atRA	Inibição de crescimento (%)
C6 parental	30,7 ($\pm 1,8$)	3,9 ($\pm 1,1$)	89,9
População resistente	15,1 ($\pm 1,6$)	12,1 ($\pm 0,8$)	20,0

Figura 25: Avaliação da eficiência do protocolo de enriquecimento da população polimórfica de C6 para células resistentes ao tratamento com atRA, através de ensaio de crescimento em substrato semi-sólido.

5.6.2 Isolamento de variantes clonais de C6 resistentes ao tratamento com atRA e caracterização por crescimento em substrato semi-sólido

A partir da população mista, comprovadamente enriquecida para células resistentes ao tratamento com atRA, foram isolados variantes clonais de C6 através de plaqueamento em baixa densidade em substrato sólido.

A avaliação da resposta dos nove clones e da linhagem parental C6 ao tratamento com atRA foi realizada através de ensaio de crescimento em suspensão de agarose. O resultado deste experimento está representado na figura 26 e na tabela 11.

Figura 26: Avaliação da sensibilidade de células C6 e dos clones resistentes ao tratamento com atRA, através de ensaio de crescimento em substrato semi-sólido.

TABELA 11: Eficiência de plaqueamento em substrato semi-sólido dos clones resistentes ao tratamento com atRA.

Clone	Controle	atRA	Inibição de crescimento (%)
1	15,6 ($\pm 1,26$)	5,6 ($\pm 1,52$)	64,1
2	16,8 ($\pm 0,65$)	8,0 ($\pm 0,73$)	52,4
3	24,0 ($\pm 3,33$)	8,7 ($\pm 0,78$)	63,8
4	14,3 ($\pm 0,20$)	6,5 ($\pm 0,52$)	54,5
5	18,3 ($\pm 0,85$)	5,3 ($\pm 0,92$)	71,0
6	13,8 ($\pm 0,18$)	9,5 ($\pm 0,50$)	31,2
7	16,5 ($\pm 1,58$)	7,6 ($\pm 1,32$)	53,9
8	15,8 ($\pm 3,05$)	6,3 ($\pm 1,25$)	60,1
9	19,0 ($\pm 1,85$)	4,9 ($\pm 1,56$)	74,2
C6 parental	17,0 ($\pm 0,45$)	3,8 ($\pm 0,21$)	77,6

Comparando os resultados de crescimento em suspensão de agarose apresentados na figura 26, pode ser notado que todos os clones apresentaram maior inibição de formação de colônias do que a população mista da qual os mesmos foram originados. Analisando as condições em que os experimentos foram realizados, pôde ser constatado que, no momento do plaqueamento dos experimentos, a população mista estava sob tratamento com atRA por um longo período de tempo, enquanto que os clones estavam sendo cultivados na ausência desta substância.

Para avaliar a influência desta variável nos resultados dos experimentos, os clones foram mantidos na ausência ou presença de 10^{-5}M atRA durante 2 semanas e a seguir o experimento foi repetido. Os resultados estão apresentados na figura 27 e na tabela 12.

Figura 27: Avaliação da influência do tratamento prévio de células C6 e dos clones resistentes na capacidade de formação de colônias em substrato semi-sólido. O clone 6, em destaque, apresenta a menor inibição de crescimento em suspensão de agarose pelo tratamento com atRA e passou a ser denominado variante C6R, resistente a este tratamento.

TABELA 12: Avaliação da influência do tratamento prévio dos clones resistentes e da linhagem celular C6 na capacidade de crescimento em substrato semi-sólido. Em destaque, o clone 6, que apresenta menor sensibilidade aos efeitos anti-proliferativos de atRA.

Clone	Tratamento prévio com atRA					
	-			+		
	Controle	atRA	Inibição (%)	Controle	atRA	Inibição (%)
1	15,6	5,6	64,1	14,4	7,8	45,8
2	16,8	8,0	52,4	13,5	9,4	30,4
3	24,0	8,7	63,8	15,6	9,4	39,7
4	14,3	6,5	54,5	13,8	6,1	55,8
5	18,3	5,3	71,0	13,9	5,9	57,6
6	13,8	9,5	31,2	12,4	11,2	9,7
7	16,5	7,6	53,9	14,2	8,1	43,0
8	15,8	6,3	60,1	13,4	6,8	49,3
9	19,0	4,9	74,2	14,6	7,6	47,9
C6 parental	17,0	3,8	77,6	13,2	4,8	63,6

Os dados apresentados na figura 27 e na tabela 12 indicam que o tratamento das células previamente ao plaqueamento em meio semi-sólido resulta em menor inibição de formação de colônias pelo tratamento com atRA. Isso se deve tanto à menor eficiência de plaqueamento destas células na condição controle, quanto ao aumento da formação de colônias na condição tratada.

Observando particularmente o clone 6, nota-se que o tratamento com atRA causa pequena inibição de formação de colônias em meio semi-sólido, especialmente quando as células são tratadas previamente ao

plaqueamento em suspensão de agarose. Comparando com a linhagem C6 parental, a resposta deste clone ao tratamento é significativamente menor ($P < 0,001$), indicando que esta célula pode ser considerada uma variante de C6 resistente ao tratamento com atRA. O clone foi, então, denominado variante C6R, remetendo a sua resistência ao tratamento com atRA.

5.6.3 Análise da responsividade da variante C6R ao tratamento com atRA através de curva de crescimento em substrato sólido

Devido aos resultados promissores apresentados por C6R nos experimentos de crescimento em substrato semi-sólido, foram realizadas curvas de crescimento para avaliar a influência do tratamento no crescimento destas células em substrato sólido. Além da variante C6R, foram testados nestes experimentos a linhagem parental C6 e sua variante ST1, sabidamente sensível aos efeitos anti-proliferativos de atRA.

FIGURA 28: Curvas de crescimento em substrato sólido das células C6, ST1 e do clone 6 resistente ao tratamento com atRA, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA, em meio suplementado com 0,5%, 2% e 5% SFB.

FIGURA 29: Análise dos dados obtidos a partir das curvas de crescimento da linhagem celular C6 e de suas variantes ST1 e C6R. A) Densidade de saturação de células C6, ST1 e C6R. B) Tempo de dobramento de células C6, ST1 e C6R, em horas.

A linhagem celular C6 e suas variantes ST1 e C6R apresentam crescimento bastante semelhante na ausência de atRA, conforme pode ser observado nas linhas contínuas dos gráficos da figura 28. Para todas as células, o aumento da concentração de SFB no meio resulta em aumento da proliferação celular e da densidade de saturação, que é atingido entre o sétimo e o nono dia do experimento.

Além disso, pode ser observado que o tratamento com atRA resulta em inibição do crescimento em substrato sólido em todas as células analisadas. O tratamento das células em meio contendo 0,5% SFB resulta em completa inibição do crescimento celular e até mesmo morte das células, resultando em número de células abaixo da quantidade inicialmente plaqueada, como pode ser observado nos pontos dos dias 5, 7 e 9 para as células ST1 e no ponto do dia 9 para C6R.

Uma diferença significativa pode ser observada entre o crescimento de C6R e as linhagens celulares C6 e ST1 na presença de atRA. Para as últimas, o tratamento com atRA na presença de 5% SFB (apresentado na figura como uma linha magenta interrompida) resulta em crescimento similar ao de células em meio contendo 0,5% SFB, na ausência de atRA (representado pela linha azul contínua). Entretanto, o tratamento de células da variante C6R com atRA nas mesmas condições resulta em crescimento similar ao de células em meio contendo 2% SFB (linha verde contínua), enquanto que o crescimento de células em meio contendo 0,5% SFB (linha azul contínua) é similar ao de células tratadas com atRA na presença de 2% SFB (linha verde interrompida).

5.6.4 Análise da capacidade tumorigênica de C6R

Com o intuito de avaliar se a variante C6R mantém as características tumorigênicas da linhagem C6, as células foram injetadas em camundongos imunodeprimidos do tipo *nude*.

Neste ensaio, pôde ser observado que a linhagem parental C6 e a variante C6R foram capazes de gerar tumores nos animais. Além disso, tumores formados nos animais injetados com células da variante C6R tendem a ser maiores do que os formados pela injeção de células C6, como mostra os resultados da figura 30, mas estes dados não são estatisticamente significantes.

FIGURA 30: Análise da capacidade tumorigênica de células C6 e C6R, através de injeção subcutânea em camundongos do tipo *nude*. O gráfico apresenta o peso dos tumores, removidos

5.7 Caracterização molecular de C6R

5.7.1 Genes induzidos por atRA na variante ST1

Com o intuito de entender o mecanismo de resistência de células C6R ao tratamento com atRA, a expressão de alguns genes foi quantificada, através de *Real Time PCR*, em células da variante C6R e da linhagem parental C6, submetidas ou não ao tratamento com 10^{-5} M atRA por 24h ou 48h. Primeiramente, foi analisada a expressão de alguns genes já sabidamente regulados por atRA na variante ST1, a saber, *Cyp26B1*, *Eya2*, *Gem*, *Okl38* e *Spi3*.

A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada através do método $\Delta\Delta C_t$, conforme descrito em Métodos. Para normalizar a expressão dos mesmos nas diferentes amostras, foi utilizada a média geométrica de quatro controles internos, a saber, *GAPDH*, *18S rRNA*, β -Actina e HPRT.

FIGURA 31: Expressão relativa de genes de interesse em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h.
A) Cyp26B1, utilizando a amostra C6 controle como calibrador

TABELA 13: Resultados da análise da expressão de Cyp26B1 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C_t (desvio)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ (desvio)
C6	Controle	28,352 (0,172)	1,000 (0,127)
	24h atRA	24,481 (0,159)	8,695 (1,015)
	48h atRA	24,519 (0,525)	13,883 (5,090)
C6R	Controle	28,785 (0,261)	0,744 (0,148)
	24h atRA	26,297 (0,281)	2,908 (0,574)
	48h atRA	26,877 (0,219)	2,174 (0,358)

FIGURA 31: Expressão relativa de genes de interesse em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h.
B) Eya2, utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 14: Resultados da análise da expressão de Eya2 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C _t (desvio)	2 ^{-ΔΔC_t} (desvio)
C6	Controle	29,373 (0,270)	1,000 (0,206)
	24h atRA	25,158 (0,233)	10,816 (1,900)
	48h atRA	26,641 (0,135)	6,488 (0,638)
C6R	Controle	30,925 (0,717)	0,343 (0,221)
	24h atRA	28,126 (0,095)	1,664 (0,113)
	48h atRA	28,488 (0,434)	1,446 (0,507)

FIGURA 31: Expressão relativa de genes de interesse em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h.
C) Gem, utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 15: Resultados da análise da expressão de Gem na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C_t (desvio)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ (desvio)
C6	Controle	30,956 (0,483)	1,000 (0,219)
	24h atRA	27,397 (0,187)	6,169 (0,402)
	48h atRA	28,483 (0,562)	4,085 (1,231)
C6R	Controle	31,273 (0,190)	0,712 (0,068)
	24h atRA	30,018 (0,142)	1,126 (0,117)
	48h atRA	28,938 (0,653)	3,451 (0,905)

FIGURA 31: Expressão relativa de genes de interesse em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h.
D) Oik38, utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 16: Resultados da análise da expressão de Oik38 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C_t (desvio)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ (desvio)
C6	Controle	33,887 (0,913)	1,000 (1,134)
	24h atRA	30,102 (0,226)	7,349 (1,198)
	48h atRA	31,535 (1,042)	3,952 (1,637)
C6R	Controle	33,585 (0,418)	0,925 (0,156)
	24h atRA	32,075 (0,547)	2,142 (1,351)
	48h atRA	32,498 (0,581)	1,911 (0,956)

FIGURA 31: Expressão relativa de genes de interesse em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h.
E) Spi3, utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 17: Resultados da análise da expressão de Eya2 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C_t (desvio)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ (desvio)
C6	Controle	24,863 (0,210)	1,000 (0,156)
	24h atRA	21,190 (0,262)	7,426 (1,477)
	48h atRA	22,579 (0,183)	4,749 (0,634)
C6R	Controle	25,319 (0,175)	0,732 (0,094)
	24h atRA	24,076 (0,188)	1,205 (0,156)
	48h atRA	23,878 (0,104)	1,536 (0,114)

Como pode ser observado no quadro A da figura 31 e na tabela 12, a expressão de Cyp26B1 é diferente entre as células C6 e C6R. O tratamento com 10^{-5} M atRA de células C6 por 48h resulta em indução de aproximadamente 13 vezes na expressão de Cyp26B1. Em células C6R, o mesmo tratamento resulta em indução de apenas 2,5 vezes.

A expressão de Spi3 também apresenta-se diferente entre as células C6 e C6R, como pode ser observado no quadro E da figura 31 e na tabela . O tratamento de C6 com 10^{-5} M atRA por 24h resulta na indução de aproximadamente 8,5 vezes em relação a células não-tratadas, seguida por uma queda para aproximadamente 4,5 vezes com o tratamento por 48h. Já nas células resistentes, a indução máxima atingida em 48h é de 1,7 vezes.

O mesmo fenômeno pode ser observado para os genes Eya2, Gem e Okl38. O tratamento das células C6 com 24h atRA causa uma acentuada indução na expressão dos genes, seguida por uma diminuição considerável 48h após o tratamento. Quando tratadas nas mesmas condições, células C6R, resistentes ao tratamento com atRA, apresentam indução significativamente menor da expressão destes transcritos.

5.7.2 Receptores e proteínas ligantes de ácido retinóico

A expressão dos receptores de ácido retinóico foi também avaliada em C6 e C6R, submetidas (ou não) ao tratamento com atRA. Para tanto, foram desenhados oligonucleotídeos que reconhecem especificamente cada tipo de receptor – RARs e RXRs α , β e γ , que, por outro lado, não faziam distinção entre as diferentes isoformas de cada tipo de receptor.

FIGURA 32: Expressão relativa de receptores de retinoides em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h.
A. RAR α , utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 18: Resultados da análise da expressão de RAR α na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C _t (desvio)	2 ^{-ΔΔC_t} (desvio)
C6	Controle	28,837 (0,802)	1,000 (0,741)
	24h atRA	28,847 (0,833)	0,870 (0,452)
	48h atRA	28,668 (0,506)	1,097 (0,460)
C6R	Controle	28,447 (0,804)	1,317 (0,983)
	24h atRA	27,718 (0,678)	1,521 (0,913)
	48h atRA	28,717 (0,941)	0,970 (0,782)

FIGURA 32: Expressão relativa de receptores de retinoides em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h.
B. RAR β , utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 19: Resultados da análise da expressão de RAR β na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C _t (desvio)	2 ^{-ΔΔC_t} (desvio)
C6	Controle	36,131 (1,614)	1,000 (2,061)
	24h atRA	30,516 (0,566)	28,544 (13,709)
	48h atRA	30,563 (0,586)	46,213 (23,146)
C6R	Controle	36,273 (0,860)	0,912 (0,744)
	24h atRA	32,622 (0,897)	7,982 (6,887)
	48h atRA	33,497 (0,893)	4,858 (4,165)

FIGURA 32, parte 2: Expressão relativa de receptores de retinoides em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h. C. RAR γ , utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 20: Resultados da análise da expressão de RAR γ na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C _t (desvio)	2 ^{-ΔΔC_t} (desvio)
C6	Controle	27,223 (0,402)	1,000 (0,319)
	24h atRA	26,291 (0,399)	1,109 (0,354)
	48h atRA	26,298 (0,313)	1,850 (0,448)
C6R	Controle	26,792 (0,439)	1,352 (0,481)
	24h atRA	26,240 (0,429)	1,382 (0,211)
	48h atRA	27,108 (0,846)	0,846 (0,293)

FIGURA 32, parte 2: Expressão relativa de receptores de retinoides em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h.
D. RXR α , utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 21: Resultados da análise da expressão de RXR α na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C _t (desvio)	2 ^{-ΔΔC_t} (desvio)
C6	Controle	31,202 (0,389)	1,000 (0,310)
	24h atRA	31,766 (0,772)	0,394 (0,279)
	48h atRA	31,103 (0,431)	1,045 (0,363)
C6R	Controle	31,338 (0,422)	0,914 (0,311)
	24h atRA	30,935 (0,254)	0,843 (0,163)
	48h atRA	31,334 (0,322)	0,714 (0,178)

FIGURA 32: Expressão relativa de receptores de retinoides em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h. E. RXR β , utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 22: Resultados da análise da expressão de RXR β na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C _t (desvio)	2 ^{-ΔΔC_t} (desvio)
C6	Controle	30,212 (0,428)	1,000 (0,346)
	24h atRA	29,172 (0,117)	1,198 (0,101)
	48h atRA	30,090 (0,779)	1,062 (0,761)
C6R	Controle	30,110 (0,361)	1,079 (0,307)
	24h atRA	29,525 (0,411)	1,128 (0,372)
	48h atRA	30,245 (0,546)	0,900 (0,352)

FIGURA 32, parte 3: Expressão relativa de receptores de retinoides em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h.
F. RXR γ , utilizando a amostra C6R – controle como calibrador.

TABELA 23: Resultados da análise da expressão de RXR γ na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C _t (desvio)	2 ^{-ΔΔC_t} (desvio)
C6	Controle	40,000 (0,139)	0,0042 (6,78E-04)
	24h atRA	40,000 (0,000)	0,0016 (5,34E-05)
	48h atRA	39,946 (0,116)	0,0045 (5,62E-04)
C6R	Controle	31,560 (0,594)	1,000 (0,509)
	24h atRA	34,042 (1,116)	0,125 (0,146)
	48h atRA	31,783 (0,776)	0,667 (0,475)

Os resultados mostram que:

- **RAR α** : A expressão parece ser ligeiramente maior em células C6R, porém esta diferença não é estatisticamente significativa. Além disso, o tratamento com atRA de células C6 parece influenciar negativamente os níveis transcricionais de RAR α , mas o mesmo tratamento em células C6R parece surtir efeito oposto. Estas diferenças também não são estatisticamente significativas.
- **RAR β** : A expressão de RAR β em células C6 é fortemente induzida pelo tratamento com atRA, atingindo níveis quase 30 vezes maiores em células tratadas por 48h, em relação a células controle. Esta indução é consideravelmente menor em células C6R, onde o nível máximo de indução atingido durante o tratamento analisado é de aproximadamente 5 vezes.
- **RAR γ** : Os receptores da classe RAR γ representam o tipo de receptor mais expresso, dentre os analisados, tanto em células C6 quanto em células C6R. O tratamento de células C6 com 10^{-5} M atRA resulta em indução significativa, de cerca de 1,8 vezes, na expressão dos receptores desta classe, enquanto que o mesmo tratamento em células C6R inibe a expressão deste transcrito.
- **RXR α** : O tratamento de células C6 resulta em inibição significativa em 24h de tratamento, retornando aos níveis basais 48h após o tratamento. Em células C6R, há uma tendência de inibição progressiva de RXR α .
- **RXR β** : Não há diferenças significativas de sua expressão entre as duas linhagens analisadas e o tratamento não altera significativamente sua expressão.

- **RXR γ** : A expressão dos receptores desta classe não pôde ser detectada, através da metodologia adotada, em células C6. Em células C6R, a expressão é comparável à apresentada por RXR α e RXR β . O tratamento com atRA 10⁻⁵M causa inibição temporária, mas significativa, de sua expressão.

As proteínas celulares de ligação de ácido retinóico – CRABP-1 e CRABP-2 – também apresentam diferenças marcantes de expressão entre as células C6 parentais e a variante C6R resistente ao tratamento com atRA, conforme pode ser observado no gráfico da figura 33.

Células C6 parentais expressam o transcrito de CRABP-1 de forma constitutiva, não ocorrendo indução com os tratamentos com atRA realizados nestes experimentos. Células C6R apresentam níveis de expressão de CRABP-1 praticamente indetectáveis pela metodologia utilizada. A expressão de CRABP-2, por sua vez, é maior nas células resistentes do que na linhagem parental. As células C6 apresentam uma pequena indução na expressão de CRABP-2 após 24h de tratamento, mas os níveis transcrpcionais retornam ao basal após 48h de tratamento. As células C6R, entretanto, apresentam níveis basais de expressão do mRNA de CRABP-2 cerca de 10 vezes maiores do que o apresentado por C6, sendo que a expressão é ainda induzida pelo tratamento com atRA por 48h, atingindo níveis cerca de 17 vezes maiores do que os níveis basais apresentados por C6.

FIGURA 33: Expressão relativa de proteína de ligação de ácido retinóico – CRABP em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h. A. CRABP-1, utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 24: Resultados da análise da expressão de CRABP-1 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C_t (desvio)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ (desvio)
C6	Controle	32,105 (0,091)	1,000 (0,066)
	24h atRA	31,224 (0,084)	1,076 (0,065)
	48h atRA	32,198 (0,226)	0,914 (0,155)
C6R	Controle	36,020 (0,004)	0,067 (1,02E-5)
	24h atRA	36,803 (0,001)	0,027(5,21E-6)
	48h atRA	36,335 (0,002)	0,042 (7,40E-6)

FIGURA 33: Expressão relativa de proteína de ligação de ácido retinóico – CRABP em células C6 e C6R, tratadas ou não com 10^{-5} M atRA por 24h e 48h. B. CRABP-2, utilizando a amostra C6 – controle como calibrador.

TABELA 25: Resultados da análise da expressão de CRABP-2 na linhagem C6 parental e na variante C6R resistente ao tratamento com atRA.

Amostra		C_t (desvio)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ (desvio)
C6	Controle	34,143 (0,615)	1,000 (0,532)
	24h atRA	31,641 (0,495)	3,306 (1,353)
	48h atRA	33,867 (1,223)	1,186 (1,582)
C6R	Controle	30,801 (0,149)	10,214 (0,034)
	24h atRA	30,289 (0,381)	10,068 (0,114)
	48h atRA	29,655 (0,530)	17,594 (0,055)

6 DISCUSSÃO

6.1 Clonagem e descrição do transcrito completo de Cyp26B1 de rato

A clonagem do transcrito completo de Cyp26B1 de rato foi feita através de RT-PCR, utilizando *primers* desenhados com base em seqüências de ESTs, previamente clonadas em nosso laboratório como sendo induzidas em células ST1 tratadas com atRA. Foi possível a amplificação de um fragmento de aproximadamente 4,5 Kpb, tamanho compatível com os transcritos de Cyp26B1 humano e de camundongo previamente descritos (White et al, 2000; MacLean et al, 2001). Este inserto foi clonado no vetor de clonagem pBlueScript SK⁻.

Para o seqüenciamento do transcrito completo de Cyp26B1, foram adotadas 3 diferentes metodologias. A primeira consistiu no seqüenciamento direto de Cyp26B1 clonado, utilizando os *primers* que alinham especificamente ao vetor de clonagem, que forneceu dados que contribuíram para a determinação da seqüência das extremidades do transcrito de Cyp26B1. As outras duas metodologias utilizadas tinham como objetivo gerar fragmentos relativamente pequenos de Cyp26B1 os quais, clonados em vetor plasmideal, possibilitariam a determinação da seqüência deste transcrito. Para tanto, o transcrito de Cyp26B1 foi submetido à digestão com as enzimas de restrição AvaI e HinfI e à fragmentação randômica por sonicação. Por estas duas metodologias, foram geradas as seqüências que foram imprescindíveis para a determinação da região intermediária do transcrito. Entretanto, a metodologia que utilizou a digestão de Cyp26B1 com as enzimas de

restrição AvaI e HinfI gerou uma grande quantidade de clones quiméricos, que tiveram que ser checados e retirados manualmente para não interferir na montagem final.

Após a determinação da seqüência de Cyp26B1 de rato, várias análises computacionais foram realizadas com o objetivo de descrever este novo transcrito.

- Cyp26B1 é codificado por 6 exons na região 4q34 do cromossomo 4 do genoma de rato.
- A região codificante, à semelhança dos transcritos de camundongo e humano, representa 1.539 nucleotídeos, codificando uma proteína com 512 aminoácidos, que contém o domínio protéico conservado de enzimas da família P450.
- A proteína Cyp26B1 de rato apresenta 99% e 95% de identidade com os ortólogos já descritos de camundongo e humano, respectivamente. A conservação entre Cyp26A1 e Cyp26B1 de rato é menor, sendo que o alinhamento entre as duas proteínas aponta 44% de identidade e 62% de similaridade de aminoácidos.

Além das análises computacionais da seqüência obtida de Cyp26B1 de rato, diversas seqüências de membros da família Cyp26 foram deduzidas, utilizando as seqüências genômicas disponíveis. Puderam ser deduzidas as seqüências de Cyp26 de *Drosophila megalogaster* e *Drosophila pseudoobscura*, Cyp26A1 de fugu, tetraodon, *Xenopus tropicallis*, opossum, cachorro e porco, Cyp26B1 de fugu, zebrafish, opossum e cachorro e Cyp26C1 de tetraodon, *Xenopus tropicallis*, opossum, rato, camundongo e chimpanzé.

Em bactérias, não foi possível a predição de proteínas da família Cyp26, embora a seqüência genômica completa de vários organismos já

esteja disponível. A comparação entre Cyp26s e os genomas analisados resulta em alguns alinhamentos, que, entretanto, não eram alinhamentos perfeitos e apresentavam probabilidade de ocorrência ao acaso relativamente alta. Analisando estes alinhamentos, observou-se que eles representavam apenas o domínio conservado dos citocromos P450, de aproximadamente 400 aminoácidos e, portanto estas seqüências devem corresponder a outras proteínas da classe dos citocromos P450 e que provavelmente enzimas Cyp26 específicas para metabolização de retinóides tenham surgido em algum organismo mais avançado na escala evolutiva.

Embora os genomas de *Drosophila megalogaster* e *Drosophila pseudoobscura* já tenham sido finalizados, os três membros da família Cyp26 alinharam com apenas uma região do genoma, sugerindo que, nestes organismos, exista apenas um membro da família Cyp26.

Várias seqüências não puderam ser preditas com sucesso, devido à falta de qualidade na seqüência genômica nas regiões destes genes, como é o caso de Cyp26A1 e Cyp26B1 de chimpanzé, Cyp26B1 e Cyp26C1 de porco, de Cyp26C1 de cachorro e fugu.

Os membros da família Cyp26 já descritos e os novos membros preditos foram comparados através do alinhamento múltiplo das seqüências protéicas, utilizando o programa ClustalW. Esta análise mostrou que Cyp26A1, Cyp26B1 e Cyp26C1 não são tão similares entre si quanto seus ortólogos, incluindo organismos evolutivamente bastante distantes, como peixes (fugu, tetraodon e zebrafish), anfíbios (*Xenopus*), aves (galinha) e mamíferos (opossum, rato, camundongo, cachorro, porco, chimpanzé e humanos).

A função das enzimas da família Cyp26 foi previamente descrita como sendo a metabolização de ácido retinóico a formas mais polares, especialmente através da hidroxilação do carbono 4. Alguns trabalhos sugerem que não há diferenças funcionais entre as enzimas. Entretanto, a alta similaridade entre os ortólogos de organismos evolutivamente bastante distantes, aliada à expressão espaço-temporal específica dos diversos Cyp26s em embriões de camundongo, indica que estas enzimas podem ter sofrido uma divergência funcional e, assim, que estas enzimas possam desempenhar papéis biológicos diferentes.

6.2 Análise funcional de Cyp26B1

Vários trabalhos têm sido publicados nos últimos anos descrevendo o papel de enzimas da família Cyp26 no desenvolvimento embrionário (Abu-Abed et al, 2001; MacLean et al, 2001; Reijntjes et al, 2004; Tahayato et al, 2003; Trofimova-Griffin et al, 2002). Alguns trabalhos sugerem, ainda, o papel de Cyp26A1 na resistência tumoral ao tratamento com atRA (Armstrong et al, 2005; Kim et al, 2002; Njar, 2002; Won et al, 2004). Nenhum trabalho semelhante foi conduzido para avaliar a importância de Cyp26B1 neste contexto.

A análise do papel de Cyp26B1 em células de glioma foi realizada neste trabalho através da super-expressão da região codificante e avaliação do crescimento das células transfectantes em substrato sólido e semi-sólido. As linhagens C6 de glioma de rato e T98G de glioblastoma humano e P19 de teratocarcinoma de camundongo foram utilizadas para estas análises. A baixa eficiência de transfecção das células ST1 impediu que esta linhagem fosse utilizada com sucesso para os ensaios funcionais de Cyp26B1.

Células transfectantes estáveis que super-expressam a região codificante de Cyp26B1 foram geradas para as linhagens C6, T98G e P19. Os níveis de expressão do transgene, embora bastante superior à endógena em células não tratadas, é incomparavelmente menor do que a em células ST1 tratadas com 10^{-5} M atRA, condição utilizada como controle positivo de expressão de Cyp26B1.

A linhagem C6 se mostrou menos adequada para os experimentos de análise funcional através de super-expressão de Cyp26B1, devido ao grande efeito causado pela transfecção e integração de DNA, especialmente no ensaio de crescimento em substrato semi-sólido. Efeito similar já havia sido anteriormente observado em nosso laboratório para células ST1, constituindo um obstáculo importante para a utilização destas linhagens celulares em estudos funcionais. Além disso, o estabelecimento de populações policlonais estavelmente transfectadas é mais adequado à análise funcional do que o isolamento de clones transfectantes, devido à alta variação clonal e à necessidade de isolamento de um grande número de clones para a obtenção de um resultado significativo. Recentemente, foi observado, em nosso laboratório, que a geração de células geneticamente modificadas através da infecção com retrovírus recombinantes é bastante eficaz e as células resultantes não apresentam alteração de comportamento não associado à expressão dos transgenes analisados.

Os ensaios de curva de crescimento em substrato sólido, síntese de DNA por incorporação de timidina tritiada e capacidade de formação de colônias em meio semi-sólido mostraram que não há diferenças significativas entre células C6, T98G e P19 que expressam Cyp26B1 e células controle, transfectadas estavelmente com o vetor vazio. Para as células T98G e P19, também não há diferenças significativas entre estas e células não transfectantes.

As enzimas da família Cyp26 possuem um papel fisiológico extremamente importante, pois permitem a manutenção dos níveis adequados de retinóides nos tecidos e, através da metabolização de ácido retinóico a compostos mais polares, auxiliam na detoxificação das células, protegendo as mesmas dos efeitos nocivos que esta substância provoca quando em concentrações elevadas. Era esperado que a expressão de Cyp26B1 exógeno conferisse certa resistência das células transfectantes aos efeitos anti-proliferativos de atRA. Entretanto, o tratamento das células com atRA promove forte indução de Cyp26B1 endógeno, que atinge níveis transcricionais incomparavelmente maiores do que os obtidos através da transfecção das células com a construção pDEST-Cyp26B1, mascarando qualquer possível efeito causado pela expressão exógena.

Uma possibilidade para contornar este problema e analisar a função de Cyp26B1 nas células de interesse é a utilização de metodologias que permitam o silenciamento da expressão de Cyp26B1, ao invés da sua super-expressão. A transdução/transfecção de vetores codificantes para shRNA (*short hairpin RNA*) é uma abordagem especialmente interessante, pois possibilitaria o silenciamento da expressão endógena, sem comprometer expressão exógena de Cyp26B1, permitindo avaliar o efetivo papel deste gene na proliferação celular e responsividade ao tratamento das células com atRA.

6.3 Obtenção de variantes de C6 resistentes ao tratamento com ácido retinóico

A obtenção de variantes de células C6 resistentes ao tratamento com atRA pode representar uma ferramenta importante para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da resistência de

células de glioma ao tratamento com este agente anti-tumoral, o que, por sua vez, pode fornecer indicações terapêuticas importantes para a superação deste problema.

Com a finalidade de isolar variantes de células C6 resistentes ao tratamento com atRA, esta linhagem celular foi submetida ao tratamento com atRA por 16 semanas. Estudos prévios *in vitro* mostraram que a resistência aos retinóides pode ser induzida pelo contínuo tratamento das células com altas concentrações de ácido retinóico. Esta metodologia foi eficaz no enriquecimento da população polimórfica de C6 para células resistentes ao tratamento, como pôde ser observado pelos ensaios de crescimento em meio semi-sólido.

A partir da população mista, vários clones foram isolados e testados quanto à resposta individual ao tratamento com atRA, através de ensaio de crescimento em substrato semi-sólido.

O tratamento da maioria dos clones com atRA resultou em diminuição da eficiência de plaqueamento, em maior ou menor grau, indicando que os mesmos não são completamente resistentes aos efeitos de atRA. Entretanto, a inibição na formação de colônias causada pelo tratamento é, na maioria dos clones, menor do que a inibição causada em C6, indicando que, apesar de não serem completamente resistentes ao tratamento, os clones apresentam menor sensibilidade aos efeitos anti-proliferativos de atRA do que a linhagem parental C6.

Foi constatado que o clone 6, que posteriormente passou a ser chamado de variante C6R, apresenta menor resposta anti-proliferativa ao tratamento com atRA, quando comparado com os outros clones obtidos, a linhagem parental C6 e a variante ST1 previamente isolada em nosso laboratório. Estes resultados foram confirmados através de curvas de

crescimento em substrato sólido, que mostram que a variante C6R apresenta menor inibição de crescimento pelo tratamento com atRA do que a linhagem parental C6 ou a variante ST1 previamente isolada em nosso laboratório.

Através do ensaio de crescimento em meio semi-sólido, foi possível verificar que o tratamento das células com atRA, previamente ao plaqueamento em suspensão de agarose, aumenta a capacidade das mesmas de formar de colônias neste substrato. Estes resultados indicam que a resistência ao tratamento com atRA pode ser parcialmente induzida pelo próprio tratamento.

A origem das alterações que culminam com a resistência foi investigada neste trabalho. As células tumorais, geneticamente instáveis, podem sofrer mutações que conferem resistência ao tratamento. Entre as mutações já descritas, devem ser destacadas as mutações em genes de receptores de ácido retinóico (RARs) e proteínas celulares de ligação a ácido retinóico (CRABPs). Por outro lado, células naturalmente resistentes ao tratamento podem ser indetectáveis no início do tratamento, mas são selecionadas conforme o desenvolvimento do tratamento, favorecidas por uma vantagem proliferativa em relação às demais células. Entretanto, algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar este fenômeno. Primeiramente, a indução de resistência pode estar relacionada à indução de enzimas metabolizadoras de atRA, dentre as quais podemos destacar Cyp26B1. Altos níveis destas enzimas, atingidas por tratamento prévio com atRA, podem aumentar a metabolização de atRA a compostos mais solúveis e inativos, permitindo que a célula sobreviva e cresça em condições mais exigentes, como no caso de suspensão de agarose. De fato, células leucêmicas, obtidas de pacientes clinicamente resistentes ao tratamento com retinóides, mantiveram a sensibilidade à atividade

diferenciadora *in vitro*, sustentando a possibilidade de que enzimas responsáveis pelo catabolismo da droga sejam induzidas pelo tratamento contínuo (Muindi et al, 1992).

A resistência ao tratamento com retinóides pode, ainda, estar relacionada com mutações ou alterações na expressão de receptores de retinóides das classes RAR e RXR. A expressão de membros da família dos receptores de retinóides pode ser modulada pelo tratamento com o seu próprio ligante, através da ligação de outros receptores ativos em sua região promotora. A alteração da expressão de qualquer membro das famílias de receptores de retinóides pode bloquear ou ativar cascatas de sinalização, culminando com a alteração na expressão de vários genes importantes para a resposta aos efeitos anti-tumorais de atRA.

Visando compreender melhor os mecanismos de resistência da variante C6R ao tratamento com atRA, a expressão de alguns genes foi analisada através de experimentos de Real Time-PCR. Os genes analisados estão basicamente enquadrados em duas categorias: genes induzidos pelo tratamento com atRA em células ST1 de glioma de rato, conhecidamente sensíveis aos efeitos anti-tumorais de atRA (Bengtson, 2001); outras enzimas metabolizadoras de atRA da família Cyp26, receptores de retinóides das famílias RAR e RXR e proteínas de ligação de ácido retinóico da família CRABP.

A expressão de Cyp26B1 é induzida pelo tratamento com atRA em células C6 parentais, até cerca de 14 vezes a expressão basal. Embora a variante C6R apresente aproximadamente a mesma expressão basal, a indução máxima de aproximadamente 3 vezes é observada 24h após o tratamento. A expressão de outros membros da família Cyp26 também foi analisada em células C6 e C6R. Não foi possível detectar a expressão de Cyp26A1 e Cyp26C1 nestas células através da técnica de Real Time-PCR.

Estes dados, em conjunto, indicam que o mecanismo de resistência das células C6R ao tratamento com atRA não está relacionado ao aumento do metabolismo celular pela indução de enzimas metabolizadoras da classe Cyp26.

Outros genes conhecidamente induzidos por atRA em células ST1 (Bengtson, 2002) que foram analisados neste trabalho, a saber, Cyp26B1, Eya2, Gem, Okl38 e Spi3, mostraram-se fortemente induzidos na linhagem parental C6, mas com indução significativamente menor na variante C6R. Resumindo, a indução da expressão de todos os genes analisados é marcante em células sensíveis ao tratamento com atRA, mas discreta nas células resistentes, indicando que o mecanismo de resistência possa estar relacionado a diferenças de expressão ou atividade dos receptores.

A expressão dos receptores de retinóides das classes RAR e RXR, assim como das proteínas ligantes de atRA da família CRABP, foi analisada através da técnica de Real Time-PCR. A expressão de RAR β , RXR α e RXR γ é significativamente diferente entre as duas células.

O tratamento de células C6 com atRA por 24h causa diminuição significativa dos níveis transcricionais de RXR α , que, entretanto equiparam-se aos basais com o tratamento por 48h. Em células C6R, esta inibição de RXR α não é observada. A expressão de RXR γ é indetectável em células C6, mas pode ser detectada em células C6R, nas quais o tratamento com atRA causa inibição temporária deste tipo de receptor.

A expressão de RAR β é induzida cerca de 30 vezes em células C6 pelo tratamento com atRA, conforme o descrito para diversos modelos celulares. Embora as células C6R também apresentem indução de RAR β

pelo tratamento com atRA, esta indução é significativamente menor, atingindo apenas cerca de 5 vezes a expressão basal.

Além disso, foi avaliado nas células C6 e C6R a expressão das proteínas CRABP-1 e CRABP-2. A expressão de CRABP-1 é maior em células C6 parentais do que em células C6R, onde a expressão é quase indetectável, enquanto que a expressão de CRABP-2 é pelo menos 10 vezes maior em células C6R.

A expressão de CRABP-1 parece moderar a resposta celular ao atRA, através do aumento da metabolização deste composto a formas polares menos ativas. Por outro lado, as informações disponíveis indicam que CRABP-2 aumenta a atividade transcricional de RAR, facilitando a formação do complexo receptor heterodimérico-atRA, tornando as células mais responsivas aos efeitos de atRA. A atividade potencializadora de CRABP-2 é especialmente significativa quando os níveis celulares de ácido retinóico ou RAR é limitante, ou seja, em circunstâncias em que eficiência aumentada da ligação atRA-receptor se faz necessária (Budhu & Noi, 2002). Em geral, baixo nível de expressão de CRABP-2 está associado à resistência ou menor sensibilidade de células tumorais aos efeitos anti-proliferativos de atRA (Budhu & Noi, 2002; Jing et al, 1992; Vo & Crowe, 1998), o que contradiz os resultados obtidos para células C6R, que apresentam altos níveis de expressão de CRABP-2 e são resistentes aos efeitos anti-proliferativos de atRA. Entretanto, associada à alta expressão de CRABP-2, as células C6R apresentam baixa indução de receptores da classe RAR β , cuja expressão está associada à sensibilidade de alguns tipos de tumores ao tratamento com atRA.

A expressão de RAR β é conhecidamente induzida pelo tratamento com atRA em diversos modelos celulares, incluindo células HepG2 de hepatocarcinoma, H157 de carcinoma de pulmão, HNSCC de carcinoma de

cabeça e pescoço, F9 e P19 de teratocarcinoma. Entretanto, a expressão de RAR β está suprimida em vários tipos de células tumorais, o que torna estas células resistentes ou menos sensíveis ao tratamento com retinóides (Xu et al, 1999; Wan et al, 1999; Sun et al, 2000). De fato, a transfecção de construções de expressão de RAR β em células tumorais de pulmão, mama e cérvix aumenta a responsividade das mesmas aos efeitos anti-proliferativos e de indução de apoptose induzida pelo tratamento com retinóides (Li et al, 1998; Si et al, 1996; Seewaldt et al, 1995; Liu et al, 1996; Weber et al, 1999).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o mecanismo de resistência das células C6R ao tratamento com atRA está relacionado à alteração da expressão de receptores de retinóides, mais especificamente à alta expressão de RXR γ e ausência de indução de RAR β pelo tratamento das células com atRA, além de alterações na expressão das proteínas de ligação ao ácido retinóico CRABP-1 e CRABP-2. Esta hipótese deve ser confirmada através da expressão de receptores da classe RAR β e/ou da proteína CRABP-1 em células C6R, com o intuito de verificar se a resistência das células está, de fato, relacionada a baixos níveis transcricionais destes genes. Além disso, a expressão ectópica de receptores da classe RXR γ e/ou CRABP-2 na linhagem C6 parental permitirá confirmar se estes produtos gênicos estão associados com a resistência de células de glioma ao tratamento com atRA.

A elucidação dos mecanismos de resistência de células de glioma ao tratamento com atRA consiste em um progresso importante para o desenvolvimento e aprimoramento de protocolos terapêuticos de tratamento, não apenas de gliomas, mas também de outros tipos de tumores sólidos, nos quais o desenvolvimento de resistência é um fator limitante para a utilização de atRA na quimioterapia. Além disso, pode

permitir o desenvolvimento de novos agosnistas seletivos, que além de contornar o problema de resistência tumoral, atuem mais seletivamente nas células tumorais, diminuindo efeitos colaterais indesejados e combatendo mais eficientemente a progressão do tumor.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I

Seqüência do cDNA correspondente ao transcrito completo de cyp26b1.

>gi|31220748|gb|AY245532.2| Rattus norvegicus cytochrome P450RAI-2 (Cyp26b1) mRNA, complete cds

```
ACGCAGTCTCCAGCCCCCTTCCCTCGGCCCATCTCCTGGGTTTCTTCGAGGGGTGCCAGGA
CCCCCGGCCGAGCTTCCCTCCCCCGTCACTCTGGTCCGGCCCTCCCCTCCCCCATCCCG
GACCGCACAGCCAATCCCCAAGCGGCCGCCAACATGCTCTTTGAGGGCTTGGAGTTGGTGT
CGGCGCTGGCCACCCTCGCCGCGTGCTGGTGTCCGTGACGCTGCTTCTGGCGGTGTGCA
GCAGCTGTGGCAGCTGCGCTGGGCTGCCACCCGCGACAAGAGCTGCAAGCTGCCTATCCCC
AAGGGCTCCATGGGATTCCCGCTCATCGGAGAGACTGGTCACTGGTTGCTACAGGGTTCCGG
CTTCCAGTCGTCGCGCCGCGAGAAGTATGGCAACGTTTTCAAGACACACTTACTGGGGCGGC
CGTTGATCCGTGTGACCGGTGCGGAGAAGCTGCGCAAGATCCTACTGGGCGAACACCAGCTA
GTGAGCACGGAGTGGCCGCGGAGCGCACGCGTGCTGCTGGGACCCAACACGGTGGCCAAC
TCCATTGGCGACATCCACCGCAACAAGCGCAAGGTCTTCTCCAAGATCTTCAGCCATGAGGC
ACTCGAGAGCTACCTGCCAAGATCCAAGTGGTATCCAGGACACACTTCGAGCCTGGAGCA
GCCAGCCTGAGGCCATCAATGTGTATCAGGAGGCCAGCGACTCACCTTCCGAATGGCCGTG
CGGGTTCTGCTGGGCTTCAGCATCCCCGAGGAGGACCTGGGAAACCTCTTTGAGGTGTACCA
GCAGTTTGTGGAGAATGTCTTCTCTGCCGGTGGACCTGCCCTTCAGCGGCTACCGGAGGG
GCATCCAAGCTCGGCAGATCCTTCAGAAGGGCCTAGAGAAGGCTGTCCGTGAGAAGCTTCAG
TGTACCCAGGGCAAAGACTACTCAGACGCCCTGGACATTCTCATTGAGAGCAGCAAGGAGCA
CGGCAAGGAGATGACCATGCAGGAGCTGAAGGATGGGACCCTGGAGCTGATCTTCGCAGCC
TATGCCACTACGGCCAGTGCCAGCACATCCTTGATCATGCAACTACTGAAACACCCTGCAGTG
CTGGAAAAGCTACGGGAGGAACTGCGGGGCCAGGGCCTGCTGCATGGTGGTGGCTGCCCT
GCGAGGGCACCTGCGCCTGGACATGCTCAGTGGCCTGCGCTACCTGGACTGCGTCATCAA
GGAGGTCATGAGGCTCTTCACGCCCGTCTCAGGAGGCTACCGCACTGTGCTGCAGACCTTCG
AACTGGATGGTTTCCAGATCCCCAAGGGCTGGAGTGTATAGCATCCGTGACACTCAC
GACACAGCGCCTGTGTTCAAGGATGTGAATGTGTTTGACCCTGACCGCTTCAGCCAGGCGCG
CAGTGAGGATAAGGATGGCCGCTTCCATTACCTCCCATTTGGCGGTGGTGTGCGGACCTGCC
TGGGCAAACACTTGGCCAAAGCTGTTCCCTGAAGGTGCTGGCAGTGGAGCTGGCTAGCAACAAG
CGCTTCGAGCTGGCCACCCGGACCTTCCCTCGCATCACTCTGGTCCCTGTCTTGACCCCCGT
GGATGGCCTCAGTGTCAAGTTCTTTGGTCTAGACTCCAATCAGAATGAGATTCTGCCTGAGAC
AGAGGCCATGTTGAGTGCTACGGTGTAGCCTCACTCTGGTCTCAGCCCAGCCCAGCAGCGG
GGGTGGGGGACAGAGATAGAAACCTGTGGGGTAGGGAGGGGCTGGATGGGAGGCCAGCAG
CCCCCTATGTTGTTCTCTGGCCTCTTCCCCGGCAAACCCTCCCTAAAGACAAAAGTGCCCCG
CCCCCTCCTGACTCCACCCCTCTTGATCTCCACTGCCCCCTAGCTTAGCTCCTGGGACAGA
GCCAGGACAATTTGCCCATGACAGTGTTAGTGAGCTGCAGTACATGCTTATGACCTCTGAACG
CTTCCTTCCCTAACCCCCCTTGTCTTTTTGTTGGTGGTCAGGTGCCTGTGAAGCCAGGAGGGA
GGAAAGTGGGGGGGGGGGCGCTTGAGCACTCTTTGACACTCTCACATCCCCCTATGTCACT
GCTCAAATGGTGCCAGAACAGTGTTGTGGGAATCCTCACCTAAGCCAGCCTTGACAGGGAA
GGAGATGACACCGGCTTTGAGGGGGCCATACCAGCCTACCTAGTTCGGACATTGGAAGTTAC
CTATCGCTGCTATTTGTCCTCTCTTCTGACCTTGGGGTACAGACCTTGGGGTACAGGAGCCTA
CAGGCTTAATCCTCAGATCTTCTTGGTGGCCCTGGGCAGGGACACCAGCACTCCTCCCCCA
TGGGACCAACTGAGCCAGGTGTTTTCTGGCTATAGCTGGGCTCCAGCTGCCACCCCTTGTC
CCCCTGTCCCATATTTATTCACTGACCTTGGCTACACTGAGGTCTGGAGCATCCTCCCCAACA
```


CCCACCCACCACCACCAACACTGCCACCACCACATGCACACACCTGCCAGCCTCTGACCTAG
CTCTCCTTTTCAGGGCTAATGTGAGGCAAGAAGGTGTGTGTCTGGTCTAACCCAGTTCTTTGG
TAGAGGGTTAACAGCCCTCCTGGGCTCTAGGCAAAAAGATGTAGCTTAACCTCAGAGTCAGACA
CCCAGCATCTTTGCCAGGTGTTCTTAGCACCTGCTCCCAGGCGGTCAAAGCCCCCGGGCATG
TGGGCCTAGGGGCTACCACTTCCTGTTCACTCACTGCCTGCCCCAGTGCCAGCCACTCCCCT
GGTGAGGATGCATGAGGATACGGGTTCTTCTGAAGGGACTTCTGTTCCCTTCCTTAACTCTCT
GCCCCTTTGCTCTTGGAAGAGTCCTCCACCCCATACCCACTCCCAACCCCATGCCACAGTCTG
CTAAGCCCAGCTCAGAATTTGGGATAGAGAAGGAAGCCGAGAGGTAAAGGTGGAGAGAGCCCT
CTCTCTGAGCTGTGTGAGGCCCTGTGGGGTCTGGAGAAGCTGCAGGGGAGGCTATAGCTGG
AAAGGAATAGAGAAGGAGAGGAGGAAGATGAGGACAGGGCATAAGTGAGTTGTCAGAAAGTG
GTTCAAGTGCAGAAGGGCCAGTGGGGGTGTGGAAGGTGACTGGGTAGAAGGTGAGGGGCT
CCTGCCACTGGCATTTCAGGGTTGGCCATGCGGGACCTTCCTGGGAAGGATTTGGGGCTCT
GGTGTCTCTAGGCAATTTTGTCTGTTTTTCAGATTCTCTGGGCTTTTTGTTCCCATCCATT
GCTTTTGCCTGTCACTCAGGCAGTGGCACATTTTCTCTAGAAAACAGGAACATAGAACGACAG
TTCTTATTGACCTGACCCTGGATGGCCATTGTACGAGGGTCAGCCACATCTCCCGAGCCACA
CAGAACATCCTAGAAGCCGCCTTTCCCAAATGTTTCACTGCTCTGCATTTTTTTTTCTGACAGAA
CAAAGTGCAGCATTAGAATACCAGGGAAATTATTGTGGAGTTCAAAAATAACCATAAACCCGCA
CCCCCCCCCTCCAGCTCTGAAACAGACCACACCATGTAGAAGCTCATCAACGTTTATGAAG
TAGGTGCATGCTGCCCTCACTTCACAAACCAGTGCTGGGGAGACTCATCTTCCTGCACACTAA
CCCTGCTTGCCACAGCCAAGTGTTCAGATTGAAGATGTGGCATATAGCTCTGTCCCTGGTA
AGGGACAGAGGGACTGGAGGGCCCCAGCAGGTGTCGGGGGCCTTCCCTTTCAGGGGGCCA
GCCCAGGAGGTGTGGTGAAGGAAAAGCTGAGGGGAATCCCTGTGAGGGTGGGAGGAAGGAA
AGATGGTCTGCCTGGATGGGTCTCAAAGGTAACAGGCAAAGGGACCTAGCCTAGGCACCTGT
GGGTGTGGCACCCGTCTCACCTCTGTAGCTGTGTCTGTTCCGTGTTTGTGTGTTTCATTGTGG
TAGCATTAAATGGGTGATGTATTCTCACATTCCTAACTATTGTAACCTTGACATTAACAAAAA
CAAAAACAAACCCACAAAAACTTCCTGCCACAGGCTTGACAGATTGAAGCACTTTCAAAGTTA
GACGCTGGCGTGTGCATTCTGGGCAACCGTTTTGACCCTGCCAGGTTTTCTGTTATTTTATAC
ACAAAACCTTTTTTTTCATAAATGTTATAATTTTGTGTCCGTCTTTATAAACTATTATAAGTACTATT
TTGTTATAATTCAAAATAGATATTTAGTATAAAGTTTTTGTGTTAAATATTTGTTATTTAGTAAAA
TATGAATTGTTCTTTATTGTAAACATGGTTCAAATATTAATATGCTTTTATCACAGTTGTTTTAA
TATTGAAAAAGCACTTGTGTGTCTCGTCTTGGTATGAGCTGGTGCTTGTGTGTGTCTTGGC
TGTCGTGTGGTTTTGATGTATATATAATATCCACGTTGCATATTACAACAACGAATGTCCTGC
ATTTTGTGAAATACTCAATGTGCTCTTTTATTGGCTTCATAATAAACTGTGGGGACTCA

7.2 ANEXO II

Seqüência protéica conceitual de Cyp26B1.

>gi|29825688|gb|AAO92253.1| cytochrome P450RAI-2 [Rattus norvegicus]
MLFEGLELVSALATLAACLVSVTLLAVSQQLWQLRWAATRDKSCKLPIPKGSMGFPLIGETGHWL
LQGS
GFQSSRREKYGNVFKTHLLGRPLIRVTGAENVRKILLGEHQLVSTEWPRSARVLLGPNTVANSIGD
IHRN
KRKVFISKIFSHEALESYLPKIQLVIQDTLRAWSSQPEAINVYQEAQRLTFRMAVRVLLGFSIPEEDLG
NL
FEVYQQFVENVFSPLPVDLPFSGYRRGIQARQILQKGLEKAVREKLQCTQGKDYS DALDILIESSKEH
GKE
MTMQELKDGTLELIFAAYATTASASTSLIMQLLKHPAVLEKLREELRAQGLLHGGGCPCEGTLRLD
MLSG
LRYLDCVIKEVMRLFTPVS GGYRTLQTFELDGFQIPKGWSVMYSIRDTHDTAPVFKDVNVFDPDR
FSQA
RSEDKDGRFHYPFGGGVRTCLGKHLAKLFLKVLAVELASTSRFELATRTFPRITLVPVLHPVDGLS
VKF
FGLDSNQNEILPETEAMLSATV

7.3 ANEXO III – Seqüências protéicas preditas de membros da família Cyp26

> Cyp26 de drosophila (*Drosophila melanogaster*)

LVAMALYEWRRNSREYRMVANIPSPPELPILGQAHVAAGLSNAEILAVGLGYLN
KYGETMKAWLGNVLLVFLTNPSDIELILSGHQHLTKAEEYRYFKPWFGDGLLISN
GHHWRHHRKMIAPTFHQSIKLSFVPTFVDHSAKAVVARMGLEAGKSFDVHDYMS
QTTVDILLSTAMGVKKLPEGNKSFQYQAQAVVDMCDIIHKRQVKLLYRLDSIYKFT
KLREKGDMMNIILGMTSKVVKDRKENFQEESSRAIVEEISTPVASTPASKKEGL
RDDLDIDENDVGAKRRLLALLDAMVEMAKNPDIWNEKDIDDEVNTIMFEGHD
TTSAGSSFALCMMGIHKDIQAKVFAEQKAIFGDNMLRDCTFADTMEMKYLERVI
LETLRLYPPVPLIARRLDYDLKSLASGPYTPKGTTVIVLQYCVHRRPDIYPNPTKFD
PDNFLPERMANRHYYSFIPFSAGPRSCVGRKYAMLKLVLLSTIVR

> Cyp26 de drosophila (*Drosophila pseudoobscura*)

IVALGLYEWRRNTREYRMVANIPSPPLPLLGQAHMVAGLSNAEILNVGLGYLNKYGETMKAWL
GNVLLVFLTNPNIDIELILSGHQHLTKAEEYRYFKPWFGDGLLISNGHHWRHHRKMIAPTFHQSIK
SFVPTFVDHSAKSVVGRMGLETGKSFDVHDYMSSTTTVDILLSTAMGVKKLPEGNKSFQYQAQAVV
MCDIIHKRQVKLLYRLDSIYKFTKLREKGDMMNIILGMTSKVVKDRKQNFQEESSRAIVDEVQAV
STPATKKEGLRDDLDIDENDVGAKRRLLALLDAMVEMAKNPDIWNEKDIDDEVNTIMFEGHDT
TSAGSSFALCMMGIHKDIQEKVFAEQKAIFGDNMLRDCTFADTNEMKYLERVILETLRLYPPVPLI
ARRLDYDLKSLASGPYTPKGTTVIVLQYCVHRRADIYPNPTKFDPDNFLPERMANRHYYSFIPFSA
GPRSCVGRKYAMLKLVLLSTIVRRYHVNWLPNAPLQYKSTIILSPCGDIRFKFLPVEG

>Cyp26A1 de cachorro (*Canis familiaris*)

MGLSALLASALCTFVLPLLLFLAAIKLWDLYCVSSRDRSCALPLPPGTMGFPFFGETLQMVQLQVREL
LLSQRRKFLQMKRRKYGYIYKTHLFGRTVRVMGADNVRRILLGEHRLVSVHWPASVRTILGSGC
LSNLHDSSHQKQKKVIMRAFSREALQCYVPVIAEEVGTCLQQWLSRGERGLLVYPQVKRLMFRIS
MRILLGCEPRLASGGDAEQQLVEAFEEMTRNLFSLPIDVPFSGLYRGMKARNLIHARIEENIRAKIC
GLRTAQAGGGCKDALQLLIEHSWERGERLDMQALKQSSTELLFGGHETTASAATSLITYLGLYPH
VLQKVREELKSKGLLCKSNQDNKLDIEILEQLKYIGCVIKETLRLNPPVPGGFRVALKTFELNGYQI
PKGWNVIYSICDTHDVADIFTNKDEFNPDRFMLPHPEDASRFSFIPFGGGLRSCVGKEFAKILLKI
FTVELARHCDWRLLNGPPTMKTSPTVYPVDDLPARFTHFQGEI

> Cyp26A1 de fugu (*Takifugu rubripes*)

MAVSALLATFLCTIVLPLLLFLVTVKLWEVYVIRERDSACPSPLPPGTMGLPFIGETLQLILQRRKFL
RMKRQKYGYIYRTHLFGNPTVRVTGANNVRHILLGEHRLVAVQWPASVRTILGSDTLNVHGAQ
HKTKKKVIMQAFSREALEFYIPAMQHEVQAQVQEWLAKDSCVLVYPEMKRLMFRIAMQILLGFQL
EQIKTDEQKLVEAFEEMIKNLFSLPIDMPFSGLYRILQGLKARNFIHAKIEENIKRKLRESNSDSKC
RDALQQLIDSSKSGQVLSMQVLKESATELLFGGHETTASTATSLIMFLGLNPEVLDKLRHELSDK

VMHKGFCFVFMHVILMQCFHYVHQERQGVDLRSLNLETLEQLKYTSCVIKETLRMNPPVPGGFRV
 ALKTFELGYQIPKGWNVIYSICDTHDVAEIFPNKEDFQPERFMMKNCGDSSRFQYIPFGGGSRMC
 VGKEFAKVLLKIFLVEVVTCHWSLLNGPPTMKTGPTVYPVDNLPTKFNTY

> **Cyp26A1 de opossum (*Monodelphis domestica*)**

MGFSALLASALCTFVLPPLLLFLAAVKLWDLYCLSTRDHSCSLPLPPGTMGLPFFGETLQMVLRQRK
 FLQMKRRKYGFIYKTHLFGRTVRVMGADNVRQILLGEHRLVSVHWPASVRTILGSGCLSNLHDS
 LHKRRKKLIMQAFNREALQCYVPVIAEEIKNALERWLQCGDSGLLVYPEVKRLMFRIAMRILLGCE
 SGSATDGDSERELVEAFEEMTRNLFSLPIDVPFSGLYRGMKARNLIHARIEKNICAKLGGQREPEA
 GGWRVKDVLQLLIEHTQENGERLDMQLKQSATELLFGGHETTASAATSLITYLGLHHHVLQKVRE
 ELKTKGLLCKSSHDEKLDIDILEQLKYIGCVIKETLRNPPVPGGFRIALKTFELNGYQIPKGWNVIY
 SICDTHDVADIFTNKEEFNPDRFLLPYPEDSSRFSFIPFGGGLRSCVKGKEFAKILLKIFTVELARHC
 DWQLLNGPPTMKTSTPTVYPVDNLPTKFMHFKGEM

> **Cyp26A1 de porco (*Sus scrofa*)**

MGLPALLASVLCTFVLPPLLLFLAAIKLWDLYCVSSRDRSCTLPLPPGTMGFPFFGETLQMVLRQRKF
 LQMKRRKYGFIYKTHLFGRTVRVMGADNVRILLGEHRLVSVHWPASVRTILGSGCLSNLHDS
 HKQRKKVIMQAFSREALQCYVPVIAEEVDSCLEQWLSCGERGLLVYPQVKRLMFRIAMRILLGCE
 PRLASGGAEQQLVEAFEEMTRNLFSLPIDVPFSGLYRGLKARNLIHARIEENIRAKICGLRAAGAG
 GGCKDALQLLIEHSWERGERLDMQALKQSSTELLFGGHETTASAATSLITYLGLYPHVLRQKVREEL
 KSKGLLCKGNQDNKLDMEILEQLKYIGCVIKETLRNPPVPGGFRVALKTFELNGYQIPKGWNVIY
 SICDTHDVADIFTNKEEFNPDRFLLPHPEDASRFSFIPFGGGLRSCVKGKEFAKILLKIFTVELARHC
 DWRLNGPPTMKTSTPTVYPVDDLPARFTRFQGEI

> **Cyp26A1 de tetraodon (*Tetraodon nigroviridis*)**

MALSALLATFLCTIVLPFLFLVTVKLWEVYMIRGKDAACPSPLPPGSMGLPFIGETLQILQRRKFL
 RMKRQKYGYIYRTHLFGNPTVRVTGAANVRHILLGEHRLVAVQWPASVRTILGPDTLNVHGAQ
 HKTKKKAIMQAFSREALELYIPAMQEEVQAVVQEWLAKDSCVLVYPEIKRLMFRIAMRLLLGFELE
 QIKTDEQQLVEAFEEMIKNLFSLPIDVPFSGLYRALKESATELLFGGHETTASTATSLIMFLGLNPD
 VLDKLRQELIDKVLSEALEQLKYTSCVIKETLRMNPPVPGGFRVALKTFKLGYQIPKGWNVYSI
 CDTHDVAEIFSNKGDFQPERFMASHHGDASKFYIPFGGGSRMCVKGELCQSPAKDLSSGRSGQ
 NVSLEPSEATHHENGTDGLSCGQSAKYI

> **Cyp26A1 de xenopus (*Xenopus laevis*)**

MDLYTLTALSALCTLALPLLLLLTAACKLWEVYCLRRKDAACANPLPPGTMGLPFFGETLQMVLRQRRF
 LQVKRSQYGRIYKTHLFGSPTVRVTGAENVRQILMGEHKLVSHPASVRTILGAGCLSNLHDNE
 HKYTKKVIAQAFSREALANYVPQMEEEVRCVNLWLQSGPCVLVYPAIKRMMFRIAMRLLLGCDP
 QRMDREQEETLLEAFEEMSRNLFSLPIDVPFSGLYRGLRARNLIHAQIEENIKEKLQREPDEHCKD
 ALQLLIDYSRRNGEPINLQALKESATELLFGGHGTTASAATSLTSFLALHKDVLEKVRKELETQGLL
 STKPEEKELSIEVLQQLKYTSCVIKETLRSPVAGGFRVALKTFVLNGYQIPKGWNVIYSIADTH
 GEADLFPDTRKFNPDRLTLPDRSSRFIPFGGGVRCCIGKEFAKILLKVFFVELCRNCDWELL
 NGSPAMTTSPIICPVDNLPAKFKPFSSSI

> **Cyp26A1 de xenopus (*Xenopus tropicalis*)**

MDLYTLTTSALCTLALPVLLLLTAAKLWEVYCLSRKDASCRNPLPPGTMGLPFFGETLQMVLRQRRK
FLQVKKRKYGRIYKTHLFGSPTVRVTGAENVRQILLGEHKLVSHPASVVRTILGAGCLSNLHDS
EHKYTKKVGREQEETLLEAFEEMTRNLFSLPIDVPFSGLYRQALKESATELLFGGHGTTASAATSLT
TFLALHKDVLEKVRKEEVLLQQLKYTSCVIKETLRLSPPVAGGFRVALKTFVLNGYQIPKGWNVIYSI
ADTHGEAELFPDKDEFNPDRFLTPLPGDSSRFGFIPFGGGVRCCVGKEFAKILLKVFIVELCRNCD
WELLNGSPAMKTSPIICPVDNLPAKF

> Cyp26A1 de zebrafish (*Brachydanio rerio*)

MGLYTLMTVFLCTIVLPVLLFLAAVKLWEMLMIRRVDPNCRSPLPPGTMGLPFIGETLQLILQRRKF
LRMKRQKYGCIYKTHLFGNPTVRVMGADNVRQILLGEHKLVSQWPASVVRTILGSDTSLNVHGV
QHKNKKKAIMRAFSRDALEHYIPVIQQEVKSAIQEWLQKDCSVLVYPEMKKLMFRIAMRILLGFEP
EQIKTDEQELVEAFEEMIKNLFSLPIDVPFSGLYRGLRARNFIHKSIEENIRKKIQDDDNENEQKYK
DALQLLIENSRRSDEPFSLQAMKEAATELLFGGHETTASTATSLVMFLGLNTEVVQKVREEVQEKV
EMGMYTPGKGLSMELLDQLKYTGCVIKETLRINPPVPGGFRVALKTFELNGYQIPKGWNVIYSICD
THDVADVFPNKEEFQPERFMSKGLDGSRFNYIPFGGGSRMCVGKEFAKVLLKIFLVELTQHCNW
ILSNGPPTMKTGPTIYPVDNLPTKFTSYVRN

> Cyp26B1 de cachorro (*Canis familiaris*)

MLFEGLELVSAATLAACLVSVTLLLAWSQQLWQLRWAATRDKSCKLPIPKGSMGFPLIGETGHW
LLQGSGFQSSRREKYGNVFKTHLLGRPLIRVTGAENVRKILMGEHHLVSTEWPRSTRMLLGPNTV
ANSIGDIHRNKRKVFVKFSHEALQSYLPKIRLVIQDTLRAWSSHPEAINVYQETQKLTFRMAIRVL
LGFSIPEEDLGHLEFVYQQFVENVFSLPVDLPFSGYRRGIQARQILQKGLEKAIREKLQCTQGKDY
SDALDILIESSKEHGKEMTMQELKDGTLELIFAAYATTASASTSLIMQLLKHPAVLEKLREELRAQG
ILHSGGCPCEGTLRLDLSRLHYLDCVIKEVMRLFTPISGGYRTVLQTFELDGFQIPKGWSVMYSI
RDTHDTAPVFKDVNVFDPDRFGQARSEDKDGRFHYPFGGGVVRTCLGKHLAKLFLKVLAVELAST
SRFELATRTFPRITLVPVLHPVDGLSVKFFGLDSNQNKILPETEAMLSATV

> Cyp26B1 de fugu (*Takifugu rubripes*)

MLFDSFDLVSAATLAACLVSMALLLAWSQQLWQLRWTATDRNCKLPMPKGSMGFPIGETCH
WLLQGSGFHASRRQKYGNVFKTHLLGRPLIRVTGAENIRKVLMEHHTLVTDWPQSTSTLLGPN
SLANSIGDIHRNKRKVFVAKVFSHEALESYLPKIQQVQIESLRVWSSNPEPINVYRESQRLSFTMAV
RVLLWFRVSEEEMKHLFSTFQDFVDNLFSLPIDLPFSGYRTIELIFAFAATTASASTSLIMQLLRHPP
VLERLREELRARGLLHNGCLCPEGELRLDTIVSLKYLDCVIKEVLRLFTPVSGAYRTAMQTFELDGV
QIPKGWSVMYSIRDTHDTSTVFKDVFDPDRFSQERGEDKEGRFHYPFGGGVRSCLGKQLAT
LFLRILAIELASTSRFELATRQFPRVITVPVHPVDGLKVIFYGLDSNQNEI

> Cyp26B1 de opossum (*Monodelphis domestica*)

MLFEGFDLVSAATFAACLVSVTLLLAWSQQLWQLRWAATRDKSCKLPIPKGSMGFPLIGETGHW
LLQGSCFQSSRREKYGNVFKTHLLGRPLIRVTGAENVRKILMGEHHLVSTEWPRSTRMLLGPNV
ANSIGDIHRNKRKVFVSRIFSHEALETYLPKIQVQVQIESLRVWSSNPDAINVYQEAQKLTFRMAIRV
LLGFSIPEEDLSQLFEVYQQFVENVFSGIARHTLQKGLEKAIREKLQSTQGKDYSALDILIESSK
EHGKEMTMQELKDGTLELIFAAYATTASASTSLIMQLLKHPNVLEKLREELRANGILHNGCVCEGS
LRLDTLIGLHYLDCVIKEVMRLFTPVSGGYRTVLQTFELDGFQIPKGWSVMYSIRDTHDTAPVFKD
VDVFDPERFSQARSEDKDGRFHYPFGGGVVRTCLGKHLAKLFLKVLAVELASTSRFELASRTFPR
TLVPVLHPVDGLSVKFFGLDSNQNKILTETEAMLGAAV

> Cyp26B1 de zebrafish (*Brachydanio rerio*)

MLFESFDLVSAATLAACLVSMALLLAVPQQLWQLRWATATRDKSKLPMKSGMGPFIIGETCH
WFFQGAGFHASRRQKYGNVFKTHLLGRPLIRVTGAENVRKVLMGEHSLVTVDPQSTSTLLGPN
SLANSIGDIHRKRRKIFAKVFSHEALESYLPKIQQVIQETLRVWSSNPDPINVYRESQRLSFNMAV
RVLLGFRIPEEEMHCLFSTFQEFVENVFSPLIDLPFSGYRKGIRARDSLQKSIEKAIREKPLHTQGK
DYTDALDVLLESAKENNELTMQELKESTIELIFAAATTASASTSLVMQLLRHPAVLEKLREELRS
CGLLDGCLCQGELRLDSIISLKYLDCVIKEVLRFLFAPVSGGYRIATQTFELDGVQVPKGWSVMYS
IRDTHDTSAVFKDVEAFDPDRFSPERSEDREGRFHYLPFGGGVRSCLGKQLATLFLKLLAVELAGG
SRFELSTRTFPRMISVPVHPTDGLRVKFFGLDSNQNQIMAKSDEMLDATV

> Cyp26C1 de camundongo (*Mus musculus*)

MISWGLSCLSVLGAAGTTLLCAGLLLGLAQQLWTLRWTLSRDWASTLPLPKGSMGWPFPGETLH
WLVQGSFRHSSRRERYGTVFKTHLLGRPVIRVSGAENVRTILLGEHRLVRSQWPQSAHILLGSHT
LLGAVGEPHRQRRKVLARVFSRSSLEQFVPRQLQALRREVRSWCAAQRPVAVYQAAKALTFRMA
ARILLGLQLDEARCTELAHTFEQLVENLFSPLDVPFSGLRKIRARDQLYEHLDEAVAELQEKQT
AEPGDALLLIINSARELGHEPSVQELKELAVELLFAAFFTTASASTSLILLLLQHPAAITKIQQLSAQ
GLGRACCTPRASGSPDCGCEPDLSLAMLGRLRYVDCVVKEVLRLLPPVSGGYRTALRTFELDG
YQIPKGWSVMYSIRDTHETAAYRSPPEGDFPERFGVESGDARGSGGRFHYIPFGGGARSCLGQ
ELAQAVLQLLAVELVRTARWELATPAFPVMQTVPIVHPVDGLLLFFHPLPTSGAGDGL

> Cyp26C1 de chimpanzé (*Pan troglodytes*)

MFPWGLSCLSVLGAAGTALLCAGLLLSLAQHLWTLRWMLSRDRASTLPLPKGSMGWPFPGETLH
WLVQGSFRHSSRRERYGTVFKTHLLGRPVIRVSGAENVRTILLGEHRLVRSQWPQSAHILLGSHT
LLGAVGEPHRRRRKVLARVFSRAALERYVPRQLQALRHEVRSWCAAGGPVSVDASKALTFRMA
ARILLGLRLDEAQCATLARTFEQLVENLFSPLDVPFSGLRKIRARDQLHQHLEGAISEKLHEDK
AAEPGDALDLIIHSARELGHEPSMQELKESAVELLFAAFFTTASASTSLVLLLLQHPAAIAKIREELV
AQGLGRACGCAPGAAGGSEGPPDCGCEPDLSAALGRLRYVDCVVKEVLRLLPPVSGGYRTALR
TFELDLQLLAVELVRTSRWELATPAFPAMQTVPIVHPVDGLRLFFHPLTPSVAGNGLCL

> Cyp26C1 de galinha (*Gallus gallus*)

MRSGRDAVRRRGGAAGSRLGSGWVGPGWAVGGEPRGASPPGAVAATPVRPAPLPSIPALRLQSP
HLAALLKYAGETSSAKVDRLSGQYLYKCGRGEKREQEASGAGRTAAERALPLAGIKARDMLHEF
MERAIQEKLRRAISEEHSDALDFIINSAKEHGKEFTMQELKESAIELIFAAFFTTASASTSLILLLLK
HPSAIEKIRQELVSHLYPQHQNCPMAPCPGTGRDSEQQLTTASDAHEDQRQLPDLTEETELGG
GCSPNLPALLEPMHPPSSPQPRGCRCPLDISLEQLSRLRYLDCVVKEVLRVLPVSGGYRTALQTF
ELDGYQIPKGWSVMYSIRDTHETAAYISPPGGFDPDRFNVTHLEAAGRFBHYIPFGGGARSICGK
ELAQAILKLLAIELVTTARWELATPTFPAMQTVPIVHPVDGLQLYFHLRPSHGGEA

> Cyp26C1 de opossum (*Monodelphis domestica*)

MFPLGMSSLSVAEAAALTILLSLGLLLSVAQHLWTLRWTLSRDRACALPLPKGSMGWPFPGETLHW
LVGSRFHSSRRERYGTVFKTHLLGKPLIRVSGAQNVRTLLGEHRLVSSQWPQSAHILLGSHTLL
GAVGEPHRQRRKILARVFSHAALSYMPRIQATLRRELWTWCGVPGPVSVYSATKALTFRIAARIL
LGLRLEESECNELAKTFEQLMENLFSPLDVPFSGLRKIRARDLLHEHMEKAIREKLQRSEPGGQ

MFSWGLSCLSMGLGAAGTALLCAGLLGLAQQWLTRLRWTLSRDWASTLPLPKGSMGWPPFFGETL
HWLVQGSRFHSSRRERYGTVFKTHLLGRPVI RVSGAENVRTILLGEHRLVRSQWPQSAHILLGSH
TLLGAVGERHRQRRKVLARVFSRPALEQFVPRLQEALRREVRSWCAAQRPVAVYQAAKALTFRM
AARILLGLQLDEARCTELAQTFERLVENLFSPLDVPFSGLRKGIRARDQLYQHLDEVIAEKLREEL
TAEPGDALHLIINSARELGRELSVQELKELAVELLFAAFFTTASASTSLILLLLQHPAAIAKIQQELSA
QGLGSPCSCAPRASGSRPDCSCEPDLSLAVLGRLRYVDCVVKEVLRLLPPVSGGYRTALRTFELD
GYQIPKGWSVMYSIRDTHETA AVYRSPPEGFDPERFGVESEDARGSGGRFHYPFGGGGARSCLG
QELAQAVLQLLAVELVRTARWELATPAFPVMQTVPIVHPVDGLLLL FHPLPTLGAGDG

[illegible]

MFLLEISYTSFFEAA LTSALSLVLLLAASHQLWSLRWHSTRDRGSSLPKPGSMGWPFPGETLHW
LVQGSSFHSSRREKYGNIFKTHLLGKPVIRVTGAENIRKILLGEHHLVSTQWPQSTQIILGSNTLS
NSIGELHRQKRKMMSKVLSSAALESYLPRIHEAVRWEVRSWCRGVGPVSM LSCAKALTFR IAAARI
LLGLSLTDTQFQELTRTFEQLVENLFCPLDIPFSGLRKESAIELIFAAFLT TASASTSLVLLLLKHPS
AIHKIRQELASHGLSEHCEQCLPCQQNISLEKLKSLHYLDCVVKEVLRLLPPVSGGYRTALQTFEL
DGYQIPKGWSVMYSIRDTHETA AVYQNAEMFDPERFSTERDEGKLGRFNYIPFGGGGARSCIGKEL
AQIILKILAMELVTTAKWELATPSFPKMOTVPV VHPVDGLORSFKHRIL

8 CONCLUSÕES

- O cDNA correspondente ao transcrito completo do novo transcrito cyp26b1 de rato foi clonado e seqüenciado com sucesso; a seqüência obtida foi depositada no banco de dados do NCBI (AY_245532), tornando-se seqüência de referência em 03 de junho de 2003.
- A porção codificante de cyp26b1 foi amplificada, clonada no vetor de entrada do sistema Gateway e transposta com sucesso para o vetor de expressão em células de mamífero pDEST12.2.
- Células C6 e ST1 de glioma de rato não se mostraram adequadas para a realização de ensaios funcionais através de transfecção de construções plasmideais. Esta metodologia, entretanto, foi bastante eficiente para transferir o gene de interesse para células T98G e P19.
- Foi possível obter clones de células C6 e populações transfectantes de células T98G e P19 que expressam cyp26b1 exógeno, para a realização de ensaios funcionais.
- A análise funcional de clones e populações transfectantes mostrou que a expressão de cyp26b1 exógeno não promove alterações significativas no crescimento celular de células C6, T98G e P19, tanto em substrato sólido, quanto em substrato semi-sólido.

- Através de tratamento constante de células C6 com atRA, foi possível obter uma população enriquecida para células resistentes a este tratamento, a partir da qual foram isolados clones que apresentavam graus variados de sensibilidade aos efeitos anti-proliferativos desta substância. O clone que apresentou a menor sensibilidade foi denominado variante C6R, resistente ao tratamento com atRA.
- A análise da expressão de diversos genes relacionados à resposta celular ao tratamento com atRA mostrou que há diferenças significativas entre a linhagem parental C6 e a variante C6R.
- O mecanismo de resistência de células C6R ao tratamento com atRA parece estar relacionado alterações na expressão de receptores de retinóides, mais especificamente $RAR\beta$ e $RXR\gamma$, e de proteínas de ligação a ácido retinóico CRABP-1 e CRABP-2. A confirmação do mecanismo de resistência de gliomas ao tratamento com atRA pode constituir um progresso importante para o desenvolvimento de protocolos novos terapêuticos baseados em atRA para o tratamento clínico de gliomas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Abed, S.S., Beckett, B.R., Chiba, H., Chithalen, J.V., Jones, G., Metzger, D., Chambon, P., Petkovich, M. (1998) **Mouse P450RAI (Cyp26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor γ and retinoid X receptor α .** *J. Biol. Chem.*, 273: 2409-15.
- Abu-Abed, S., Dollé, P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon, P., Petkovich, M. (2001) **The retinoic acid-metabolizing enzyme, Cyp26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures.** *Genes Dev.*, 15: 226-40.
- Akbasak, A. & Sunar-Akbasak, B. (1992) **Oncogenes: cause or consequence in development of glial tumors.** *J. Neuro. Sci.*, 111: 119-23.
- Altucci, L. & Gronemeyer, H. (2001) **The promise of retinoids to fight against cancer.** *Nature Rev. Cancer*, 1: 181-93.
- 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. & Armelin, H.A. (1978) **Steroid hormones mediate reversible phenotypic transition between transformed and untransformed states in mouse fibroblasts.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2805-9.
- Armelin, M.C., Stocco, R.C. & Armelin, H.A. (1983) **Control of rat C6 glioma cell proliferation: uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in suspension and monolayer cultures.** *J. Cell. Biol.*, 97: 455-8.
- Armstrong, J.L., Ruiz, M., Boddy, A.V., Redfern, C.P.F., Pearson, A.D.J., Veal, G.J. (2005) **Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells.** *Br. J. Cancer*, 92: 1-9.
- Auer, R., Del Maestro, R.F. & Anderson, R. **A simple and reproducible experimental in vivo glioma model.** (1981) *Can. J. Neurol. Sci.*, 8: 325-31.
- Balmer, J.E. **Gene expression regulation by retinoic acid.** (2002) Oslo, Norway, 66pp.

- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., Delattre, J.Y. (2003) **Primary brain tumours in adults.** *Lancet*, 361: 323-331.
- Benda, P., Lightbody, J, Sato, G., Levine, L. & Sweet, W. (1968) **Differentiated rat glial cell strain in tissue culture.** *Science*, 161: 370-1.
- Bengtson, M. (2002) **Caracterização celular e molecular dos efeitos do ácido retinóico sobre as células ST1 de glioma de rato.** São Paulo, Brasil, 128.
- Blomhoff, R., Senoo, H., Smeland, S., Bjerknes, T. & Norum, K.R. **Cellular uptake of vitamin A.** (1992) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 22: 327-30.
- Blumberg, B. & Evans, R.M. (1998) **Orphan nuclear receptors - new ligands and new possibilities.** *Genes Dev.*, 12: 3149-55.
- Budhu, A.S. & Noy, N. (2002) **Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptors sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest.** *Mol. Cel. Biol.*, 22: 2632-41.
- Chambon, P. (1996) **A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.** *FASEB J.*, 10: 940-54.
- 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.
- Chithalen, J.V., Luu, L., Petkovich, M., Jones, G. (2002) **HPLC-MS/MS analysis of the products generated from all-trans-retinoic acid using recombinant human CYP26A.** *J. Lipid Res.*, 43: 1133-42.
- Coon, M.J. (2005) **Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 1-25.
- 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.*, 72: 207-13.
- Defer, G.L., Adle-Biassette, H., Ricolfi, F., Martin, L., Authier, F.J., Chomienne, C., Degos, L., Degos, J.D. (1997) **All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas: clinical and radiological stabilization associated with appearance of intratumoral calcifications.** *J. Neuro Oncol.*, 34: 169-77.
- 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.

- 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, 1987.
- Freemantle, S.J., Spinella, M.J. & Dmitrovsky, E. (2003) **Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance.** *Oncogene*, 22: 7305-15.
- 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.
- Grobben, 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.
- Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen, S.R., Chai, J.R., Lu, J.X., Zhao, L., Gu, L.J., Wang, Z.Y. (1988) **Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia.** *Blood*, 72: 567-72.
- Jing, Y., Waxman, S., Mira-y-Lopez, R. (1997) **The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells.** *Cancer Res.*, 57: 1668-1672.
- Kim, S.Y., Yoo, S.J., Kwon, H.J., Kim, S.H., Byun, Y., Lee, K.S. (2002) **Retinoic acid 4-hydroxylase-mediated catabolism of all-trans retinoic acid and the cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma.** *Metabolism*, 51: 477-81.
- Klaassen, I., Brakenhoff, R.H., Smeets, S.J., Snow, G.B., Braakhuis, J.M. (2001) **Enhanced turnover of all-trans-retinoic acid and increased formation of polar metabolites in head and neck squamous cell carcinoma lines compared with normal oral keratinocytes.** *Clin. Cancer Res.*, 7: 1017-25.
- Kondo, Y., Hollingsworth, E.F. & Kondo, S. (2004) **Molecular targeting for malignant glioma (Review).** *Int. J. Oncol.*, 24: 1101-09.
- Lee, K.H., Chang, M.Y., Ahn, J.I., Yu, D.H., Jung, S.S., Choi, J.H., Noh, Y.H., Lee, Y.S., Ahn, M.J. (2002) **Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells.** *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, 296: 1125-33.
- Li, A., Zhu, X., Brown, B., Craft, C.M. (2003) **Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of human retinoblastoma cells.** *IOVS*, 44: 996-1007.

- Li, Y., Dawson, M.I., Agadir, A., Lee, M.O., Jong, L., Hobs, P.D., Zhang, X.K. (1998) **Regulation of RAR beta expression by RAR- and RXR-selective retinoids in human lung cancer cell lines: effect on growth inhibition and apoptosis induction.** *Int. J. Cancer*, 75: 88-95.
- Liu, Y., Lee, M.O., Wang, H.G., Hashimoto, Y., Klaus, M., Reed, J.C., Zhang, X. (1996) **Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells.** *Mol. Cell Biol.*, 16: 1138-49.
- 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.
- López-Barahona, M., Miñano, M., Mira, E., Iglesias, T., Stunnenberg, H.G., Rodríguez-Pena, A., Bernal, J., Muñoz, A. (1993) **Retinoic acid posttranscriptionally up-regulates proteolipid protein gene expression in C6 glioma cells.** *J. Biol. Chem.*, 268: 25617-23.
- Luu, L., Ramshaw, H., Tahayato, A., Stuart, A., Jones, G., White, J., Petkovich, M. (2001) **Regulation of retinoic acid metabolism.** *Advan. Enz. Regul.*, 41: 159-75.
- MacLean, G., Abu-Abed, S., Dollé, P., Tahayato, A., Chambon, P. & Petkovich, M. (2001) **Cloning of a novel retinoic acid-metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development.** *Mech. Dev.*, 107: 195-201.
- Maden, M. (2002) **Retinoid signaling in the development of the central nervous system.** *Nat. Rev. Neurosci.*, 3: 843-53.
- 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.
- Marill, J., Idres, N., Capron, C.C., Nguyen, E., Chabot, G.G. (2003) **Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review.** *Curr. Drug Metab.*, 4: 1-10.
- McCaffery, P., Drager, U.C. (2000) **Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor.** *Cytokine Growth Factor Rev.*, 11: 233-49.
- Merrill, R.A., Ahrens, J.M., Kaiser, M.E., Federhart, K.S., Poon, V.Y., Claggett-Dame, M. (2004) **All-trans retinoic acid-responsive genes identified in the human SH-SY5Y neuroblastoma cell line and their regulated expression in the nervous system of early embryos.** *Biol. Chem.*, 385: 605-14.

- Meunier B., de Visser, S.P. & Shaik, S. (2004) **Mechanism of oxidation reactions catalysed by cytochrome p450 enzymes.** *Chem. Ver.*, 104: 3947-80.
- Muindi, J., Frankel, S.R., Miller, W.H., Jr, Jakubowski, A., Scheinberg, D.A., Young, C.W., Dmitrovsky, E. & Warrell, R.P., Jr. (1992) **Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations: implications for relapse and retinoid "resistance" in patients with acute promyelocytic leukemia.** *Blood*, 79: 299-303.
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Jonhson, E.F., Kemper, B., Levin, W., et al. (1987) **The P450 gene superfamily: recommended nomenclature.** *DNA*, 6: 1-11.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Fevereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., et al. (1991) **The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature.** *DNA Cell. Biol.*, 10: 397-8.
- Nebert, D.W. & Russell, D.W. (2002) **Clinical importance of the cytochromes P450.** *Lancet*, 360: 1155-62.
- Nelson, D.R. **A second Cyp26 P450 in humans and zebrafish: CYP26B1.** (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, 371: 345-7.
- Nelson, D.R., Zeldin, D.C., Hoffman, S.M., Maltais, L.J., Wain, H.M. & Nebert, D.W. (2004) **Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes pseudogenes and alternative-splice variants.** *Pharmacogenetics*, 14: 1-18.
- Niederreither, K., Abu-Abed, S., Schuhbaur, B., Petkovich, M., Chambon, P., Dollé, P. (2002) **Genetic oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development.** *Nat. Genet.*, 31: 84-8.
- Niles, R.M. (2004) **Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer.** *Mutat. Res.*, 555: 81-96.
- Njar, V.C.O. (2002) **Cytochrome P450 retinoic acid 4-hydroxylase inhibitors: potential agents for cancer therapy.** *Mini Rev. Med. Chem.*, 2: 261-69.
- Osanai, M., Petkovich, M. (2005) **Expression of retinoic acid metabolizing enzyme, Cyp26A1 limits programmed cell death.** *Mol. Pharmacol.*, 67: 1808-17.

- Ponten, J. & Macintyre, E.H. (1968) **Long term culture of normal and neoplastic human glia.** *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 74: 465-86.
- Post, G.R. & Dawson, G. (1992) **Characterization of a cell line derived from a human oligodendroglioma.** *Mol. Chem. Neuropathol.*, 16: 303-17.
- Reijntjes, S., Gale, E. & Maden, M. (2004) **Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: Cyp26C1 expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes.** *Dev. Dynam.*, 230: 509-17.
- Rodts, G.E., Jr & Black, K.L. (1994) **Trans retinoic acid inhibits in vivo tumor growth of C6 glioma in rats: effect negatively influenced by nerve growth factor.** *Neurol. Res.*, 16: 184-6.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Dragger, U.C. & De Luca, L.M. (2000) **Retinoids in embryonal development.** *Physiol. Rev.*, 80: 1021-54.
- Sasahara, R.M. **Efeito anti-tumorigênico de hormônios glucocorticóides sobre células C6 de glioma de rato: bases moleculares.** São Paulo, 1995, 93pp.
- Seewaldt, V.L., Johnson, B.S., Parker, M.B., Collins, S.J., Swisshelm, K. (1995) **Expression of retinoic acid receptor beta mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells.** *Cell Growth Differ.*, 6: 1077-88.
- Si, S.P., Lee, X., Tsou, H.C., Buchsbaum, R., Tibaduiza, E., Peacocke, M. (1996) **RAR beta 2-mediated growth inhibition in HeLa cells.** *Exp. Cell Res.*, 223: 102-11.
- Silverman, A.P. & Kool, E.T. (2005) **Quenched probes for highly specific detection of cellular RNAs.** *Trends Biotechnol.*, 23: 225-30.
- Sonneveld, E., van den Brink, C.E., Tertoolen, L.G.J., van der Burg, B., van der Saag, P.T. (1999) **Retinoic acid hydroxylase (Cyp26) is a key enzyme in neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells.** *Devel. Biol.*, 213: 390-404.
- Soprano, D.R., Qin, P., Soprano, K.J. (2004) **Retinoic acid receptors and cancer.** *Annu. Rev. Nutr.*, 24: 201-21.
- Stein, G.H. (1979) **T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibit stationary phase G1 arrest in vitro.** *J. Cell. Physiol.*, 99: 43-54.
- Stoilov, I., Jansson, I., Sarfarazi, M., Schenkman, J.B. (2001) **Roles of cytochrome p450 in development.** *Drug Metabol. Drug Interact.*, 18: 33-55.

- Sucov, H.M. & Evans, R.M. (1995) **Retinoic acid and retinoic acid receptors in development.** *Mol. Neurobiol.*, 10: 169-84.
- Summerbell, D., Maden, M. (1990) **Retinoic acid, a developmental signaling molecule.** *Trends Neurosci.*, 13: 142-7.
- Sun, S.Y. & Lotan, R. (2002) **Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention.** *Critical Rev. Oncol. Hematol.*, 41: 41-55.
- Sun, S.Y., Wan, H., Yue, P., Hong, W.K., Lotan, R. (2000) **Evidence that retinoic acid receptor β induction by retinoids is important for tumor cell growth inhibition.** *J. Biol. Chem.*, 275: 17149-53.
- Tahayato, A., Dollé, P. & Petkovich, M. (2003) **Cyp26C1 encodes a novel retinoic acid-metabolizing enzyme expressed in the hindbrain, inner ear, first branchial arch and tooth buds during murine development.** *Gene Expres. Pattern*, 3: 449-54.
- Taimi, M., Helvig, C., Wisniewski, J., Ramshaw, H., White, J., Amad, M., Korczak, B. & Petkovich, M. (2004) **A novel human cytochrome P450, Cyp26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid.** *J. Biol. Chem.*, 279: 77-85.
- Trofimova-Griffin, M. & Juchau, M.R. (2002) **Developmental expression of cytochrome CYP26B1 (P450RAI-2) in human cephalic tissues.** *Dev. Brain Res.*, 136: 175-78.
- Valentini, S.R. & Armelin, M.C. (1996) **Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion.** *J. Endocrinol.*, 148: 11-7.
- Valentini, S.R., Oliveira, M.L., Sasahara, R.M. & Armelin, M.C. (1994) **Glucocorticoid-regulated gene in transformed to normal phenotypic reversion.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27: 541-6.
- Van Exuden, J., Wouters, W., Ramaekers, F.C., Krekels, M.D., Dillen, L., Borgers, M., Smets, G. (1998) **The antiproliferative activity of all-trans-retinoic acid catabolites and isomers is differentially modulated by liarozole-fumarate in MCF-7 human breast cancer cells.** *Br. J. Cancer*, 77: 1229-35.
- Vedoy, C.G. & Sogayar, M.C. (2002) **Isolation and characterization of gene associated with the antitumor activity of glucocorticoids.** *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 106: 57-69.
- Xu, X.C., Liu, X., Tahara, E., Lippman, S.M., Lotan, R. (1999) **Expression and up-regulation of retinoic acid receptor-beta is associated with**

- retinoid sensivity and colony formation in esophageal cancer cell lines.** *Cancer Res.*, 59: 2477-83.
- Wan, H., Oridate, N., Lotan, D., Hong, W.K., Lotan, R. (1999) **Overexpression of retinoic acid receptor β in head and neck squamous cell carcinoma cells increases their sensivity to retinoid-induced suppression of squamous differentiation by retinoids.** *Cancer Res.*, 59: 3518-26.
- Wang, Y., Zolfaghari, R., Ross, A.C. (2002) **Cloning of rat cytochrome P450RAI (CYP26) cDNA and regulation of its gene expression by all-trans retinoic acid in vivo.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 401: 235-43.
- Weber, E., Ravi, R.K., Knudsen, E.S., Williams, J.R., Dillehay, L.E., Nelkin, B.D., Kalemkerian, G.P., Feramisco, J.R., Macry, M. (1999) **Retinoic acid-mediated growth inhibition of small cell lung cancer cells is associated with reduced myc and increased p27Kip1 expression.** *Int. J. Cancer*, 80: 935-43.
- Wei, L.N. (2003) **Retinoid receptors and their coregulators.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43: 47-72.
- White, J.A., Beckett-Jones, B., Guo, Y.D., Dilworth, F.J., Bonasoro, J., Jones, G. & Petkovich, M. (1997) **cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450.** *J. Biol. Chem.*, 272: 18538-41.
- White, J.A., Guo, Y., Baetz, K., Beckett-Jones, B., Bonasoro, J., Hsu, K.E., Dilworth, F.J., Jones, G. & Petkovich, M. (1996) **Identification of the retinoic acid-inducible all-trans retinoic acid 4-hydroxylase.** *J. Biol. Chem.*, 271: 29922-7.
- White, J.A., Ramshaw, H., Taimi, M., Stangle, W., Zhang, A., Everingham, S., Creighton, S., Tam, S.P., Jones, G. & Petkovich, M. (2000) **Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6403-8.
- Won, J.Y., Nam, E.C., Yoo, S.J., Kwon, H.J., Um, S.J., Han, H.S., Kim, S.H., Byun, Y., Kim, S.Y. (2004) **The effect of cellular retinoic acid binding protein-I expression on the CYP26-mediated catabolism of all-trans retinoic acid and cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma.** *Metabolism*, 53: 1007-12.
- Yang, L., Zhao, Li, S.W., Ahrens, K., Collins, C., Eckenrode, S., Ruan, Q.G., McIndoe, R.A. & She, J.X. (2003) **Gene expression profiling during all-trans retinoic acid-induced cell differentiation of acute promyelocytic leukemia cells.** *J. Mol. Diagn.*, 5: 212-21.

- Zhang, J.W., Wang, J.Y., Chen, S.J., Chen, Z. (2000) **Mechanisms of all-trans retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells.** *J. Biosci.*, 25: 275-84.
- Zhang, W.L., Tsuneishi, S. & Nakamura, H. (2001) **Induction of heat shock proteins and its effects on glial differentiation in rat C6 glioblastoma cells.** *Kobe J. Med. Sci.*, 47: 77-95.
- Zhao, Q., Dobbs-McAuliffe, B., Linney, E. (2005) **Expression of cyp26b1 during zebrafish early development.** *Gene Expr. Patterns*, 5: 363-9.
- Zhu, W., Kanoh, M., Ye, P., Laszkiewicz, I., Royland, J.E., Wiggins, R.C. & Konat, G. (1992) **Retinoic acid-regulated expression of proteolipid protein and myelin- associated glycoprotein genes in C6 glioma cells.** *J. Neurosci. Res.*, 31: 745-50.

10 CURRICULUM VITAE

1. Dados pessoais

Nome: Ana Paula Guedes Hasegawa
 Filiação: Paulo Tetuia Hasegawa e
 Sonia Guedes Hasegawa
 Nascimento: 19/04/1978, São Paulo/SP – Brasil
 Carteira de identidade: 29.308.929-2 - SSP/SP,
 CPF: 291.990.788-30

2. Formação acadêmica / Titulação

2000	Iniciação científica em Biologia Celular e Molecular Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil Título: Análise temporal dos receptores de ácido retinóico durante a reversão fenotípica de células C6/ST1 de glioma de rato Orientador(a): Mari Cleide Sogayar Supervisor: Mário Henrique Bengtson Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil
1996-2000	Graduação em Farmácia e Bioquímica Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
2004	Estágio de Doutorado-Sanduiche Cancer Research Institute Queens's University, Kingston, ON, Canadá Orientador: P. Martin Petkovich Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil
2001-2005	Doutorado em Ciências (Área de Bioquímica e Biologia Molecular) Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil Título: Mecanismos moleculares envolvidos na resposta anti-tumoral e resistência a atRA Orientador(a): Mari Cleide Sogayar Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil

3. Produção científica

3.1. Trabalhos apresentados em eventos

1. **HASEGAWA**, Ana Paula; COLIN, Christian; SOGAYAR, Mari Cleide. *Cloning of the full length cDNA encoding rat P450RAI-2, a transcript upregulated during atRA-induced tumor-to-normal phenotypic reversion*. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu – MG, 2003.
2. **HASEGAWA**, Ana Paula; COLIN, Christian; BENGTON, Mário Henrique; SOGAYAR, Mari Cleide. *Cloning of the rat P450RAI-2 and isolation of rat glioma cells resistant to RA-induced tumor-to-normal phenotypic reversion*. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu – MG, 2002.
3. BENGTON, Mário Henrique; OLIVEIRA, Leonardo Rodrigues; COLIN, Christian; **HASEGAWA**, Ana Paula; MARIA-ENGLER, Sylvia; SOGAYAR, Mari Cleide. *All-trans retinoic acid induction of the tumoral-normal ST1 rat cells phenotypic reversion: molecular and cellular characterization*. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu – MG, 2002
4. BENGTON, Mário Henrique; Oliveira, Leonardo Rodrigues; COLIN, Christian; **HASEGAWA**, Ana Paula. *Study of the molecular basis of the tumor to normal phenotypic reversion induced by retinoic acid in C6/ST1 cells*. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu – MG, 2001.

4. Atividades didáticas

1. SOGAYAR, M.C.; VEDDY, C.G.; Nunes, D.N.; LABRIOLA, L.; FORTUNA, V.A.; CAMPOS, A.C.V.; **HASEGAWA**, A.P.G.; FUJITA, A.; MACEDO, A.F.A.; COLIN, C.; FESTA, F.; LOJUDICE, F.H.; VALENZUELA, J.C.B.; KROGH, K.; RODRIGUES, L.O.; CRUZ, L.O.; DEMASI, M.A.A.; FIGUEIRA, R.C.S.; BROCHADO, S.M.; DEGAKI, T.L.; MONTOR, W.R. **Biologia Molecular da Transformação Maligna**. 2004. (Curso de curta duração ministrado no IQ-USP)
2. SOGAYAR, M.C.; **HASEGAWA**, A.P.G.; MACEDO, A.F.A.; COLIN, C.; VEDDY, C.G.; NUNES, D.N.; FESTA, F.; ORTIS, F.; LOJUDICE, F.H.; KROGH, K.; MASSIRER, K.B.; RODRIGUES, L.O.; CARVALHO, L.H.S.; CRUZ, L.O.; DEMASI, M.A.A.; BENGTON, M.H.; FIGUEIRA, R.C.S.; BROCHADO, S.M.; DEGAKI, T.L.; MONTOR, W.R. **Biologia Molecular da Transformação Maligna**. 2002. (Curso de curta duração – IQ-USP)
3. SOGAYAR, M.C.; **HASEGAWA**, A.P.G.; MACEDO, A.F.A.; COLIN, C.; FESTA, F.; ORTIS, F.; LOJUDICE, F.H.; KROGH, K.; MASSIRER, K.B.; RODRIGUES, L.O.; LABRIOLA, L.; CARVALHO, L.H.S.; CRUZ, L.O.; BENGTON, M.H.; FIGUEIRA, R.C.S.; BROCHADO, S.M.; DEGAKI, T.L.; MONTOR, W.R. **Ferramentas de Engenharia Genética aplicadas à Biotecnologia**. 2002 (Curso de curta duração – IQ-USP)
4. SOGAYAR, M.C.; **HASEGAWA**, A.P.G.; FLATSCHART, A.V.F.; ORTIS, F.; MASSIRER, K.B.; RODRIGUES, L.O.; CARVALHO, L.H.S.; CRUZ, L.O.; BROCHADO, S.M.; MARIA-ENGLER, S.S.; CORREA, T.C.S.; MONTOR, W.R. **Ferramentas de Engenharia Genética aplicadas à Biotecnologia**. 2001 (Curso de curta duração – IQ-USP)