VIVIANE DIAS FAUSTINO

**Inibição simultânea dos genes antiapoptóticos
Bcl-2 e *Bcl-XL* em células de leucemia linfóide aguda e
células de linfoma do manto mediante RNA de
interferência**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientador: Prof^o. Dr. Sergio Paulo Bydlowski

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Faustino, Viviane Dias

Inibição simultânea dos genes antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-X_L em células de leucemia linfóide aguda e células de linfoma do manto mediante RNA de interferência / Viviane Dias Faustino. – São Paulo, 2012.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sergio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Terapia de genes 2.Interferência de RNA 3.Neoplasias 4.Genes Bcl-2 5.Proteína Bcl-XL 6.Inibição simultânea 7.Apoptose

USP/FM/DBD-295/12

*Quem não compreende um olhar, tão pouco entenderá uma longa
explicação.*

MÁRIO QUINTANA

*A minha linda **Mãe Maria** por seu amor incondicional.*

Você é o meu exemplo de vida

Amo você!

*A minha querida **Irmã Christiane** por estar sempre ao meu lado.*

*Ao pai dos meus filhos e companheiro **Rubens** por compartilhar
todos os momentos.*

*Aos meus **filhos Gabriel e Sarah**.*

A mamãe vive para vocês!

*A **Deus** por ter me abençoado com o privilégio da vida
ao lado de pessoas tão maravilhosas.*

Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY

Agradecimentos

- Agradeço ao querido **Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski**, por me orientar, pela oportunidade, pelos ensinamentos e amizade que sempre me mostrou.

- À **Luciana Ferreira Morganti Maselli**, pela amizade e pelos conselhos que levarei sempre comigo.

- Meus sinceros agradecimentos ao **Jorge Luis María Ruiz** pela amizade, por ser meu professor e por compartilhar de vários momentos sempre me ajudando.

- À **Cleide Appolonio**, pelo carinho, conselhos, atenção e amizade que sempre me mostrou em todos os momentos.

- À **Carolina Martinez Romão** e **Karolline Santana**, pela amizade, pelas discussões de meu trabalho, pelo apoio, por sempre me ajudar. Levarei a amizade de vocês por toda a vida.

- A **Natalia Mastantuono** e **Carolina Macedo**, pela amizade e companheirismo.

- À **Dra. Adriana Debes** pela amizade e por me transmitir conhecimento.

- À colega **Dra. Débora Levi** por me transmitir conhecimento.

- Aos colegas de pós-graduação **André, Ana Carolina e Joel**, pelas dificuldades que passamos juntos.

- Aos meus colegas do LIM-31, **Nair, Denise, Rosangela, Joel, Bruna, Natalia, Linah, Paula**, pela colaboração, coleguismo e respeito.

- Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente **Angélica e Rose**, pela atenção e dedicação em todos os momentos, durante o curso de pós-graduação.

- Aos meus **cachorros e passarinhos** que sempre alegram o meu dia.

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, a minha formação como pesquisadora e ser humano, meus sinceros agradecimentos.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2012.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo geral	5
2.2 Objetivos específicos	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1.Oncogênese	7
3.2 Apoptose	7
3.3 Família Bcl-2 (B-cell lymphoma 2).....	12
3.4 Linfomas.....	15
3.4.1 Definição, Incidência e Etiologia	15
3.4.2 Linhagem celular Granta-519	17
3.5 Leucemias	18
3.5.1 Definição, Incidência e Etiologia	18
3.5.2 Linhagem celular Jurkat.....	19
3.6 Terapia Gênica.....	19
3.6.1 Terapia Gênica e RNA de interferência	22
3.6.2 Parâmetros para o desenho de RNAs de interferência	27
4. MÉTODOS.....	30
4.1 Cultivo celular.....	31
4.2 RNA de interferência (RNAi)	31
4.3 Teste de citotoxicidade do RNAi	32
4.4 Padronização da internalização celular do RNAi	33
4.5 Verificação do IC50 do etoposide	34
4.6 Padronização do ciclo celular com indução da apoptose pelo etoposide	35

4.7 Análise do ciclo células após silenciamento gênico	35
4.8 Quantificação dos processos apoptóticos	36
4.9 Análise das proteínas Bcl-2.....	38
4.9.1 Imunofenotipagem para avaliação da proteína Bcl-2	38
4.10 Análise da expressão dos genes Bcl-2 e Bcl-XL	39
4.10.1 Extração de RNA total	39
4.10.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	40
4.11 Análise Estatística	43
 5. RESULTADOS	 44
5.1 Citotoxicidade do RNAi.....	45
5.2 Análise da Internalização celular dos RNAi	45
5.3 Citotoxicidade do etoposide	47
5.4 Citotoxicidade do etoposide nas linhagens tratadas com RNAi	48
5.5 Padronização da quantificação das fases do ciclo celular.....	49
5.6 Análise do ciclo celular após o silenciamento gênico	53
5.7 Inibição da expressão do Bcl-2	57
5.8 Quantificação da morte celular.....	59
5.9 Expressão gênica do Bcl-2 e Bcl-XL	62
 6. DISCUSSÃO.....	 65
7. CONCLUSÕES.....	75
8. ANEXOS	77
9. REFERÊNCIAS	83

RESUMO

Faustino VD. Inibição simultânea dos genes antiapoptóticos *Bcl-2* e *Bcl-XL* em células de leucemia linfóide aguda e células de linfoma do manto mediante RNA de interferência. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

As estatísticas relacionadas aos cânceres hematológicos indicam que a incidência e mortalidade dessas doenças têm aumentado ao longo dos anos. Embora a maioria dos casos de linfomas e leucemias não possua etiologia definida, sugere-se que fatores genéticos possam estar envolvidos. Nesse contexto, destaca-se a família de proteínas Bcl-2, divididas em anti e pró-apoptóticas. Os genes *Bcl-2* e *Bcl-XL*, membros de uma nova classe de oncogenes, que atuam no mecanismo de morte celular das células cancerígenas, sobretudo apoptose, a qual é controlada por numerosos sinais intra e extracelulares. Uma nova estratégia para o tratamento desta doença inclui a terapia gênica mediada por RNA de interferência, que silencia importantes genes, a exemplo dos genes da família Bcl-2. Visto que o silenciamento isolado de um único gene pode não ter resultados expressivos, o presente trabalho teve por objetivo desenhar um RNA de interferência (RNAi) homólogo a dois tipos distintos de RNA mensageiro (RNAm) e inibir simultaneamente os genes *Bcl-2* e *Bcl-XL*, assim como testar a inibição isolada dos mesmos. Amostras de linhagem tumoral Jurkat e Granta-519 foram avaliadas após transfecção com os seguintes RNAi: *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-2/Bcl-XL*, *Bcl-2+Bcl-XL* e *scramble*. Os nossos achados evidenciam que, na linhagem Granta-519, a sequência do RNAi *Bcl-2* inibe, isoladamente ou conjugado ao *Bcl-XL*, o gene *Bcl-2*. Deste modo, o RNAi *Bcl-2* apresenta-se mais eficiente no mecanismo de silenciamento gênico, uma vez que propicia a morte celular frente a toxicidade do quimioterápico etoposide.

Descritores: terapia de genes, interferência de RNA, neoplasias, gene *Bcl-2*, proteína *Bcl-XL*, inibição simultânea, apoptose.

SUMMARY

Faustino VD. Simultaneous inhibition of antiapoptóticos Bcl-2 and Bcl-XL genes acute lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by RNA interference. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2012.

The hematological cancer statistics indicates that its incidence and mortality have increased over the years. Although most cases of lymphomas and leukemias has no definite etiology however is suggested that genetic factors may be involved. In this context there is the Bcl-2 proteins family divided into anti-apoptotic and pro-apoptotic which *Bcl-2* and *Bcl-XL* genes are members of a new class of oncogenes that act in cancer cells death mechanisms, especially apoptosis, that is controlled by numerous intra-and extracellular signals. Among new strategies to treat hematological cancer includes gene therapy mediated by RNA interference, which can decrease expression of genes like Bcl-2 family components. Studies of single gene silencing have not shown significant results so this study aimed to design an RNA interference (iRNA) homologous to two distinct types of messenger RNA (mRNA) and inhibit both genes Bcl-2 and Bcl-XL -XL as well as test the inhibition. Commercial cells Jurkat and Granta-519 were evaluated after transfection with iRNA as follows: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL and scramble. Our findings show that in Granta-519 cell line Bcl-2 RNAi sequence inhibits, alone or conjugated to Bcl-XL, *Bcl-2* gene. Thus RNAi Bcl-2 appears more effective in gene silencing mechanism as it promotes cell death due chemotherapeutic agent etoposide toxicity.

Descriptors: gene therapy, RNA interference, neoplasms, Bcl-2 gene, protein Bcl-XL, simultaneous inhibition, apoptosis

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Abs	Absorbância
ADA	Adenosina Desaminase
ATP	Adenosina trifosfato
AN	Anexina V
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVA	Vírus adeno-associados
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfoxido
dsRNA	<i>Double stranded RNA</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IC50	Concentração inibitória de 50%
ISO	Isotípico
LCM	Linfoma de células do manto
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA	Leucemias linfoides agudas
LLC	Leucemias linfoides crônicas
LMA	Leucemias mieloides agudas
LNH	Linfoma não Hodgkin
miRNA	microRNA
MTT	<i>Methyl Thiazolyl Blue</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>

PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídio
Real	<i>Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms</i>
RISC	Complexo multi-proteico de silenciamento induzido pelo RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reverse transcription PCR
SC	Scramble
SFB	Soro fetal bovino
shRNA	<i>Short hairpin RNAs</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral

Lista de figuras

Figura 1.	Representação das vias de ativação e execução da apoptose.....	11
Figura 2.	Representação da possível interação entre os membros antiapoptóticos e próapoptóticos da família Bcl-2.....	13
Figura 3.	Formas de administração do material genético terapêutico.....	22
Figura 4.	Esquema das vias que levam à interferência por microRNAs e siRNAs.....	26
Figura 5.	Representação esquemática da conjugação do material genético ao lipossoma.	27
Figura 6.	Esquema para visualização, quantificação dos processos apoptóticos por meio da marcação com Anexina V FITC (AN)/ Iodeto de Propídeo (PI) em citometria de fluxo	37
Figura 7.	Viabilidade celular (%), após 72 horas de incubação com diferentes concentrações do RNAi Scramble	45
Figura 8.	Células Jurkat incubadas com 10 nM de RNAi conjugado com Cy5.....	46
Figura 9.	Curvas de viabilidade celular (%) das células Granta-519 e Jurkat tratadas por 24 horas com diferentes concentrações ...	47
Figura 10.	Concentração de etoposide (nM) necessária para inviabilizar 50% da população celular das linhagens Granta-519 e Jurkat.....	48
Figura 11.	Curvas de viabilidade celular (%) das células Granta-519 e Jurkat transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi).....	49

Figura 12. Células Jurkat após incubação com etoposide (2h, 4h e 24h) para determinação do melhor tempo de incubação.....	50
Figura 13. Células Granta-519 após incubação com etoposide (2h, 4h e 24h) para determinação do melhor tempo de incubação....	51
Figura 14. Quantificação (Eventos %) das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	52
Figura 15. Quantificação (Eventos %) das células Granta-519 nas fases do ciclo celular (Apoptose, G0/G1, S e G2M) transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi).....	54
Figura 16. Quantificação (Eventos %) das células Jurkat nas fases do ciclo celular (Apoptose, G0/G1, S e G2M) transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi)	55
Figura 17. Quantificação (Eventos %) das células Granta-519 e Jurkat apoptose das células transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) na presença e ausência de etoposide por 4 horas.....	56
Figura 18. Quantificação (Eventos %) das células Granta-519 vs. Jurkat sem etoposide e Granta-519vs+ETP vs. Jurkat+ETP	57
Figura 19. Quantificação (Eventos %) da população negativa das células Granta-519 e Jurkat com ou sem incubação de 4 horas com etoposide.....	58
Figura 20. Quantificação (Eventos %) da população das células em apoptose Granta-519 e Jurkat transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) por marcação com Anexina V	60

Figura 21. Quantificação (Eventos %) da população das células, em necrose, Granta-519 e Jurkat transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) por marcação com Anexina V.....	61
Figura 22. Quantificação (Ct) da amplificação do PCR em tempo real dos genes Bcl-2, Bcl-XL e GAPDH nas linhagens Granta-519.....	63
Figura 23. Quantificação relativa da expressão gênica (RQ) dos genes Bcl-2 (A) e Bcl-XL das linhagens de células Granta-519 e Jurkat, transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi).....	64

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequências dos RNAi utilizados para o silenciamento gênico.	23
Tabela 2. Sequência de primers utilizados	35

1. Introdução

Um evidente problema de saúde pública mundial, o câncer, corresponde a um grupo heterogêneo de doenças que compartilham alguns mecanismos biológicos principais, que se iniciam no âmbito molecular e, progressivamente, evoluem para o ambiente gênico, cromossômico, nuclear, celular, tecidual, orgânico e sistêmico. Alguns desses mecanismos podem ser listados tais como, a proliferação celular exacerbada, capacidade de se estender para além do tecido em que se originam, e/ou diminuição dos níveis de morte celular, sobretudo a apoptose (Lowe, 2000; Okada & Mak, 2004).

A apoptose é um dos principais meios regulatórios das populações celulares. Uma alteração neste mecanismo poderia ser responsável pelo desencadeamento da quebra na homeostase celular e, conseqüentemente, desenvolvimento de neoplasias (Lowe, 2000).

Alguns tipos de tumores são desencadeados ou mantidos por genes cuja função esta relacionada à morte celular. O gene *Bcl-2*, membro de uma nova classe de oncogenes, interessante, atua inibindo o processo de regulação da apoptose (Schmitt et al., 2007). A família de proteínas Bcl-2 é dividida em dois grupos, um formado por membros anti-apoptóticos, destacando-se o Bcl-2 e o Bcl-XL; o segundo grupo formado por membros pró-apoptóticos, associados à proteína X como fatores de morte, chamado Bax (Reed et al., 1998; Adams & Cory, 1998).

Sugere-se que o grupo de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 está atrelado às transformações neoplásicas hematológicas (linfomas foliculares, difusos de grandes células e leucemias linfoides crônicas) ou não

hematológicas (cânceres de mama, próstata, cólon, entre outros) (Lessene et al., 2008). A descoberta da superexpressão de *Bcl-2* e *Bcl-XL* ocorreu após a observação do aumento da sobrevivência das células tumorais, as quais foram protegidas da toxicidade causada pelos quimioterápicos e inibição da apoptose. A alta concentração intracelular das proteínas Bcl-2 pode ser vista, principalmente, nas recidivas das leucemias mieloides agudas (LMA) e leucemias linfoides agudas (LLA) (Dole et al., 1994, Filipits, 2000; Donovan & Cothier, 2004).

Compreender os mecanismos e as alterações nos componentes das vias da apoptose e sua correlação com a incidência dos diversos tipos de cânceres torna-se essencial, mediante necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas para a prevenção destas doenças (Grivicich et al., 2007). Assim, destaca-se o processo de interferência mediado por RNA que, além de ser uma importante ferramenta de pesquisa *in vivo*, é uma grande promessa na terapia gênica para o silenciamento de genes, a exemplo dos genes da família Bcl-2 (Castanotto et al., 2007; Guo et al., 2010).

Visto que o silenciamento isolado de apenas um gene pode não ter resultados expressivos (Han et al., 1996), o presente trabalho teve por objetivo criar um RNAi homólogo a dois tipos diferentes de RNA mensageiro (RNAm), cuja função é inibir simultaneamente importantes genes antiapoptóticos da família Bcl-2: *Bcl-2* e *Bcl-XL*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Aprofundar o estudo dos mecanismos de silenciamento gênico, através da verificação da capacidade de inibição simultânea da expressão de Bcl-2/Bcl-XL por um RNAi específico.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a eficiência dos diferentes RNAi capazes de inibir a expressão de *Bcl-2* e *Bcl-XL*, em células de leucemia linfóide aguda (Jurkat) e células de linfoma do manto (Granta-519);
- Comparar a eficiência da inibição, mediante RNAi, dos genes antiapoptóticos nos dois grupos celulares;
- Avaliar a sensibilidade e apoptose das células tratadas mediante diferentes concentrações de Etoposide.

3. Revisão de literatura

3.1 Oncogênese

O dano genético não letal é o ponto inicial para oncogênese. Tal lesão genética pode ser adquirida por ação do ambiente (químicos, radiação, vírus), ser herdada através das células germinativas ou mesmo ser desenvolvida de modo espontâneo. Logo, um tumor é formado pela expansão clonal de uma única célula precursora, a qual sofreu lesão ou modificação genética (Hanahan et al., 2000; Strasser et al., 2000).

Existem quatro classes de genes cuja função normal é reguladora e são os principais alvos de lesões genéticas desencadeadoras da oncogênese, a saber: 1) protooncogenes ou genes que estimulam a proliferação celular e respondem pela codificação de produtos (oncoproteínas); 2) genes supressores de tumor ou inibidores de crescimento tumoral; 3) genes envolvidos no reparo de DNA e, por fim, 4) genes reguladores da morte celular programada ou apoptose (Hanahan et al., 2000).

3.2 Apoptose

Inicialmente, definiu-se o fenômeno de morte celular como um processo passivo, de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Neste contexto, tal processo decorria de injúrias e estudá-lo permitia um melhor entendimento dos eventos celulares associados a algumas doenças (Yu & Choi, 2000).

Descoberto, independentemente, diversas vezes ao longo dos últimos 150 anos, alguns pesquisadores consideraram a morte celular um evento fisiológico, necessário para o desenvolvimento normal e manutenção morfológica dos tecidos, sendo estudada preferencialmente nos tecidos embrionários (Kerr et al., 1972; Raff, 1992). Outros pesquisadores propuseram o termo “morte celular programada”, a partir da identificação de um tipo induzido de morte celular (Lockshin, 1964).

Assim, os tipos de morte celular podem ser classificados de acordo com as suas propriedades morfológicas e bioquímicas peculiares em: Apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência (Okada & Mak, 2004; Castedo et al., 2004). Alterações na coordenação desses tipos de morte celular estão implicadas na tumorigênese (Ranganath et al., 2001).

Para que a morte celular seja classificada como apoptótica, deve-se observar a presença de condensação e fragmentação da cromatina nuclear, além de quebra cromossomal do DNA e formação de corpos apoptóticos contendo fragmentos de célula morta e membrana plasmática íntegra (Edinger & Thompson, 2004; Elmore, 2007). Assim, a apoptose pode ser descrita como uma vertente específica de morte celular a qual envolve mecanismos celulares programados, geneticamente codificados, de autodestruição em resposta a um sinal (Baekelandt et al., 2000). É um evento natural de remoção das células indesejadas, a exemplo, células que sofreram mutações potencialmente danosas ou alterações de controle do ciclo celular (Strasser et al., 2000; Fesik et al., 2005).

Reconhecida por características morfológicas marcantes e coordenadas, de um modo geral, a apoptose ocorre rapidamente, com a retração da célula e consequente perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas (Ziegler & Groscurth, 2004; Elmore, 2007). As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção das mitocôndrias, as quais podem apresentar ruptura da membrana externa (Edinger & Thompson, 2004).

Ao analisar a alta frequência de morte celular nos tumores, estudos relacionaram este evento aos fenômenos homeostáticos, reguladores do número de células, que promovem um equilíbrio entre a perda e o ganho celular (Hengartner, 2000; Wöhr & Racker, 1999). Na patogênese do câncer, a apoptose é extremamente importante, uma vez que as células tumorais frequentemente apresentam alta resistência ao tratamento radioterápico ou quimioterápico, em resposta ao descontrole ou inibição da via apoptótica (Thompson, 1999; Wöhr & Hacker, 1999).

A apoptose também se vincula à morte das células queratinizadas, na seleção clonal de linfócitos B, no desenvolvimento embrionário, na organogênese, na renovação de células epiteliais e hematopoiéticas, na evolução cíclica dos órgãos reprodutivos da mulher, na evolução de alguns órgãos, entre outros (Boos et al., 2003; Hengartner, 2000; Kerr, 1993; Martin et al., 1998; Wöhr & Hacker, 1999).

Inúmeros tipos de genes estão envolvidos na regulação da divisão celular normal, proliferação e morte celular (Osborne & Schwartz, 1994). Mudanças nos genes que regem a apoptose podem levar ao acúmulo de

células neoplásicas, induzir à taxa de crescimento e destruição celular (Kumar et al., 2005). Alguns tipos de genes envolvidos neste processo podem ser mencionados tais como, os genes responsáveis por desencadear a apoptose, genes envolvidos no próprio evento apoptótico, genes necessários à fagocitose dos corpos apoptóticos e genes requeridos à dissolução final dos corpos apoptóticos fagocitados (Osborne & Schwartz, 1994).

Em princípio, a apoptose representa um processo biomolecular complexo, com duas vias alternativas e convergentes de sinalização: a extrínseca ou extracelular mediada por receptores celulares, tais como o Fator de necrose tumoral α (TNF- α), que se ligam a receptores na membrana plasmática (Schmitz et al., 2000). Seus domínios intracelulares recrutam e ativam uma cascata de enzimas proteolíticas, que utilizam a cisteína como grupo nucleofílico na clivagem de proteínas, conhecidas como caspases (do inglês, *cysteine-aspartic-acid-proteases*) (Wallach et al., 1999), desencadeando a apoptose.

Cerca de quatorze caspases, respectivos substratos e alvos celulares, já foram identificados, cada um representando um braço efetor na cascata do programa de apoptose. Tais proteases são sintetizadas como precursores inativos e são ativados em decorrência da sinalização induzida por estímulos patofisiológicos (Kaufmann et al., 2008). Além disso, estas enzimas medeiam à morte celular além de contribuírem na atividade do sistema imune para a maturação das citocinas (Strasser et al., 2000).

Na figura 1 podemos observar os diferentes mecanismos de ativação e execução da apoptose.

Figura 1. Representação das vias de ativação e execução da apoptose (Adaptado de Anderson, 2002).

A via intrínseca, intracelular ou mitocondrial, por sua vez, é ativada por uma gama de sinais apoptóticos, incluindo privação do fator de crescimento, hipóxia, estresse oxidativo e dano ao DNA. A partir destes estímulos, aumenta-se a permeabilidade mitocondrial, que causa a translocação do citocromo c, e consequente liberação de moléculas pró-

apoptóticas no citoplasma (Thompson, 1999; Wöhrl & Hacker, 1999; Zimmer, 2007). Assim como a via extrínseca, as caspases ativam e clivam substratos celulares, conduzindo a mudanças bioquímicas e morfológicas, que são características da apoptose (Igney et al., 2003).

Esta via é considerada a mais importante para a resposta do tratamento contra o câncer, com destaque para a família de genes denominada *Bcl-2*, responsável por regular a apoptose (Reed, 1997).

3.3 Família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)

O principal regulador biológico do processo de apoptose é o gene *Bcl-2*, diretamente envolvido no controle do processo intrínseco da apoptose (Zimmer, 2007).

Identificado no linfoma folicular humano, o gene *Bcl-2* codifica a família de proteínas Bcl-2, formada por uma cadeia de 239 aminoácidos, com peso molecular de 26kDa (Tomadaki & Scorilas, 2006) e atua suprimindo a morte celular programada, induzida por vários estímulos (Takayama et al., 1995; Kumar et al., 2005). Mais de 20 membros desta família já foram descritos, destacando-se as suas atividades funcionais, que permitem agrupá-los em pró-apoptóticos e anti-apoptóticos.

Existe uma interação física entre os membros pró e antiapoptóticos da família Bcl-2 (Figura 1), formando homo e heterodímeros e a proporção relativa entre essas proteínas vai determinar a sensibilidade celular ao estímulo desencadeador do processo apoptótico (Strasser et al., 2000; Baekelandt et al., 2000).

Os componentes pró-apoptóticos comumente descritos são Bax, Bak, Bad, Bim, Bok e Bcl-XL_S, seguidos dos componentes antiapoptóticos Bcl-2, Bcl-XL, Mcl1 e Bcl-XLW (Figura 2) (Takayama et al., 1995; Baekelandt et al., 2000).

Figura 2. Representação da possível interação entre os membros antiapoptóticos (branco) e pró-apoptóticos (preto) da família Bcl-2, presente na membrana externa mitocondrial (Adaptado de Vaskivuo, 2002).

As proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, estruturalmente relacionadas à via apoptótica, são os principais membros antiapoptóticos (Kumar et al., 2005). Localizam-se na membrana celular, particularmente, na membrana mitocondrial, onde estabilizam o potencial de membrana e reduzem a permeabilidade (Kroemer, 1997). Esta ação inibe a liberação de substâncias tais como o citocromo c, a procaspase 3 e o fator de indução de apoptose, envolvidas com passos posteriores da apoptose ou na execução da mesma (Donovan & Cother, 2004; Lessene et al., 2008).

Ao expor as células a situações de estresse (hipóxia, radiação, entre outras) ou privá-las de estímulos de sobrevivência, ocorre a inativação dos membros antiapoptóticos da família Bcl-2 e substituição destes por membros pró-apoptóticos desta mesma família de proteínas (Strasser et al., 2000). O efeito da mudança reflete no aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de proteínas que ativam a cascata das caspases (Strasser et al., 2000).

A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (Vander & Thompson, 1999). A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos como dano ao DNA levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas e condicionam um estado de desequilíbrio que induz à apoptose (Petros et al., 2004).

Para que uma célula, que sofreu mutação em um gene ligado à proliferação celular, possa formar um tumor, é necessário que ela evite o processo de apoptose. O grupo de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 é geralmente associado à patogênese desfavorável do câncer (Lessene et al., 2008). Constitutivamente, altos níveis de Bcl-2 e/ou Bcl-XL têm sido relacionados com um fenótipo maligno mais agressivo, tanto em neoplasias hematológicas quanto em tumores sólidos (Juin et al., 2004; Cory & Adams, 2002), aumentando a sobrevivência das células tumorais e conferindo resistência à toxicidade dos reagentes quimioterápicos (Dole et al., 1994; Filipits, 2000; Donovan & Cother, 2004; Kang et al., 2009).

Apesar de Bcl-2 e Bcl-XL parecerem funcionalmente semelhantes, há evidências de que ambas diferem quanto a habilidade de proteção das células frente aos diferentes estímulos apoptóticos. Além disso, Bcl-2 também contribui para a sobrevivência prolongada das células tumorais, diminuindo a taxa de proliferação celular e permitindo o escape da destruição, pelas células efectoras do sistema imune (Gautschi et al., 2001). A proteína Bcl-XL, além de regular o potencial de membrana e o volume das mitocôndrias, também é capaz de formar um canal de íons na membrana lipídica (Amsterdam & Sasson, 2002; Debatin, 2004; Renner et al., 2003).

A superexpressão das proteínas Bcl-2 e Bcl-XL vincula-se a várias malignidades, como na maioria dos linfomas foliculares, em linfomas difusos de grandes células e em leucemias linfóide crônicas, além dos cânceres de mama, próstata, pele, cólon e pancreático. A alta concentração intracelular das proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, também está associada com a reincidência na leucemia mieloide e linfóide aguda (Ryder et al., 2012; Donovan & Cothier, 2004).

3.4 Linfomas

3.4.1 Definição, Incidência e etiologia

Entende-se por linfomas, um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas malignas, originadas a partir de células do tecido linfóide e que exibem distintos comportamentos clínicos, fatores patológicos e características epidemiológicas (Akanji, 2006; Hjalgrim, 2008).

Este grupo de doenças pode ser dividido fenotípica e morfológicamente em dois grupos denominados linfomas de Hodgkin (LH) e não Hodgkin (LNH). Em ambos os casos há substituição do tecido linfático normal por uma aglomeração de células linfáticas anormais (Ayala & Tomblyn, 2011; Hennessy et al., 2004; Silva, 2009).

A incidência de linfomas tem aumentado substancialmente, sendo mais comum entre indivíduos do sexo masculino, caucasianos e com idade avançada (Müller et al., 2005; Said et al., 2009). As diferenças nas taxas de incidência tendem a ser marcantes, principalmente em regiões menos desenvolvidas (Jemal et al., 2005; Roman et al., 2011). Em 2010, nos Estados Unidos, cerca de 8.490 novos casos de LH e 65.540 novos casos LNH foram diagnosticados. Já no Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (Inca), em média 8,5% pessoas morrem, por dia, com diagnóstico de linfoma (Ayala & Tomblyn, 2011).

A partir do reconhecimento de que alguns subtipos destes tumores apresentavam patogênese, aspectos imunofenotípicos e genéticos particulares, houve a necessidade de melhor compreender e, conseqüentemente, classificar os linfomas (Jack et al., 2004; Swerdlow et al., 2008). A classificação Real (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*), revisada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), separou as diferentes entidades de LH e LNH de acordo com as características acima descritas (Sander, 1997).

A maioria dos casos de linfomas não tem etiologia definida, no entanto, sugere-se que inúmeros genes contribuem para a proliferação e

controle celular, com destaque aos genes *Bcl-2* e o *Bcl-XL* (Reed et al., 1998; Adams & Cory, 1998).

3.4.2 Linhagem celular Granta-519

A Linhagem celular humana Granta-519 foi estabelecida a partir do sangue periférico de portadores de linfomas de células do manto (LCM), em fase leucêmica (Jadayel et al., 1997). Este subtipo de LNH de células B é maligno, de caráter agressivo (sobrevida média entre três e cinco anos) e, comumente, observado nos indivíduos do sexo masculino com idade avançada (Jadayel et al., 1997; Rudolph et al., 2004; Khosravi et al., 2007).

As células tumorais do LCM apresentam uma translocação t(11; 14)(q13; q32) que, na maioria dos casos, conduz a rearranjos do locus *Bcl-XL-1* e superexpressão do gene ciclina D1, gene crucial no controle do ciclo celular (Bosch et al., 1998; Jadayel et al., 1997; Campo, 2003). Alterações cromossômicas secundárias, somadas à translocação t(11; 14) (q13; q32) inicial, também respondem por desregular o ciclo celular e consequentemente desenvolvimento do LCM (Motokura et al., 1991; Bodrug et al., 1994; Lovec et al., 1994; Rudolph et al., 2004).

Neste contexto, sugere-se que na linhagem Granta-519, os genes antiapoptóticos *Bcl-2* e *Bcl-XL* são superexpressos, permitindo a proliferação celular exacerbada e bloqueando o mecanismo inato de defesa antineoplásico. A inibição da expressão desses genes apresenta relevância clínica, uma vez que os mesmos são empregados como potenciais alvos terapêuticos (Amin et al., 2003; De Leeuw et al., 2004; Rudolph et al., 2004).

3.5 Leucemias

3.5.1 Definição, Incidência e etiologia

Ao considerar os aspectos biológicos e morfológicos, as leucemias correspondem a um grupo de neoplasias malignas, caracterizadas pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfoides que, posteriormente, atingem a circulação periférica e infiltram outros sistemas orgânicos (Swerdlow et al., 2008).

A transformação leucêmica ocorre segundo as linhagens celulares mieloides e linfoides (Pui & Evans, 1998; Bain, 2003). Assim como as leucemias mieloides, as leucemias linfoides subdividem-se em crônica (LLC) e aguda (LLA), sendo esta última, definida pela presença de linfoblastos em mais de 20% do total de células nucleadas da medula óssea (Wang & Chen, 2000; Béné et al., 2001; Hamerschlak, 2008).

A LLA comumente desenvolve-se durante a infância/adolescência, contrastando, na idade adulta, onde responde por menos de 1% de casos (Whitlock, 1999). A incidência desta neoplasia, nos Estados Unidos, no ano de 2006, foi de 3930 casos, sendo que destes, 1300 acometiam indivíduos com mais de 18 anos (Whitlock et al., 1999). No Brasil, não há dados específicos da incidência de LLA, embora os dados do INCA (2010) apontem para uma elevada incidência nas regiões sul e sudeste do país.

De modo similar aos linfomas, as leucemias não apresentam etiologia definida e a alta expressividade dos genes *Bcl-2* e o *Bcl-XL* associam-se com a proliferação e descontrole celular que culminam com o

desenvolvimento desta doença (Broome & Wang, 2002; Broome et al., 2011).

3.5.2 Linhagem celular Jurkat

A Linhagem celular Jurkat trata-se de células T linfoblásticas, oriundas de amostras de sangue periférico de portadores de leucemia aguda (Pauly et al., 1984).

A fim de minimizar os efeitos da expressão exacerbada dos genes *Bcl-2* e *Bcl-XL*, Broome et al., (2011) sugeriram a inserção de um oligonucleotídeo antisenso, o qual é capaz de inibir o gene *Bcl-XL* em células de LLA. Os resultados obtidos demonstraram uma redução em torno de 75 e 30% nos níveis proteicos de Bcl-XL em células tumorais e células viáveis, respectivamente, quando comparadas às células controle.

3.6 Terapia gênica

A terapia gênica trata-se de um procedimento que envolve a introdução de material genético na célula de um organismo, visando manipular, substituir, suprimir ou introduzir genes para o tratamento de doenças genéticas congênitas ou adquiridas (Anderson, 1992; Weatherall, 1995). Assim, a terapia gênica desponta como ferramenta promissora no desenvolvimento de novas terapias (Martimprey et al., 2009).

Na década de 40, Avery et al., (1944) demonstraram que já era possível transferir informações genéticas de um organismo para outro, por

meio da clássica experiência de transferência de genes entre uma cepa patogênica para uma cepa não-patogênica, demonstrando assim que o DNA era o portador das informações genéticas (Portugal, 2010). Anos depois, Arthur Kornberg e Severo Ochoa receberam o prêmio Nobel ao elucidarem os mecanismos da síntese biológica do ácido desoxirribonucleico (DNA) e do ácido ribonucleico (RNA) (Kornberg, 1960). A hipótese de inserir genes em indivíduos que necessitassem, por motivos patológicos, chegou perto da realidade a partir do isolamento do primeiro gene (Ausubel et al., 1974).

A primeira correção genética em células de mamíferos cultivados *in vitro*, ocorreu em 1977, onde Michel Wigler e Richard Axel inserem o gene que codifica a enzima timidina quinase em células deficientes deste mesmo gene (Friedman, 1989; Weatherall, 1991). Mas, somente ao final da década de 80, o *National Institute of Health* (NIH) aprovou o primeiro protocolo clínico para teste de terapia gênica nos humanos em estado avançado de neoplasia maligna (Morsy et al., 1993; Weatherall, 1991). Em 1990, crianças portadoras de imunodeficiência combinada severa, caracterizada pela deficiência de adenosina desaminase (ADA), receberam genes normais de ADA, a partir do conhecimento das técnicas da terapia gênica (Anderson, 1992).

Alguns passos elucidam o sucesso dos procedimentos técnicos necessários da terapia gênica. Inicialmente, há necessidade de isolar o gene e sequências reguladoras correspondentes. Um segundo passo consiste na obtenção de um número adequado de células para reintrodução no paciente. O terceiro passo é importante para aperfeiçoar a inserção dos genes nas

células; no quarto passo necessita-se que o produto gênico inserido fique disponível, em quantidade suficiente e por um longo tempo, para que o gene possa se inserir no genoma celular e tenha o efeito desejado. Por fim, é imprescindível que todos esses procedimentos não apresentem efeitos colaterais indesejados (Weatherall, 1995).

Existem dois métodos de inserção das células somáticas no ser humano. A primeira corresponde à técnica *ex vivo* em que as células de interesse são retiradas do paciente, cultivadas *in vitro* e modificadas por meio da introdução de um vetor que contém um gene de interesse. Essas células passam a expressar o gene desejado e são reintroduzidas no paciente (Morsy et al., 1993). Na técnica *in vivo*, vetores (retrovírus, adenovírus e vírus adenoassociados – AVA) encaminharão o transgene diretamente ao órgão adequado, por aplicação sistêmica, direta no tecido alvo do paciente (Morsy et al., 1993; Xia et al., 2004; Yeh et al., 2005). A Figura 3 esquematiza as formas de administração do material genético terapêutico.

No entanto, o desenvolvimento de métodos mais seguros e eficazes, para a transferência gênica, continua sendo uma das barreiras tanto do ponto de vista técnico quanto ético.

Figura 3. Formas de administração do material genético terapêutico. **A)** Injeção *in situ* (*in vivo*), o gene terapêutico é injetado diretamente no tecido alvo. **B)** Injeção sistêmica (*in vivo*) o gene terapêutico é injetado sistemicamente. **C)** *Ex vivo*, as células de interesse são retiradas do paciente, cultivadas *in vitro*, modificadas através da introdução de um vetor contendo o gene de interesse e são reintroduzidas no paciente. (Adaptado de Anderson, 1992).

3.6.1 Terapia gênica e RNA de interferência

A utilização de moléculas de RNA dupla fita que atuam como silenciadores gênicos se destacaram dentre as conquistas recentes da terapia gênica (Fire et al., 1998; Takeshita & Ochiya, 2006).

O processo de interferência de RNA foi observado, no início da década de 90, por pesquisadores que buscavam aumentar os níveis de expressão dos genes responsáveis pela pigmentação púrpura em plantas (petúnias). Para isso, inseriu-se juntamente com o transgene, uma cópia do gene responsável pela produção da enzima que originava a cor púrpura. Ao

contrário do esperado, as plantas apresentaram flores brancas, sugerindo que a cópia extra do gene, para a pigmentação, estaria inibindo a expressão do gene endógeno e a síntese do pigmento, por silenciamento do transgene (França et al., 2010; Sifuentes-Romero et al., 2011). Denominado “cossupressão”, este fenômeno também foi observado em outras espécies de plantas e fungos (Sifuentes-Romero et al., 2011).

No mesmo período, outro estudo avaliou a função do gene *Par-1*, utilizando o *Caenorhabditis elegans*. De acordo com os resultados obtidos, o silenciamento gênico, a partir de moléculas de RNA dupla fita, teve seu mecanismo elucidado. A presença de algumas moléculas de RNA dupla fita (dsRNA, do inglês *double stranded RNA*) eram suficientes para inibir a expressão de um determinado gene, com sequência similar àquele dsRNA, caracterizando um mecanismo celular natural de silenciamento gênico pós-transcricional (Takeshita & Ochiya, 2006; Sifuentes-Romero et al., 2011).

O silenciamento gênico também foi descrito em cultura de células de mamíferos, sendo considerado um mecanismo de defesa dos organismos eucariontes para combater a infecção por RNA viral e transposons (Sun & Tsao, 2008; Ullu et al., 2004). As vias de silenciamento nas plantas, fungos e animais, compartilham um conjunto de proteínas, indicando que tais vias foram adquiridas ou inovadas pelos eucariotos (Zamore, 2002).

Os dsRNAs envolvidos no mecanismo do RNAi são classificados, quanto a sua origem e função, em pelo menos três categorias: microRNAs (miRNAs), *short interfering RNAs* (RNAi) e *short hairpin RNAs* (shRNAs) (Meister & Tuschl, 2004).

Os RNAs de interferência (RNAi), utilizados para silenciamento gênico, são segmentos curtos de RNA dupla fita (21-28 nucleotídeos) que, após pareamento com o RNAm alvo, desencadeiam a sua degradação catalítica, dependente de complexos citoplasmáticos multiproteicos e, portanto, causando o silenciamento específico do gene (Morris et al., 2004; Xu et al., 2004).

A utilização dos RNAi é um método eficaz de supressão seletiva da expressão gênica, superior às moléculas antisense ou ribozimas, uma vez que utilizam os mecanismos endógenos de silenciamento gênico (Bertrand et al., 2002; Buncrot et al., 2006). Por serem tão curtos, evitam a resposta do interferon, a citocina que ativa as células do sistema imune, em resposta a RNAs exógenos (Rana, 2007).

O emprego de RNAi, do ponto de vista terapêutico, é considerado promissor no combate de doenças genéticas dominantes, autoimunes, câncer e infecções virais (Aagaard & Rossi, 2007). Modelos experimentais têm sido utilizados, com sucesso, no silenciamento de genes importantes para a viabilidade, proliferação e disseminação de células tumorais (Zhang et al., 2004; Salvi et al., 2004).

O mecanismo de silenciamento por RNAi acontece quando os RNAs de dupla fita compridos (mais de 50 nt) são introduzidos no citoplasma e subsequentemente processados pela enzima DICER, uma RNase-III que cliva os RNA compridos de dupla fita em curtos fragmentos de 21-28 nucleotídeos com uma extremidade 5' fosfato e uma extremidade 3' com grupos hidroxila. Estes RNAs são chamados de RNAs de interferência curtos

ou pequenos, do inglês "*short interfering RNA*" (RNAi ou siRNA) e associam-se a um Complexo Multiprotéico de Silenciamento Induzido pelo RNA (RISC), do qual faz parte também a proteína Argonauta (Ago2) e outras proteínas (Pai et al., 2006; Rana, 2007).

O RNAi guia o RISC a um RNAm homólogo, onde hibridiza, especificamente, com sua sequência alvo e cliva o RNAm por *Slicer* (Argonauta-2), uma enzima que se encontra dentro do complexo RISC. As Ago2 ligam-se aos RNAi e apresentam atividade de endonuclease dirigida contra a fita de RNAm complementar ao RNAi e atuam na seleção da fita do RNAi, que será incorporada ao RISC (Rand et al., 2005; Höck & Meister, 2008). O RNAm alvo é então clivado em um sítio simples, no centro do duplex, formado pelo RNAm e o RNAi, resultando na degradação do RNAm. Essa degradação acontece quando a complementaridade entre RNAi e RNAm alvo é total e, quando parcial, ocorre repressão da tradução com posterior degradação do RNAm. Este processo de silenciamento é específico e eficiente, pois a cadeia antisense do RNA de dupla fita fica protegida dentro do complexo RISC e, portanto, é conservado e utilizado para degradar cópias adicionais de RNAm alvo (Pai et al., 2006; Rana, 2007; Rivas et al., 2005).

A figura 4 demonstra o mecanismo de interferência do RNA

Figura 4. Esquema das vias que levam à interferência por microRNAs e siRNAs (Adaptado de França et al., 2010).

Um dos maiores obstáculos encontrados na utilização dos RNAi como drogas terapêuticas, decorre da penetração deste na célula, através da membrana citoplasmática, de modo a ser incorporado na via de RNAi e causar a degradação do RNAm alvo no tecido de interesse (Fedorov et al., 2006; Song et al., 2005). Os RNAis, por serem altamente hidrofílicos e apresentarem átomos carregados que não conseguem atravessar as membranas celulares (Aagaard e Rossi, 2007).

No entanto, algumas estratégias empregam a introdução do RNAi quimicamente modificado, mediante conjugação ao colesterol ou protegidos dentro de lipossomas catiônicos (Figura 5) (Lorenz et al., 2004; Soutschek et al., 2004; Wolfrum et al., 2007). Porém, internalizar o RNAi *in vivo* é mais

difícil, devido ao fato de serem direcionados ao tecido-alvo, a fim de alcançar uma ação terapêutica (Chien et al., 2005).

A ligação de RNAi a lipossomas catiônicos melhora a farmacocinética e diminui a toxicidade dos RNAi, embora resulte também em amplo espectro de ação celular (de Fougérolles et al., 2007). Alguns grupos têm estudado o uso de vetores virais para a introdução de shRNAs em organismos. Entretanto, o uso de vetores virais ainda é questionado quanto a segurança para o emprego terapêutico (Yeh et al., 2005).

Figura 5. Representação esquemática da conjugação do material genético ao lipossoma.

3.6.2 Parâmetros para o desenho dos RNAs de interferência

Existem três atributos importantes que devem ser levados em consideração quando se deseja projetar e selecionar um RNA de

interferência, sendo estas (1) ter baixo conteúdo de grupos G/C dentro da região do RNAm alvo (30-50%); (2) evitar as primeiras 75 bases após o códon do início da transcrição e (3) evitar sequências de RNAs que possuam repetições internas ou palindrômicas que formam estruturas inter-RNAs em forma de pregas. Tais estruturas são similares a grampos (*hairpin loops*) e podem existir em equilíbrio com as formas de dupla fita, reduzindo a concentração efetiva e o potencial de silenciamento do RNAi (Elbashir et al., 2001; Reynolds et al., 2004). A estabilidade relativa e a propensão a formar grampos internos podem ser estimadas pela temperatura de hibridização pré-determinada (T_m). Sequências com altos valores de T_m podem favorecer estruturas de grampos, sendo sugerida uma T_m abaixo de 20°C (Reynolds et al., 2004).

3.6.3 Inibição simultânea via RNA de interferência

O silenciamento isolado de apenas um gene, pode não ter resultados expressivos. As células cancerígenas podem ignorar a inibição de um alvo, por exemplo, e uma redução da proteína Bcl-2 pode ser compensada pela indução de Bcl-XL, tornando-se necessário atingir mais de um membro da família Bcl-2, para apresentar eficácia e evitar a resistência ao tratamento (Han et al., 1996).

Estudos demonstraram que apesar do grande potencial de silenciamento do RNAi, quando utilizado em uma abordagem combinatória, dificultam a incorporação de outros RNAi, competindo entre si e com microRNAs endógenos tanto para o transporte, quanto para a incorporação

no *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) (Castanotto et al., 2007). Essas descobertas revelam que a utilização de RNAi em abordagens combinatórias, podem ser problemáticas e ter importantes implicações na metodologia e na utilização terapêutica dos RNAi (Castanotto et al., 2007).

Kunze et al (2012) testaram um RNAi com inibição simultânea dos genes antiapoptóticos *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *XIAP* e *Survivin*. Assim, puderam verificar um aumento de 2,5 vezes na taxa de apoptose e a viabilidade celular ficou reduzida em 40%. Desta forma uma inibição simultânea de genes antiapoptóticos pode ser mais eficaz para a terapia do câncer (Kunze et al., 2012).

A partir destas premissas, o presente trabalho partiu da criação de um RNAi, o qual tivesse homologia com dois tipos diferentes de RNAm e que inibisse, simultaneamente, genes antiapoptóticos importantes da família *Bcl-2*, a saber: o *Bcl-2* e *Bcl-XL*. Tal inibição simultânea mediante RNAi poderia se tornar uma poderosa ferramenta médica *in vivo*, para o tratamento de alguns tipos de câncer, eliminando a resistência às drogas que estes apresentam.

4. Material e métodos

4.1 Cultivo celular

No presente estudo, utilizou-se amostras de linhagem tumoral Jurkat, clone E6-1 (ATCC/TIB-152) e Granta-519 (DSMZ/ACC-342).

Cultivou-se a linhagem celular Jurkat em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Rockville, MD, USA), 1% de penicilina 100 U/mL e estreptomicina 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).

Por sua vez, a linhagem Granta-519, foi cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) contendo 4.5 g/L de glicose, 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Ainda, suplementou-se o meio em conformidade com o meio RPMI.

Ambas linhagens em cultivo foram mantidas em incubadora de CO₂ 5% à 37°C, sob condições estéreis.

4.2 RNA de Interferência (RNAi)

Quatro sequências distintas de RNAi (Tabela 1) foram utilizadas com o intuito de bloquear ou inibir produtos dos genes *Bcl-2* e *Bcl-XL*, sendo assim descritas:

(1) **Bcl-2**, sequência específica para bloquear o produto do *gene Bcl-2*, cujos alvos são os nucleotídeos situados entre as posições 1017 e 1037 (Gene Bank: gi: 72198345) (Okamoto et al., 2007);

(2) **Bcl-XL**, sequência específica inibitória do produto do *gene Bcl-XL*, que apresenta como alvos os nucleotídeos 837 a 855 (Gene Bank: gi:20336334) (Zhu et al., 2005);

(3) Bcl-2/Bcl-XL, sequência inibitória para ambos genes, *Bcl-2* e *Bcl-XL*, tendo por alvos os nucleotídeos 1055 a 1077 e 907 a 929 dos genes *Bcl-2* e *Bcl-XL*, respectivamente. O RNAi Bcl-2/Bcl-XL_{XL} apresenta diferenças nas sequências em dois nucleotídeos e conduzem à inibição do *Bcl-2*, segundo a degradação do RNAm e do *Bcl-XL*, por meio do bloqueio traducional. Tal RNAi foi selecionado mediante alinhamento das sequências dos genes *Bcl-2* e *Bcl-XL* no programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*);

(4) sequência *scramble* (SC), sem homologia com o RNAm dos mamíferos.

Todas as sequências referidas encontram-se listadas na tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos RNAi utilizados para o silenciamento gênico.

Nome	Sequência 5'-3'
Bcl-2 senso	UGU GGA UGA CUG AGU ACC UGA
Bcl-2 antisenso	GGA CAC CUA CUG ACU CAU GGA CU
Bcl-XL senso	GGA GAU GCA GGU AUU GGU GTT
Bcl-XL antisenso	AAC ACC AAU ACC UGC AUC UCC
Bcl-2/Bcl-XL senso	UGG AUC CAG GAU AAC GGA GGC TdTdT
Bcl-2/Bcl-XL antisenso	dAdAA CCU AGG UCC UAU UGC CUC CGA
Scramble senso	UCg ACA gCU AAC AAg AAg AdTdT
Scramble antisenso	dTdTAd gCU gUC gAU UgU UCU UCU

4.3 Teste de citotoxicidade do RNAi

A citotoxicidade dos RNAi assim como análise da viabilidade celular foi avaliada de acordo a redução do corante MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-

2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), testando-se o RNAi Scramble cuja concentração variou de 0,01 nM a 100 nM.

De acordo com Carmichael (1987), modificado, as células foram semeadas em placas de 96 poços (Corning, Union City, California, USA) com 1×10^4 células por poço, em triplicata, e incubadas em diferentes concentrações de RNAi (0,01 nM - 100 nM). Após 72 horas, adicionou-se o corante MTT, na concentração de 5mg/mL, nas células, as quais foram mantidas num período de 4 horas em incubadora de CO₂ 5% à 37°C, sob condições estéreis, a fim de obter cristais que resultaram da completa metabolização do corante. Os cristais formados foram diluídos em álcool isopropílico (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A absorbância foi mensurada em 570nm, por espectrofotometria, no leitor de placas BioTek ELx 800 (Biotek, Winooski, USA).

4.4 Padronização da internalização celular dos RNAi

Testou-se distintos volumes do reagente de transfecção HiPerFect (Qiagen, Valencia, CA, USA) (3μL, 4μL e 4,5μL), responsável por internalizar o RNAi conjugado com Cy5, a fim de determinar a concentração ideal a ser utilizada. Para a formação dos complexos de transfecção, os RNAi foram incubados 10 minutos à 15°-25°C. A análise dos dados foi obtida por meio de microscópio de fluorescência Olympus BX51 System Microscope (Olympus America Inc., Center Valley, Pennsylvania, USA).

As células Jurkat e Granta-519 foram semeadas em 100 μ L de meio RPMI-1640 nas placas de 24 poços (Corning, Union City, California, USA), a fim de obter 2×10^5 células/poço. Separadamente, adicionou-se meio RPMI-1640, sem soro (100 μ L), ao RNAi (10nM) internalizado sob diferentes concentrações do reagente de transfecção. Como parâmetro controle, utilizou-se células, sem quaisquer tratamentos, e RNAi isolados.

Após a obtenção dos complexos (RNAi + Reagente de transfecção), as células foram incubadas com meio RPMI-1640, isento de SFB e antibióticos, por 6 horas. Em seguida, adicionou-se às células 400 μ L de meio RPMI-1640, na presença de SFB e antibióticos, por 24 horas.

Após período de incubação, as células transfectadas foram fixadas em lâminas de vidro e visualizadas por microscopia e analisadas com utilização do software *Image J* (NIH).

4.5 Verificação do IC50 do etoposide

Aproximadamente 5×10^3 células Jurkat e Granta-519, com diferentes concentrações de etoposide foram mantidas em incubadora de CO₂ 5% à 37°C, sob condições estéreis, por 24 horas.

Em seguida, determinou-se a viabilidade celular por meio do ensaio de citotoxicidade (MTT), utilizando células não tratadas com o etoposide, como controle. O índice de citotoxicidade de 50% da população celular (IC50) foi calculado a partir dos dados obtidos da redução do MTT.

4.6 Padronização do ciclo celular com indução da apoptose pelo etoposide

Por microscopia óptica, em aumento de 40X (Microscópio modelo Zeiss Axiovert 40 - Carl Zeiss do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), as células foram visualizadas após 2, 4 e 24 horas a incubação com etoposide. Células sem a droga foram utilizadas como controle.

Para a análise do ciclo celular, as células foram inicialmente centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos, lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e fixadas com 1 mL de etanol 75% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, por 30 minutos, essas mesmas células foram acondicionadas em temperatura -20°C. Após período de fixação, para permeabilização da membrana, as células foram tratadas com solução contendo Tween 20 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha), iodeto de propídio (PI) 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) para marcação do DNA e RNase (Qiagen).

Outra incubação, por 30 minutos em geladeira, ao abrigo da luz, foi realizada previamente a aquisição, em citômetro de fluxo FacScalibur™ (Becton/Dickinson, San Jose, CA. USA), da porcentagem de células em suas respectivas fases do ciclo celular. O número de aquisições foi inferior a 200 células por segundo. Os dados foram analisados no CELLQuest™ (Becton/Dickinson, San Jose, CA, USA).

4.7 Análise de ciclo celular após silenciamento gênico

Os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/ Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL e Scramble foram diluídos na concentração de 10 nM, após adição de 4,5 µL do reagente de

transfecção, e incubados por 10 minutos, entre 15° e 25°C, para a formação dos complexos de transfecção.

Em seguida, as células no inóculo de 2×10^5 por 100 μL de meio RPMI-1640, foram incubadas aos complexos de transfecção, por 6 horas, para a internalização dos mesmos. Após esse período, adicionou-se 400 μL de meio em presença de SFB e antibióticos, sendo incubadas por mais 24 horas. As células foram divididas em dois grupos: 1) células Jurkat e Granta-519 tratadas com etoposide 552,3 nM e 224,37 nM, por 4 horas, respectivamente e 2) Células Jurkat e Granta-519 sem tratamento com a droga.

Por citometria de fluxo (FacScalibur™ - Becton/Dickinson, San Jose, CA. USA), as células previamente marcadas com iodeto de propídeo (PI) foram analisadas conforme as fases do ciclo celular G0/G1, S, G2/M, e apoptose.

4.8 Quantificação dos processos apoptóticos

A análise dos processos apoptóticos foi realizada utilizando-se o marcador Anexina V (AN) (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) concomitante ao emprego de iodeto de propídeo (PI). A quantificação foi obtida por citometria de fluxo.

As células Jurkat e Granta-519, viáveis, foram transfectadas, de acordo com os procedimentos previamente descritos, com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/ Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL e Scramble, por 24 horas. Em seguida as células foram divididas em dois grupos: 1) células Jurkat e Granta-519

incubadas com etoposide 552,3 nM e 224,37 nM, por 4 horas, respectivamente; 2) Células Jurkat e Granta-519 isentas de tratamento.

1×10^5 células, após incubação, foram centrifugadas a 1200 rpm por 2 minutos e ressuspendidas em 100 μ L de tampão de ligação (10mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM de CaCl_2). Em seguida, transferiu-se a suspensão para um tubo de citometria de 5 mL e adicionando-se 5 μ L de Annexin V-FITC, marcador específico para apoptose, e 5 μ L de PI, marcador de permeabilidade de membrana. Imediatamente, a suspensão celular foi homogeneizada em agitador e incubada por 20 minutos à 4 °C. Por fim, 400 μ L de tampão de ligação foram despejados em cada tubo, a fim de analisar e detectar a morte celular (Figura 6).

Figura 6: Esquema para visualização, quantificação dos processos apoptóticos por meio da marcação com Anexina V FITC (AN)/ Iodeto de Propídeo (PI) em citometria de fluxo

4.9 Análise das proteínas Bcl-2

4.9.1 Imunofenotipagem para avaliação da proteína Bcl-2

Para a padronização da avaliação da proteína Bcl-2 por citometria de fluxo, utilizou-se o anticorpo PE Mouse Anti-Human Bcl-2 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), ficoeritina (phycoeritin, PE), em distintos volumes (1µl, 5µl, 10µl, 15µl e 20µl) a fim de selecionar o melhor protocolo de uso.

O controle de marcação inespecífica foi utilizado para a adequada calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra. O processo de marcação das células, com o anticorpo, foi feito com 1×10^6 células/mL em meio RPMI-1640, após centrifugação e lavagem duas vezes com tampão FACS (PBS pH 7.4 contendo 2% albumina bovina e 0.02% NaN_3). Em seguida, as células foram ressuspensas em 250 µL de tampão de fixação (1% paraformaldeído em tampão FACS) e incubadas por 10 minutos. Adicionou-se 30 µL de Tween 20 0,5% e incubou-se por 8 minutos. As células foram lavadas três vezes em tampão FACS e ressuspendeu-se em FACS e mantidas neste por 30 minutos a fim de prevenir ligações inespecíficas.

Mais uma vez, as amostras foram centrifugadas e homogeneizadas com 100 µL de FACS, seguida da incubação com 20 µL de anticorpo (PE Mouse Anti-Human Bcl-2), à 4° C por 40 minutos, em campo escuro e temperatura ambiente. Como controle, utilizou-se um tubo controle sem adição do anticorpo. Em seguida, lavou-se três vezes com tampão FACS e 500 µL de tampão FACS foi adicionado para, finalmente, serem analisadas por citometria.

As células marcadas foram obtidas e a intensidade de fluorescência captada pelo citômetro de fluxo no aparelho FacScalibur™ (Becton/Dickinson, San Jose, CA. EUA), sendo analisadas no CELLQuest™ (Becton/Dickinson, San Jose, CA EUA). Para cada amostra foi realizada uma aquisição de 10.000 eventos. Os resultados foram fornecidos e analisados na forma de histogramas e em percentual da população celular com reação positiva para o anticorpo.

Após a padronização do volume ideal do anticorpo a ser utilizado, as células Jurkat e Granta-519 foram avaliadas com relação à presença da proteína Bcl-2, após tratamento com RNAi: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL e Scramble (SC). As células foram analisadas em dois grupos: 1) células tratadas com etoposide, 2) células isentas de tratamento. Como amostras controle foram utilizadas células marcadas com controle Isotópico (ISO).

4.10 Análise da expressão dos genes *Bcl-2* e *Bcl-XL_{XL}*

4.10.1 Extração de RNA total

No processo de extração do RNA total, adicionou-se 1 mL de Trizol® (Life technology, Grand Island, NY, USA) para cada 1×10^6 células, homogeneizando-as. Após essa etapa, adicionou-se 200 µL de clorofórmio que, prontamente foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos seguida de centrifugação 10.000 g, 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa da mistura foi transferida para um novo tubo estéril, previamente tratado com água DEPC (dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich, St

Louis, USA). A precipitação do RNA foi obtida após a adição de 500 µL de álcool isopropílico (Merck, Darmstadt, Alemanha) gelado. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos seguida da centrifugação por 12.000 g, 15 minutos a 4°C. Desprezado o sobrenadante, acrescentou-se ao RNA precipitado e 1 mL de etanol 75%, o qual foi novamente homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições.

O RNA total extraído foi diluído em 50 µL de água DEPC. As amostras foram analisadas de acordo com a sua integridade, por meio de gel de agarose 2% contendo agarose em tampão TBE 0,5x, corado com brometo de etídeo (0,1 µg/mL) e visualizado em um sistema de documentação de géis VDS Image Master (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia).

A concentração do RNA foi estimada a partir da leitura da densidade óptica por espectrofotometria (Spectrophotometer ND-1000 - Thermo Scientific, Wilmington, USA). O grau de pureza foi avaliado pela relação $A_{260/280}$ e o armazenamento em freezer -80°C até o momento do uso. Ao final, o material foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase 1U/ µl (Promega, Madison, WI, USA) para eliminação de DNA genômico.

4.10.2 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)

A reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) foi a técnica utilizada para análise da expressão dos genes de interesse *Bcl-2* e *Bcl-XL_{XL}*.

As etapas da RT-PCR foram realizadas no equipamento ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA) com a utilização do sistema de amplificação SuperScript III Platinum SYBER Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen™, Life Technologies, Van Allen Way, Carlsbad, CA, USA) para amplificação do gene Bcl-2 e Bcl-XL . As reações de RT-PCR foram feitas em triplicata, com um volume final de 12,5 µL.

A taxa de fluorescência emitida foi detectada continuamente, para cada amostra, entre 520 e 670 nm, sendo a intensidade de fluorescência diretamente proporcional à quantidade de cDNA da amostra. Os dados são traduzidos por um *software* específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade versus o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos necessários para detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significativa. Esse ponto é definido como limiar ou C_t e ocorre durante a fase exponencial de amplificação. Assim, cada amostra apresenta um valor de C_t específico (Livak & Schmittgen, 2001).

A expressão de cada mRNA foi normalizada em relação à expressão do gene da GAPDH para Bcl-2 e GUSB para Bcl-XL e a variação no valor de C_T não ultrapassaram 0,5. Foram empregados em todos os ensaios a amostra-referência como controle não tratado, e um controle negativo de amplificação, sem adição de amostra.

A condição usual de programação dos ciclos foi 50° C - 5 minutos, para síntese de cDNA; 95° C - 5 minutos; 40 ciclos: 95° C - 15 segundos; 60° C - 30 segundos. Foi realizada curva de dissociação no intervalo de variação de temperatura 50° a 99° C, sendo 1° C por etapa a cada 30 segundos.

Tabela 2 . Sequência de *primers* utilizados.

Nome	Sequência 5'-3'
Bcl-2-S	5'- CGG TGG GGT CAT GTG TGT GGA – 3'
Bcl-2-AS	5'- GGG GCA GGC ATG TTG ACT TCA CT – 3'
Bcl-XL - S	5'- GGT CGC ATT GTG GCC TTT – 3'
Bcl-XL - AS	5'- TCC TTG TCT ACG CTT TCC ACG – 3'
ABL-S	5'- TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG ACT T – 3'
ABL-AS	5'- GAT GTA GTT GCT TGG CAG CCA – 3'

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvo foi realizada pela quantificação relativa (RQ), utilizando-se a equação $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Para cada tratamento, foi detectado o valor de CT tanto para o gene alvo quanto para o normalizador. Esse valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado.

O valor do CT do gene alvo é subtraído do valor do CT do normalizador e resulta no valor de ΔCT ; o valor de ΔCT do gene alvo é, então, subtraído do valor do ΔCT do calibrador (controle não tratado), assim é encontrado o valor de $\Delta\Delta CT$.

Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do normalizador, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (Livak & Schmittgen, 2001).

4. 11 Análise estatística

A análise descritiva dos dados foi realizada utilizando-se software GraphPad Prism V5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Na comparação entre os tratamentos com e sem droga, e entre as diferentes linhagens foi empregada a análise de variância (ANOVA) Two Way.

As diferenças entre os valores das médias foram consideradas significantes quando o valor de $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1 Citotoxicidade do RNAi

Após 72 horas de incubação, as diferentes concentrações estudadas do RNAi Scramble não demonstraram citotoxicidade (figura 7). Sendo assim, foi selecionada como concentração de uso de 10 nM, sendo a mais utilizada na literatura para obter uma inibição eficiente do gene alvo.

Figura 7. Viabilidade celular (%), após 72 horas de incubação com diferentes concentrações do RNAi Scramble (0,01 nM à 100 nM), determinada a partir do método de redução de MTT.

5.2 Análise de internalização celular dos RNAi

A partir da visualização em microscopia de fluorescência foi possível observar que todas as concentrações do reagente de transfecção HiPerFect (3 μ l, 4 μ l e 4,5 μ l) conjugado com fluorógeno, avaliadas após 24 horas de incubação, promoveram a internalização do RNAi nas células (Figura 8). Entretanto, as células incubadas com a concentração de 4,5 μ l

demonstraram maior intensidade de fluorescência, sugerindo maior internalização dos RNAi. Sendo assim, esta foi a concentração utilizada nos demais experimentos.

Figura 8. Células Jurkat incubadas com 10 nM de RNAi, conjugado com Cy5 (A, B, C, D e E) por 24 horas sendo: **A)** com 3,0 µl do HiPerFect; **B)** com 3,5 µl do HiPerFect. **C/D)** com 4,5 µl do HiPerFect; **E)** RNAi conjugado com Cy5 **F)** Células controle incubadas com 4,5 µl do HiPerFect sem RNAi, por 24 horas. Visualização em microscópio de fluorescência 40X.

5.3 Citotoxicidade do etoposide

A linhagem de células Jurkat manteve maior viabilidade (43,40%) quando comparada com a Granta-519 (24,76%) após a incubação de 24 horas com a concentração mais alta de etoposide utilizada no experimento.

A partir das curvas de viabilidade foi determinado o IC₅₀ de cada linhagem avaliada, e foi possível observar que as células Jurkat (553,3 nM) necessitaram de uma concentração duas vezes maior de etoposide do que a linhagem Granta-519 (224,37 nM), para inibir 50% da população celular. Sendo assim, estas foram as concentrações utilizadas nos experimentos posteriores.

Figura 9: Curvas de viabilidade celular (%) das células Granta-519 (vermelho) e Jurkat (preto) tratadas por 24 horas com diferentes concentrações (0,01 – 10000 nM, 6 réplicas cada) de etoposide; teste aplicado Two -Way ANOVA, pós-teste Bonferroni

Figura 10- Concentração de etoposide (nM) necessária para inviabilizar 50% da população celular das linhagens Granta-519 e Jurkat, submetidas a diferentes concentrações (0.01 – 10000 nM, 6 réplicas cada) de etoposide por 24 horas.

5.4 Citotoxicidade do etoposide nas linhagens tratadas com RNAi

Para avaliar a susceptibilidade, das linhagens avaliadas tratadas com os diferentes RNAi, ao etoposide foram realizados ensaios de viabilidade celular, onde foi possível observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Figura 11: Curvas de viabilidade celular (%) das células Granta-519 e Jurkat transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) e incubadas por 24 horas com diferentes concentrações (0.01 – 10000 nM, 6 réplicas cada) de etoposide; teste aplicado Two -Way ANOVA, pós-teste Bonferroni.

5.5 Padronização da quantificação das fases do ciclo celular

Em um primeiro momento foi observada a morte celular, por microscopia óptica (40X), frente à exposição ao etoposide (552,3 nM) após 2, 4 e 24 horas. A partir da seguinte visualização (Figura 12), foi possível estimar que após 24 horas a mortalidade da população celular foi maior quando comparada aos outros tempos de incubação. A partir das porcentagens de células encontradas em cada fase do ciclo celular (Figura 13) (G0/G1, S e G2/M e as células em apoptose) infere-se que o tempo de incubação de 24 horas levou aos níveis elevados de processos apoptóticos irreversíveis. Sendo assim, foi selecionado para os experimentos o tempo intermediário de incubação de (4 horas).

Figura 12. Células Jurkat após incubação com etoposide (2h, 4h e 24h) para determinação do melhor tempo de incubação. O aumento é de 40X.

Figura 13. Células Granta-519 após incubação com etoposide (2h, 4h e 24h) para determinação do melhor tempo de incubação. O aumento é de 40X.

Figura 14: Quantificação (Eventos %) das fases do ciclo celular por citometria de fluxo **A)** Histogramas adquiridos após marcação do DNA com Iodeto de Propídeo(PI) **B)** Porcentagens correspondentes à Apoptose, G0/G1, S e G2/M nas incubações com etoposide (ETP) (552,3nM) por 2, 4 e 24 horas

5.6 Análise de ciclo celular após o silenciamento gênico

Com intuito de verificar a eficiência do silenciamento gênico, foi feita a análise do ciclo celular das células tratadas com RNAi (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Scramble) e foi observado que a linhagem Granta-519 apresentou maior apoptose e menor índice de G0/G1 nas células tratadas com o Bcl-XL, e maior apoptose nas células incubadas com Bcl-2+Bcl-XL quando comparadas com as células controle sem tratamento (Figura 15). Resultados semelhantes foram encontrados na mesma linhagem incubada com RNAi e o quimioterápico etoposide, onde houve maior apoptose e menor G0/G1 com Bcl-XL, e menor apoptose com Bcl-2/Bcl-XL quando comparados às células controle tratadas somente com etoposide (Figura 16).

A análise do ciclo celular das células Jurkat tratadas com os diferentes RNAi não demonstraram diferença estatística. Entretanto esta mesma linhagem tratada com RNAi e etoposide teve maior apoptose com Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL e Bcl-2+Bcl-XL, maior G2M com Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL e menor G0/G1 em todos os grupos quando comparados às células controle tratadas somente com etoposide (Figura 17).

Quando comparados os índices apoptóticos com e sem incubação com quimioterápico etoposide, foi demonstrado que as células tanto Granta-519 quanto Jurkat, tratadas com os diferentes RNAi, apresentaram maior apoptose após o tratamento com etoposide (Figura 18). Na relação entre

ambas linhagens foi observado que a linhagem Granta-519 apresentou maiores índices de apoptose do que a Jurkat em todos os tratamentos com RNAi, com e sem etoposide (Figura 19).

Figura 15. Quantificação (Eventos %) das células Granta-519 nas fases do ciclo celular (Apoptose, G0/G1, S e G2M) transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) sem (A) e com incubação de 4 horas com etoposide (224,37nM) (B) por marcação com Iodeto de Propídeo (PI); teste Two Way ANOVA, pós teste Bonferroni comparando todos vs. controle, * $p < 0,05$

Figura 16. Quantificação (Eventos %) das células Jurkat nas fases do ciclo celular (Apoptose, G0/G1, S e G2M) transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) sem incubação **(A)** e com incubação de 4 horas com etoposide (552,3nM) **(B)** por marcação com Iodeto de Propídeo (PI); teste Two Way ANOVA, pós teste Bonferroni comparando todos vs. controle, * $p < 0,05$

Figura 17. Quantificação da apoptose (Eventos %) das células Granta-519 **(A)** e Jurkat **(B)** após transfecção com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) na presença e ausência de etoposide por 4 horas nas concentrações 552,3nM Jurkat e 224,37nM Granta-519, por marcação com Iodeto de Propídeo (PI); teste Two Way ANOVA, pós teste Bonferroni comparando todos os grupos, * $p < 0,05$

Figura 18. Quantificação (Eventos %) das células Granta-519 vs. Jurkat sem etoposide **(A)** e Granta-519s+ETP vs. Jurkat+ETP com incubação de 4 horas com etoposide **(B)** (224,37nM ou 552,3nM) na apoptose das células transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL_{XL}, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) por marcação com Iodeto de Propídeo (PI); teste Two Way ANOVA, pós teste Bonferroni comparando todos os grupos, * $p < 0,05$

5.7 Inibição da expressão do Bcl-2

Na análise da inibição da expressão proteica do Bcl-2 por citometria de fluxo, foi observado que a população negativa das células Granta-519 tratadas com RNAi para Bcl-2 e Bcl-2+Bcl-XL foram maiores do que as células tratadas com os mesmos somados à incubação com etoposide (Figura 19).

As células Granta-519 tratadas com RNAi para Bcl-2 apresentou 5 vezes mais negatividade quando comparadas com as células controle (sem tratamento) (Figura 20). Enquanto as células Jurkat não apresentaram diferença estatística entre os diferentes tratamentos.

Figura 19. Quantificação (Eventos %) da população negativa das células Granta-519 (A) e Jurkat (B) com (azul) ou em (cinza) após incubação de 4 horas com etoposide (224,37nM ou 552,3nM) na fase do ciclo celular de apoptose transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) por marcação com Iodeto de Propídeo (PI); teste Two Way ANOVA, pós teste Bonferroni comparando todos os grupos e controle vs.grupos, * $p<0,05$

5.8 Quantificação da morte celular

Quando comparados os índices de apoptose de ambas linhagens, foi possível observar que a Jurkat demonstrou maior apoptose do que a Granta-519 em todos os grupos, com exceção do SC. Em contrapartida, as linhagens submetidas aos diferentes tratamentos com RNAi e incubadas com etoposide não demonstraram diferença estatística (Figura 20).

Na análise da quantificação da necrose as células da linhagem Granta-519 tratadas com RNAi para Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL e SC demonstraram maior porcentagem de células em necrose do que o controle (sem tratamento). Já entre as linhagens, Granta-519 apresentou maior necrose nos tratamentos com RNAi para Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL e SC em comparação à Jurkat (Figura 21).

Das linhagens incubadas com etoposide foi observada diferença estatística apenas nas células Granta-519 transfectadas com RNAi Bcl-XL quando comparadas ao controle e às células da linhagem Jurkat com o mesmo tratamento (Figura 22).

Apoptose

Figura 20. Quantificação (Eventos %) da população das células em apoptose Granta-519 (cinza) **(A)** e Jurkat (azul) **(B)** transfetadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) por marcação com Anexina V (FITC) e Iodeto de Propídeo (PI); teste Two Way ANOVA, pós teste Bonferroni comparando todos os grupos e controle vs.grupos, * $p < 0,05$

Figura 21. Quantificação (Eventos %) da população das células, em necrose, Granta-519 (cinza) (A) e Jurkat (azul) (B) transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi) por marcação com Anexina V (FITC) e Iodeto de Propídeo (PI); teste Two Way ANOVA, pós teste Bonferroni comparando todos os grupos e controle vs.grupos, $*p<0,05$

5.9 Expressão gênica do Bcl-2 e Bcl-XL

Primeiramente foram realizados testes para a padronização e avaliar a eficiência das reações para o PCR em tempo real, dados que seguem em anexo (Anexo 2). Em seguida, ambas linhagens foram avaliadas por PCR em tempo real quanto à expressão dos genes avaliados no presente estudo, e foi então comprovado que tanto Granta-519 quanto Jurkat expressam os genes Bcl-2, Bcl-XL e GAPDH (gene endógeno) (Figura 22).

Na análise da expressão dos genes Bcl-2 e Bcl-XL nas células das linhagens Granta-519 e Jurkat transfectadas com os diferentes RNAi, não foi encontrada diferença estatística quando comparadas ao controle (sem tratamento) e entre os tratamentos (Figura 23). Embora seja possível observar sugestiva diminuição da expressão de Bcl-2.

Figura 22. Quantificação (Ct) da amplificação do PCR em tempo real dos genes Bcl-2, Bcl-XL e GAPDH nas linhagens Granta-519

Figura 23. Quantificação relativa da expressão gênica (RQ) dos genes Bcl-2 (A) e Bcl-XL (B) das linhagens de células Granta-519 e Jurkat, transfectadas com os RNAi Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL, SC (Scramble) e CT (sem RNAi); teste Two Way ANOVA, pós teste Bonferroni comparando todos os grupos e controle vs.grupos, $*p<0,05$

6. Discussão

A desregulação da apoptose é um fator chave na tumorigênese (Hanahan & Weinberg, 2011) e os membros da família Bcl-2 são de particular importância para a sinalização apoptótica (Tan et al., 2009). Bcl-2 e Bcl-XL são os membros antiapoptóticos mais importantes dessa família, e são frequentemente desregulados em tumores humanos, tais como nas leucemias e linfomas. Por consequência, estes genes são grandes candidatos de interesse para uma molécula alvo dirigida utilizada em terapia antitumoral (Doren et al., 2012).

Recentemente destaca-se o descobrimento da utilização de moléculas de RNA dupla fita, que atuam como silenciadores gênicos (Fire et al., 1998; Takeshita & Ochiya, 2006), revolucionando pelo seu grande potencial terapêutico para o tratamento de doenças causadas pela desregulação gênica, se tornando uma poderosa arma para o combate ao câncer (Ozpolat et al., 2010; Khurana et al., 2010).

Tiemann et al., (2011) projetaram quatro pequenos RNAi específicos para CCND1, um específico para CCND2, e um RNAi que, simultaneamente, inibe CCND1 e CCND2. Etoposide e doxorrubicina foram utilizados como agentes quimioterápicos em combinação com os RNAi que foram transfectados na linhagem celular Granta-519 . Foi possível notar que a combinação do RNAi para inibição das ciclinas, juntamente com agentes quimioterápicos, conseguiram potencialmente reduzir as doses eficazes dos agentes quimioterápicos e reduzir toxicidades relacionadas com a droga (Tiemann et al., 2011). Para avaliar a susceptibilidade das linhagens celulares avaliadas neste estudo, tratadas com os diferentes RNAi, ao

etoposide ,foram realizados ensaios de viabilidade celular. Em contrapartida, foi possível observar que em nenhuma das linhagens celulares estudadas houve diferença significativa entre os tratamentos.

Sugere-se que os RNAi utilizados no presente estudo não causaram aumento da citotoxicidade celular devido ao fato de algumas células cancerígenas possuírem um mecanismo de escape ao ignorar a inibição de um alvo, por exemplo, uma redução da proteína Bcl-2 pode ser compensada pela indução de Bcl-XL protegendo a célula da citotoxicidade (Han et al., 1996).

Encontramos também, que a linhagem celular Jurkat manteve maior viabilidade (43,40%) quando comparada com a Granta-519 (24,76%) após a incubação de 24 horas com a concentração mais alta de etoposide utilizada no experimento. Sugerindo que a linhagem celular Jurkat apresentou maior resistência ao etoposide em relação a Granta-519, necessitando de uma concentração duas vezes maior para inibir 50% da população celular.

Foi possível avaliar a eficiência do silenciamento gênico, em ambas as linhagens celulares, Granta-519 e Jurkat através do experimento de análise do ciclo celular. Na linhagem Granta-519 ocorreu uma diferença significativa no aumento da apoptose e menor índice de G0/G1 nas células tratadas com o RNAi Bcl-XL e RNAi Bcl-2+Bcl-XL com e sem incubação com etoposide, quando comparadas com as células controle, sugerindo que o RNAi Bcl-XL, em ambos os tratamentos, causou a inibição do gene *Bcl-XL*. Esses dados assemelham-se aos obtidos por Zhu et al., (2005) os quais

utilizaram a mesma sequência de RNAi para inibir o gene *Bcl-XL* em células do cancro (Zhu et al., 2005).

Na linhagem celular Jurkat foi encontrado diferença significativa no aumento da apoptose em todos os tratamentos com RNAi (*Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-2/Bcl-XL*, *Bcl-2+Bcl-XL*) e etoposide, menos no Scramble, sendo o esperado, dado que o Scramble é um RNAi sem homologia com mRNA de mamíferos, apresentou também maior G2M com *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-2/Bcl-XL* e menor G0/G1 em todos os grupos quando comparados às células controle tratadas somente com etoposide. Esses dados sugerem a eficácia da inibição de todos os RNAi utilizados no trabalho com as células Jurkat, dado que os RNAi utilizados tem como intuito inibir os genes antiapoptóticos *Bcl-2* e *Bcl-XL* que são conhecidos por promover a sobrevivência da célula. Com a inibição da expressão destes genes ocorre a liberação de substâncias tais como o citocromo c, a procaspase 3 e o fator de indução de apoptose consequentemente causando maior apoptose nas células tratadas com os respectivos RNAi (Kroemer, 1997).

Dados semelhantes foram encontrados por Okamoto et al., (2007), que testaram a mesma sequência de RNAi *Bcl-2* utilizada neste trabalho para células de câncer pancreático (Okamoto et al., 2007). Com esses resultados podemos presumir também, que os RNAi estudados possuem capacidade de inibição em diferentes tipos celulares.

Foi demonstrado que as células tanto Granta-519 quanto Jurkat, tratadas com os diferentes RNAi, apresentaram maior apoptose após o tratamento com etoposide. Sendo o esperado, dado que o mecanismo de

ação do etoposide é causar a inibição de topoisomerase II, que são enzimas nucleares críticas para o funcionamento normal de qualquer célula. São elas que juntamente com topoisomerase I mantêm a integridade do DNA, reparando-o quando danificado. Qualquer alteração no balanço entre estas enzimas é suficiente para induzir a apoptose (Whitacre et al., 1997).

Na relação entre ambas linhagens foi observado que a linhagem Granta-519 apresentou maiores índices de apoptose do que a Jurkat em todos os tratamentos com RNAi, com e sem etoposide.

Os resultados obtidos na análise da inibição da expressão proteica do Bcl-2, mostraram que a população negativa das células Granta-519 tratadas com RNAi para Bcl-2 e Bcl-XL2+Bcl-XL foram maiores do que as células tratadas com os mesmos somados à incubação com etoposide. Esses dados sugerem que as células que apresentavam expressão de Bcl-2 tiveram um aumento da sobrevivência, as quais foram protegidas pela proteína Bcl-2 da toxicidade do etoposide, com consequente inibição da apoptose (Dole et al., 1994; Filipits, 2000; Donovan & Cother, 2004; Kang et al., 2009).

Foi detectado ainda que as mesmas células tratadas com RNAi para Bcl-2 sem etoposide apresentaram 5 vezes mais negatividade quando comparadas com as células controle, sugerindo que o RNAi Bcl-2 causou a inibição do gene, se ligando no RNAm alvo e resultando na degradação do mesmo. Essa degradação leva a consequente queda na quantidade de proteína celular (Pai et al., 2006; Rana, 2007; Rivas et al., 2005). Em contrapartida as células Jurkat não apresentaram diferença estatística entre os diferentes tratamentos.

Foi possível demonstrar no experimento de Anexina V/PI que a linhagem Jurkat apresentou maior apoptose do que a Granta-519 em todos os grupos. Outro significativo dado encontrado foi na linhagem Granta-519, que demonstrou maior porcentagem de células em necrose quando comparada com o controle (sem tratamento) e as Jurkat. Tsujimoto et al., (1997) descobriram que a expressão de Bcl-2, Bcl-XL previne a morte celular induzida pela retirada de oxigênio (hipóxia). Utilizando microscopia eletrônica e confocal mostraram que a hipóxia induz a morte tanto por necrose quanto por apoptose. A morte celular por necrose, é também inibida por inibidores das proteases, mediadores comuns da apoptose (Tsujimoto et al., 1997).

Os resultados encontrados neste experimento e por Tsujimoto et al., (1997) sugere que Bcl-2 e Bcl-XL modulam tanto a apoptose e, pelo menos, algumas formas de morte celular por necrose, sugerindo que ambas as vias de morte celular envolve alguns mediadores comuns (Tsujimoto et al., 1997).

O efeito sobre a expressão gênica Bcl-2 e Bcl-XL foi estudado mediante PCR em tempo real; primeiramente foram realizados testes para a padronização a fim de avaliar a eficiência das reações para o PCR em tempo real. Em seguida, ambas linhagens foram analisadas quanto à expressão dos genes avaliados no presente estudo, sendo então comprovado que, tanto Granta-519 quanto Jurkat expressam os genes Bcl-2, Bcl-XL e GAPDH (gene endógeno). Embora não tenham diferido estatisticamente devido à variação entre as réplicas dos experimentos, é possível observar sugestiva diminuição da expressão do gene *BCL-2* nos

tratamentos com RNAi (*Bcl-2*, *Bcl-2/Bcl-XL*, *Bcl-2+Bcl-XL*). Sugerindo a eficácia da inibição do gene *Bcl-2*.

Em ambas as linhagens celulares ocorreu aumento significativo de apoptose nos tratamentos com RNAi conjugado (*Bcl-2* + *Bcl-XL*) quando comparados com o controle, e semelhante quando comparado com a inibição individual. Alguns autores mostraram que, a inibição de apenas um gene ligado a apoptose, pode não ter eficiência terapêutica significativa, sendo necessário a inibição de dois ou mais genes (Kunze et al., 2012). De fato, os resultados seriam mais efetivos, porém estudos mostraram que apesar do grande potencial de silenciamento gênico que os RNAi possuem, quando usados de forma combinatória, competem entre si e com microRNAs endógenos na incorporação com o RISC o que diminui muito seu potencial de inibição (Castanotto et al., 2007).

Uma forma de melhorar seu potencial de ação seria utilizar esses RNAi para uma inibição simultânea de dois ou mais genes de importância terapêutica. Kunze et al (2012) demonstraram uma inibição simultânea dos genes antiapoptóticos *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *XIAP* e *Survivin*, através de um RNAi verificando um aumento na taxa de apoptose e redução na viabilidade celular. Provando maior eficácia dos RNAi quando usados para múltiplos alvos com inibição simultânea (Kunze et al., 2012). Em contrapartida no presente estudo o RNAi projetado para inibição simultânea (*Bcl-2/Bcl-XL*), foi eficiente na inibição aumentando a apoptose porém, não diferiu estatisticamente quando comparado com o RNAi usado de forma combinatória (*Bcl-2+Bcl-XL*) ou com os outros RNAi (*Bcl-2* e *Bcl-XL*)

utilizados no presente estudo. Um dos fatores críticos para o sucesso no uso de RNAi é a capacidade do RNAi silenciar especificamente o RNAm alvo. Diversos projetos têm sido desenvolvidos visando selecionar RNAi com as características de especificidade e estabilidade desejadas, existe também métodos *in vitro* para identificar rapidamente os candidatos capazes de silenciar um dado gene de interesse. Mesmo que seja seguido passo a passo de um protocolo para identificação de um RNAi eficiente, ainda assim, os RNAi devem ser avaliados experimentalmente para determinar a eficácia do silenciamento e verificar ausência de efeitos indesejados, denominados efeitos fora do alvo (Fougerolles et al., 2007).

Os resultados obtidos nestes trabalho demonstraram que ocorreu aumento significativo de apoptose nas células Jurkat transfectadas com os RNAis (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2/Bcl-XL, Bcl-2+Bcl-XL) e marcadas com iodeto de propídeo quando comparadas com o controle. Já na comparação com a linhagem celular Granta-519 apresentou menor índice apoptótico isso se deve ao fato de que o marcador nuclear fluorescente Iodeto de Propídio (PI) é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como o PI, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose. E quando utilizado individualmente não distingue apoptose de necrose, sugerindo que esta apoptose poderia ser

necrose. Esses dados foram comprovados na marcação com ANEXINA V/PI, onde a Granta-519 apresentou maior nível de necrose quando comparada com controle e com a Jurkat. Esta técnica é destinada a detecção de apoptose em vários tipos celulares, pela dosagem de fosfatidilserina (PS) (Vermes et al., 1995).

A fosfatidilserina é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica nas células no início da apoptose, onde a membrana celular ainda permanece intacta mas sofre uma desorganização, a fosfatidilserina é translocada para a superfície exterior da bicamada lipídica sendo reconhecida pelos fagócitos, que captam este sinal e removem a célula que sinalizou seu “suicídio” ao ambiente. Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolípidos e possui alta afinidade pela fosfatidilserina na presença íons de cálcio. As mudanças na assimetria da membrana, é analisada através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, e podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana. Ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em citometria de fluxo (Vermes et al., 1995).

Desse modo, corar células simultaneamente com Anexina V-FITC (fluorescência verde) e com o corante PI (fluorescência vermelha) permite a discriminação de células intactas, viáveis (FITC - PI -), no início de apoptose (FITC + PI-) e células tardiamente apoptóticas ou necróticas (FITC + PI +).

Assim sugere-se que a linhagem celular Granta-519 utilizou outro mecanismo de morte celular (Necrose) e que essa sinalização pode ter ocorrido pela inibição da proteína Bcl-2, dado que foi encontrado nos tratamentos com RNAi Bcl-2 e Bcl-XL e observado pela sugestiva diminuição da expressão do gene *BCL-2* no PCR em tempo real.

7. Conclusões

- Os resultados da inibição simultânea dos genes antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-XL por um RNAi específico não apresentaram diferenças significativas quando avaliados.
- A avaliação da expressão do gene BCL-2 e Bcl-XL no PCR em tempo real não configurou diferenças significativas, embora seja possível observar sugestiva diminuição da expressão de BCL-2.
- O RNAi Bcl-2 foi o mais eficiente dos utilizados na inibição da expressão da proteína na linhagem celular Granta-519.
- Ocorreu aumento significativo de apoptose nas células Jurkat tratadas com os RNAi Bcl-2 e Bcl-XL quando comparadas com o controle e com a Granta-519.
- Ocorreu aumento significativo de necrose nas células Granta-519 tratadas com os RNAi Bcl-2 e Bcl-XL quando comparadas com o controle e Jurkat.
- Foi encontrado índice apoptótico significativamente superior nas células tratadas com RNAi Bcl-2 e RNAi Bcl-XL após tratamento com etoposide, quando comparadas ao grupo controle.
- Em ambas as linhagens celulares ocorreu aumento significativo de apoptose nos tratamentos com RNAi conjugado (Bcl-2 + Bcl-XL) quando comparados com o controle, e semelhante quando comparado com a inibição individual dos genes Bcl-2 e Bcl-XL.

8. Anexos

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20/05/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0156/09**, intitulado: **"INIBIÇÃO SIMULTÂNEA DOS GENES ANTIAPOPTÓTICOS BCL-2 E BCL-XL EM CÉLULAS DE LINFOMA MEDIANTE RNA DE INTERFERÊNCIA"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski**

Pesquisador (a) Executante: **Viviane Dias Faustino**

CAPPesq, 21 de Maio de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Avaliação da eficiência das reações para o PCR em tempo real.

Ct				
Diluição	250ng	125ng	62.5ng	32.25ng
BCL-2	17,83 ± 0,11	18,68 ± 0,15	22,95 ± 0,52	25,85 ± 0,39
BCL _{-XL}	21,01 ± 1,37	22,96 ± 1,09	25,72 ± 0,36	34,47 ± 0,62
Eff %	99,12	Slope	-3.343	R2

Anexo 2: padronização para avaliar a eficiência das reações para o PCR em tempo real.

Anexo 3: Verificação da sensibilidade ao Etoposide

O Anexo 3 apresenta as curvas de viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de incubação das células Jurkat com diluições seriadas de etoposide. O índice de citotoxicidade de 50% da população celular (IC50) foi determinado através das curvas de sobrevivência celular em função da concentração de droga mediante regressão não linear para cada tratamento.

Anexo 3: Viabilidade celular das células Jurkat (%) tratadas por 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações de etoposide por meio do ensaio de MTT.

Anexo 3 : Comparação dos IC50 das células Jurkat tratadas com diferentes concentrações de etoposide. As células foram incubadas com etoposide por 24, 48 e 72 horas.

Anexo 3. Valores IC50 das células Jurkat tratadas com etoposide

Tratamento	IC50 (nM)
Jurkat 24 horas	552,3
Jurkat 48 horas	26,4
Jurkat 72 horas	21,8

Anexo 4: Padronização da Imunofenotipagem para avaliação da proteína Bcl-2

A avaliação da proteína Bcl-2 foi determinada pelo método de citometria de fluxo. Foi utilizado o anticorpo PE Mouse Anti-Human Bcl-2 (BD Pharmingen) em diferentes quantidades (1µl, 5µl, 10µl, 15µl, 20µl) para determinar a melhor, e testar o protocolo de uso.

o mostraram a porcentagem total e o índice médio de fluorescência, respectivamente, de células Jurkat que foram marcadas com anticorpo nas diferentes quantidades testadas.

Figura x: Porcentagem total das células Jurkat marcadas com o anticorpo PE Mouse Anti-Human Bcl-2 em diferentes quantidades (1µl, 5µl, 10µl, 15µl, 20µl).

9. Referências

Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(2-3):75-86.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281(5381):1322-6.

Akanjii AG. Estudo de marcação com iodo-131 de anticorpo monoclonal anti-CD20 usado na terapia de linfoma não-Hodgkin [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, 2006.

Amin HM, McDonnell TJ, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, Leventaki V, O'Connor SL, Keating MJ, Lai R. Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(4):424-31.

Amsterdam A, Sasson R. The anti-inflammatory of glucorticoidis is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;189(1-2):1-9.

Anderson WF. Human gene therapy. *Science* 1992;256(5058):808-13.

Ausubel F, Beckwith J, Janssen K. The politics of genetic engineering: who decides who's defective? *Psychol Today*. 1974;8(1):30.

Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *J Exp Med*. 1944;79(2):137-58.

Ayala E, Tomblyn M. Hematopoietic cell transplantation for lymphomas. *Cancer Control*. 2011;18(4):246-57.

Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, Trope CG, Kristensen GB. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patients prognosis in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(22):3775-81.

Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296(4):1000-4.

Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, Lindeman GJ, Harris AW, Adams JM. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J.* 1994;13(9):2124-30.

Boos A, Janssen V, Mülling C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction.* 2003;126(4):469-80.

Bosch F, López-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, Vallespi T, Woessner S, Montserrat E. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer.* 1998;82(3):567-75.

Bain, JB. Diagnóstico em Leucemias. 2 ed. Rio de Janeiro: *Revinter*, 2003.

Béné MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Doekharan D, van der Holt B, Knapp W, Lemez P, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Schoch C, Sperling C, van't Veer MB. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *Br J Haematol.* 2001;113(3):737-45.

Broome HE, Yu AL, Dicciani M, Camitta BM, Monia BP, Dean NM. Inhibition of Bcl-XL-xL expression sensitizes T-cell acute lymphoblastic leukemia cells to chemotherapeutic drugs. *Leuk Res*. 2002;26(3):311-6.

Broome HE, Wang HY. A case concomitant T-cell large granular lymphocytic leukemia and plasma cell myeloma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2011;9(12):958-9.

Buncrot D, Manoharan M, Kotliansky V, Sah D. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nature Chem Biol*. 2006;2:711-9.

Campo E. Genetic and molecular genetic studies in the diagnosis of B-cell lymphomas I: mantle cell lymphoma, follicular lymphoma, and Burkitt's lymphoma. *Hum Pathol*. 2003;34(4):330-5.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res*. 1987;47(4):943-6.

Castanotto D, Sakurai K, Lingeman R, Li H, Shively L, Aagaard L, Soifer H, Gatigno A, Riggs AR, Rossi JJ. Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(15):5154-64.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* 2004;23(16):2825-37.

Chien PY, Wang J, Carbonaro D, Lei S, Miller B, Sheikh S, Ali SM, Ahmad MU, Ahmad I. Novel cationic cardiolipin analogue-based liposome for efficient DNA and small interfering RNA delivery in vitro and in vivo. *Cancer Gen Ther.* 2005; 12(3):321-8.

De Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(6):443-53.

De Leeuw RJ, Davies JJ, Rosenwald A, Bebb G, Gascoyne RD, Dyer MJ, Staudt LM, Martinez-Climent JA, Lam WL. Comprehensive whole genome

array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Hum Mol Genet.* 2004;13(17):1827-37.

Dole M, Nuñez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA, Castle VP, Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res.* 1994;54(12):3253-9.

Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochem Biophys Acta.* 2004;1644(2-3):133-47.

Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(6):663-9.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotides RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001;411(6836):494-8.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em <http://www.inca.gov.br>

Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K, Leake D, Marshall WS, Khvorova A. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*. 2006;12(7):1188-96.

Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(11):876-85.

Filipits M, Jaeger U, Simonitsch I, Chizzali-Bonfadin C, Heinzl H, Pirker R. Clinical relevance of the lung resistance protein in diffuse large B-Cell lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2000;6(9):3417-23.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.

Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6:443-53.

França NR, Júnior DM, Lima AB, Pucci FVC, Andrade LEC, Silva NP. Interferência de RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Rev Bras Reumatol*, 2010;50:695-709.

Gautschi O, Tschopp S, Olie RA, Leech SH, Simoes-Wust AP, Ziegler A, Baumann B, Odermatt B, Hall J, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. Activity of a novel Bcl-2/bcl-xL-bispecific antisense oligonucleotide against tumors of diverse histologic origins. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93,463–71.

Grivicich I, Regner A, da Rocha AB. Morte Celular por apoptose. *Rev Br Cancerol.* 2007;53(3):335-43.

Guo P, Coban O, Snead NM, Trebley J, Hoeprich S, Guo S, Shu Y. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62:650-66.

Han Z, Chatterjee D, Early J, Pantazis P, Hendrickson EA, Wyche JH. Isolation and characterization of an apoptosis-resistant variant of human leukemia HL-60 cells that has switched expression from Bcl-2 to Bcl-XL-xL. *Cancer Res.* 56:1621-1628,1996.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.

Hennesy BT, Hanrahan EO, Daly PA. Non-Hodgkin lymphoma: an update. *Lancet Oncol.* 2004;5(6):341-53.

Hamerschlack N. Manifestações reumáticas associadas à doenças oncohematológicas. *Einsten.* 2008;(1):89-97.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770-6.

Hjalgrim H, Engels EA. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *J Intern Med*. 2008;264(4):537-48.

Höck J, Meister G. The Argonaute protein family. *Genome Biol*. 2008;9(2):210.

Ignéy FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277-88.

Jack S, Barrans S. Recent advances in the understanding of aggressive B-cell lymphomas. *Curr Diagnost Pathol*. 2004;10:360-73.

Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E, Bartkova J, Stranks G, De Schouwer PJ, Lens D, Bartek J, Dyer MJ, Kruger AR, Catovsky D. Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta-519 519). *Leukemia*. 1997;11(1):64-72.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer Statistics. *CA J Clin*. 2005;55:10-30.

Juin P, Geneste O, Raimbaud E, Hickman JA. Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer. *Biochem Biophys Acta*. 2004;1644(2-3):251- 60.

Kang MMH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors : a targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(4):1126-32.

Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods* 2008;44(3):262-72.

Kerr JFR. Definition of apoptosis and overview of its incidence. In: Lavin M, Waters D. Programmed cell death: the cellular and molecular biology of apoptosis. *Chur Harwood*. 1993;1-18.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.

Khosravi SP, Del Castillo RA, Pérez MG. Linfoma del manto. *An Med Interna*. 2007;24(3):142-5.

Khurana B, Goyal AK, Budhiraja A, Arora D, Vyas SP. siRNA delivery using nanocarriers - an efficient tool for gene silencing. *Curr Gene Ther*. 2010;10(2):139-55.

Kornberg A. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science*. 1960;131(3412):1503-8.

Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997;3(6):614-20.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro: *Elsevier*, 2005.

Kunze D, Kraemer K, Erdmann K, Froehner M, Wirth MP, Fuessel S. Simultaneous siRNA-mediated knockdown of antiapoptotic BCL2, Bcl-XL-xL, XIAP and survivin in bladder cancer cells. *Int J Oncol*. 2012.

Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. Bcl-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(12):989-1000.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol*. 2003.

Lorenz C, Hadwiger P, John M, Vornlocher HP, Unverzagt C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg Med Chem. Lett*. 2004;14(19):4975-7.

Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, Möröy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* 1994;13(15):3487-95.

Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):485-95.

Martin DP, Schmidt RE, Di Stefano PS, Lowry OH, Carter JG, Hohnson EM. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol.* 1988;107(3):829-44.

Martimprey H, Vauthier C, Malvy C, Couvreur P. Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71:490-504.

Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 2004;431(7006):343-9.

Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-Induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science.* 2004;305(5688):1289-92.

Morsy MA, Mitani K, Clemens P, Caskey T. Progress toward human gene therapy. *JAMA*. 1993;270(19):2338-45.

Motokura T, Bloom T, Kim HG, Jüppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*. 1991;350(6318):512-5.

Müller AMS, Ihorst G, Mertelsmann R, Engelhardt M. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol*. 2005;84:1-12.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(8):592-603.

Okamoto K, Ocker M, Neureiter D, Dietze O, Zopf S, Hahn EG, Herold C. Bcl-2-specific siRNAs restore gemcitabine sensitivity in human pancreatic cancer cells. *J Cell Mol Med*. 2007;11(2):349-61.

Osborne BA, Schwartz LM. Essential genes that regulate apoptosis. *Trends Cell Biol*. 1994;4(11):394-9.

Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *J Intern Med*. 2010;267(1):44-53.

Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther*. 2006;13(6):464-77.

Pauly JL, Ovak GM, Russell CW. Isolation of interleukin 2 (IL-2) from human and mouse lymphocyte culture supernatants by batch adsorption onto silicic acid. *J Immunol Methods*. 1984;75(1):73-84.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochem Biophys Acta*. 2004;1644(2-3):83-94.

Portugal F, Oswald T. Avery: Nobel Laureate or noble luminary?. *Perspect Biol Med*. 2010;53(4):558-70.

Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998; 27;339(9):605-15.

Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 1992;356(6368): 397-400.

Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(1):23-36.

Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. 2005;123(4):621-9.

Ranganath RM, Nagashree NR. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol*. 2001;202:159-242.

Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S, Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochem Biophys Acta*. 1998;1356(1-2):127-37.

Reed JC. Bcl-2 family proteins and hormonal control of cell life and death in normalcy and neoplasia. *Vitam Horm*. 1997;53:99-138.

Renner C, Amberger A, Konwalinka G, Kofler R, Gnaiger E. Changes of mitochondrial respiration content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells. *Biochem Biophys Acta*. 2003;1642(1-2):115-23.

Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2004;22(3):326-30.

Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Purified Argonaute2 and a siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12(4):340-9.

Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. *Histopathol*. 2011;58:4-14.

Rudolph C, Steinemann D, Von Neuhoff N, Gadzicki D, Ripperger T, Drexler HG, Mrasek K, Liehr T, Claussen U, Emura M, Schrock E, Schlegelberger B. Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line Granta-519-519. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;153(2):144-50.

Ryder C, McColl K, Zhong F, Distelhorst CW. Acidosis Promotes Bcl-2 Family- mediated Evasion of Apoptosis: Involvement of Acid-Sensing G Protein-Coupled Receptor GPR65 Signaling to MEK/ERK. *J Biol Chem.* 2012;287(33):27863-75.

Said J. Diffuse aggressive B-cell lymphomas. *Adv Anat Pathol.* 2009;16(4):216-35.

Salvi A, Arici B, De Petro G, Barlati S. Small interfering RNA urokinase silencing inhibits invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(6):671-8.

Sander CA, Kind P, Kaudewitz P, Raffeld M, Jaffe ES. The Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL): a new perspective for the classification of cutaneous lymphomas. *J Cutan Pathol.* 1997;24(6):329-41.

Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R. DNA-damage response network at the crossroads of the cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2007;8(6):377-97.

Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32(11-12):1123-36.

Sifuentes-Romero I, Milton SL, García-Gasca A. Post-transcriptional gene silencing by RNA interference in non-mammalian vertebrate systems: Where do we stand? *Mutat Res.* 2011;728:158-171.

Silva R. *Comparação entre as técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase no diagnóstico dos linfomas Folicular e Difuso de grande célula B* [Dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol.* 2005;23(6):709-17.

Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP.

Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004;432(7014):173-8.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. 2000; 69:217-45.

Sun BK, Tsao H. Small RNAs development and disease. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59:725-37.

Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, Jaffe ES, Pileri AS, Stein H, Thiele J, Vardiman JW.. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2008; 4 ed. Geneva: WHO Press. 439p.

Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*. 1995;27;80(2):279-84.

Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci*. 2006;97(8):689-96.

Tan ML, Ooi JP, Ismail N, Moad AI and Muhammad TS: Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharm Res.* 26: 1547-1560, 2009.

Tiemann K, Alluin JV, Honegger A, Chomchan P, Gaur S, Yun Y, Forman SJ, Rossi JJ, Chen RW. Small interfering RNAs targeting cyclin D1 and cyclin D2 enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in mantle cell lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(11):2148-54.

Tomadaki H, Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2006;43(1):1-67.

Thompson CB. Apoptosis. In: Paul, WE. *Fundamental immunology.* 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999;813-29.

Tsujimoto Y, Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H. Bcl-2 and Bcl-XL-xL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways. *Leukemia.* 1997;11 Suppl 3:380-2.

Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol.* 2004;6(6):509-19.

Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol.* 1999;1(8):E209-16.

Vaskivuo T. Regulation of apoptosis in the female reproductive system. [Dissertation]. Faculty of Medicine, University of Oulu, 2002.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. "A novel assay for apoptosis—flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V". *J Immunol Methods.* 1995;184 (1): 39–51.

Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:331-67.

Wang ZY, Chen Z. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2000;1:101-6.

Weatherall DJ. Gene therapy in perspective. *Nature* 1991;349(6307):275-6.

Weatherall DJ. Scope and limitations of gene therapy. *Bri Med Bull.* 1995;51(1):1-11.

Whitacre CM, Zborowska E, Gordon NH, Mackay W, Berger NA. Topotecan increases topoisomerase II alpha levels and sensitivity to treatment with etoposide in schedule-dependent process. *Cancer Res.* 1997 15;57(8):1425-8.

Whitlock JA, Gaynon PS. Acute lymphocytic leukemia. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11th ed. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins. 1999:2241-61.

Wöhrl W, Häcker G. Extent and limitation of the control of nuclear apoptosis by DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254(3):552-8.

Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash KN, Jayaraman M, Wang G, Pandey RK, Rajeev KG, Nakayama T, Charrise K, Ndungo EM, Zimmermann T,

Koteliansky V, Manoharan M, Stoffel M. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotechnol.* 2007;25(10):1149-57.

Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med.* 2004;10(8): 816-20.

Xu Y, Linde A, Larsson O, Thormeyer D, Elmen J, Wahlestedt C, Liang Z. Functional comparison of single- and double-stranded siRNAs in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(3):680-7.

Yeh HC, Ho YP, Wang TH. Quantum dot-mediated biosensing assays for specific nucleic acid detection. *Nanomedicine.* 2005;1(12):115-21.

Yu SP, Choi DW. Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(17):9360-2.

Whitlock JA, Gaynon PS. Acute lymphocytic leukemia. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. Wintrobe's Clinical

Haematology. 11th ed. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1999: 2241-61.

Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*. 2002; 296(5571):1265-9.

Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(11):3667-77.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. 2004;19:124-28.

Zimmer AS. Perfil imunohistoquímico das proteínas da família Bcl-2 e evolução clínica do câncer de ovário: uma análise de pacientes do hospital das clínicas de Porto Alegre/Brasil. [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.