



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE NEURONAL (nNOS) EM LINHAGEM DE
NEUROBLASTOMA VIA siRNAs SINTÉTICOS EM DUPLA FITA**

LINUS DE QUEIROZ PEREIRA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
2011**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE NEURONAL (nNOS) EM LINHAGEM DE
NEUROBLASTOMA VIA siRNAs SINTÉTICOS EM DUPLA FITA**

LINUS DE QUEIROZ PEREIRA

ORIENTADOR: RICARDO TITZE DE ALMEIDA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 33 / 2011

**BRASÍLIA/DF
JULHO/2011**

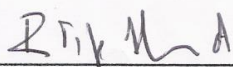
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE NEURONAL (nNOS) EM LINHAGEM DE
NEUROBLASTOMA VIA siRNAs SINTÉTICOS EM DUPLA FITA

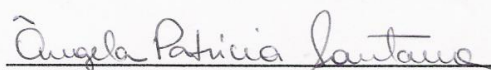
LINUS DE QUEIROZ PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL,
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

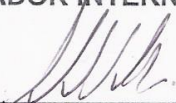
APROVADA POR:



Ricardo Titze De Almeida
Professor doutor da Universidade de Brasília
(ORIENTADOR)



Ângela Patrícia Santana
Professora doutora da Universidade de Brasília
(EXAMINADOR INTERNO)



Ana Carolina Mortari
Professora doutora da Universidade de Brasília
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 25 de julho de 2011.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

PEREIRA, L. Q. **Silenciamento da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em linhagem de neuroblastoma via siRNAs sintéticos em dupla fita**, Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 66 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Linus de Queiroz.

Silenciamento da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em linhagens de neuroblastoma via siRNAs em dupla fita / Linus de Queiroz Pereira; orientação de Ricardo Titze de Almeida – Brasília, 2011. 66 p:Il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

1. Óxido nítrico 2. NO sintase neuronal (nNOS). 3 Morte neuronal. 4. Interferência de RNA e 5 Terapia gênica. I.

PEREIRA, L. Q. II. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder saúde e sabedoria necessárias para a conclusão dessa jornada.

Aos meus pais, Hiram e Sônia, por sempre me apoiarem nos momentos de dificuldades e servirem de inspiração em momentos de decisão.

À minha namorada, Tarcylla, por me incentivar a nunca desistir e por sempre estar ao meu lado.

Aos professor Ricardo Titze, pela inspiração e conceitos divididos necessários para o término desse trabalho.

Ao pessoal do laboratório, Ana, Fernando, Kátia, Luciana, Ludmyla e Simoneide por me ajudarem sempre que foi preciso.

Ao pessoal de Ribeirão Preto, Nádía, Fernando e professora Elaine pela troca de informações tão importantes para a conclusão do estudo.

Finalmente, a todos meus amigos que estiveram presentes em minha vida durante esses dois anos e puderam contribuir para o meu sucesso.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	PÁGINA
PREFÁCIO	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I	10
Introdução	10
Referencial Teórico	10
Objetivos	15
Referências	16
CAPÍTULO II	19
Título do artigo	19
Introdução	19
Material e Métodos	20
Resultados	28
Discussão	36
Conclusões	40
Referências	41
CAPÍTULO III	46
Considerações Finais	46
ANEXOS	47

PREFÁCIO

O óxido nítrico (NO) é mensageiro celular que atua em diversos tecidos do organismo animal. Trata-se de molécula gasosa liberada a partir da oxidação da L-arginina em L-citrulina, reação que é catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintases ou NOS. As enzimas NOS apresentam três isoformas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS). A nNOS, objeto do atual estudo, é responsável por grande parte do NO presente no sistema nervoso. Atualmente sabe-se que o NO tem papel importante na formação e no funcionamento do sistema nervoso, bem como na patogenia de distúrbios neurodegenerativos. Nesse sentido, vários estudos mostram que fármacos inibidores das enzimas NOS são capazes de atenuar os efeitos tóxicos do NO sobre o sistema nervoso. Tais achados vinculam essas enzimas à patogênese da morte neuronal e as colocam como alvos terapêuticos de alto potencial. Recentemente foram introduzidos conhecimentos e técnicas para silenciamento de genes de interesse em nível pós-transcricional, a chamada interferência de RNA ou RNAi. O presente trabalho voltou-se à obtenção de estruturas de RNA curtos em dupla fita – siRNA capazes de silenciar a expressão de nNOS. Essas mesmas estruturas genéticas foram eficazes no controle da morte neuronal por apoptose, revelando o seu potencial uso na terapêutica de distúrbios neurodegenerativos.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é formado pelas enzimas NO sintases e desempenha papel na patogênese da neurodegeneração. NO sintase neuronais são expressas em áreas cerebrais lesionadas e sua inibição reduz efeitos de agentes neurotóxicos. O atual estudo desenvolveu siRNAs (*small interfering RNAs*) direcionados a duas sequências do RNAm de nNOS, presentes nos exons 2 e 28. Primeiramente, foi utilizado o algoritmo Biopredsi para identificar alvos de RNAi. Foi realizada síntese química dos siRNA duplos com 21 nucleotídeos - *exon2_hnNOS* e *exon28hnNOS* (Qiagen). Células de neuroblastomas SH-SY5Y receberam 150 pmol ou 300 pmol de cada siRNA estruturado em lipossomas (Lipofectamine 2000[®], Invitrogen). Utilizou-se o controle negativo *scramble* All-Stars[®] (Qiagen). Os meios de cultivo celular utilizados foram Optimen[®] e DMEM[®] (Gibco), pelas primeiras 6h e para as 24h de incubação restantes, respectivamente. O conteúdo de RNAm de nNOS foi quantificado por PCR em tempo real via SYBR Green[®]; os efeitos de silenciamento foram apresentados pela expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). O nível de RNAm foi reduzido para até 60% do controle; os efeitos de silenciamento variaram de acordo com os alvos e doses. Os efeitos dos siRNA sobre a apoptose por neomicina foram determinados pelo ensaio de MTT. As células foram lesionadas por neomicina e tratadas com um dos siRNAs (*exon2_hnNOS*, *exon28hnNOS* ou *scramble*) por dois tempos distintos: imediatamente após ou 24h após a lesão. Ambas estruturas de siRNA mostraram efeitos antiapoptóticos, que alcançaram o máximo de 28,7%. Os efeitos variaram de acordo com o siRNA e o tempo de tratamento. *Exon2_hnNOS* produziu o maior efeito quando o tratamento foi realizado logo após lesão; *exon28_hnNOS* foi mais efetivo 24h após a lesão. Os resultados do atual estudo mostram a utilidade de siRNAs no entendimento da patogenia de doenças neurológicas e abrem novos caminhos para a terapia gênica de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: nNOS, apoptose, doenças neurodegenerativas, lesão cerebral, interferência de RNA, terapia gênica.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is formed by the NO synthase enzymes and play pivotal roles in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Neuronal NO synthase enzyme (nNOS) is expressed in brain areas submitted to injury, and its pharmacological blocking can decrease the effects of neurotoxic agents. In our study, we developed and tested two siRNAs targeted to two different nNOS mRNA sequences, located in the exons 2 and 28. Firstly, we used the Biopredsi algorithm to identify the RNAi targets. The synthetic siRNA duplexes with 21 nucleotides (*exon2_hnNOS* and *exon28_hnNOS*) were synthesized by Qiagen. Neuroblastoma cells SH-SY5Y received 150 pmol or 300 pmol of each siRNA mixed with Lipofectamine 2000[®] (Invitrogen). The negative control was the commercial *scramble* All-Stars[®] (Qiagen). The cell culture media used in this study were Optimem[®] and DMEM[®] (Gibco), for the first 6h and for the remaining 24h of incubation, respectively. The mRNA content was quantified by reverse transcription real-time PCR with SYBR Green[®] and the silencing effects on nNOS expressed by the relative expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$). The nNOS mRNA content was reduced to 60% to the control level; the silencing effects varied according to the targets and doses used. To determine the effects of siRNA on the apoptotic phenotype, we used the MTT assay. Cells were lesioned by neomycin and treated with each of the siRNAs (*exon2_hnNOS*, *exon28_hnNOS*, or *scramble*) at two time-points: immediately after – or 24h after lesion. Both siRNA structures showed anti-apoptotic effects that reached 28.7%. The effects varied according to the siRNA used and the treatment time-point. *Exon2_hnNOS* produced the highest effect when the treatment began immediately after lesion; *exon28_hnNOS* was more effective 24h after lesion. Our results encourage the use of siRNAs to study the role of nNOS in the pathogenesis of brain diseases and highlighted a new therapeutic approach for neurodegenerative diseases.

Key-words: nNOS, apoptosis, neurodegenerative diseases, brain injury, RNA interference, gene therapy.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas ocupam posição de destaque nas ciências da saúde e comumente envolvem a produção de mediadores ligados à morte neuronal, com destaque para o óxido nítrico (NO) (Hara & Snider, 2007).

O NO é molécula formada como subproduto da oxidação da L-arginina em L-citrulina, reação química catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). As três principais isoformas desta enzima são a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzida (iNOS). Grande parte do NO circulante no sistema nervoso é sintetizado pela enzima nNOS (Dusse et al., 2003).

A morte neuronal é fenômeno que ocorre em doenças neurodegenerativas de grande importância, como epilepsias, lesões medulares e Parkinson. A inibição farmacológica da enzima nNOS é capaz de reverter eventos neurodegenerativos em modelos animais, mostrando que a via nitrérgica contém potenciais alvos terapêuticos (Lossi et al., 2005).

Recentes descobertas revelam a possibilidade de silenciar genes específicos em nível pós-transcricional, mediante interferência de RNA (RNAi), o que tem impulsionado o desenvolvimento científico-tecnológico no campo da saúde. Assim, o desenvolvimento de um método capaz de silenciar a enzima nNOS via RNAi pode representar uma alternativa no controle de eventos celulares que desencadeiam a morte neuronal e envolvem o óxido nítrico (Zimmerman et al., 2006).

REFERENCIAL TEÓRICO

1) Óxido nítrico – histórico e síntese celular

As descobertas sobre o óxido nítrico (NO) foram iniciadas a partir de estudos sobre a vasodilatação induzida pela acetilcolina, que mostrou-se dependente da presença de endotélio intacto. Observou-se então que esse efeito foi mediado pela liberação de uma molécula denominada de fator de relaxamento dependente do endotélio, posteriormente denominado de NO (Furchgott & Zawadzki, 1980). Novos

estudos mostraram a importância do NO quanto ao processo de relaxamento vascular (Ignarro, 1987; Palmer et al., 1987; Moncada et al., 1988). Além disso, vários trabalhos revelaram a relação entre o NO e a resposta imune do organismo. Atualmente sabe-se que o óxido nítrico é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui-se em molécula de regulação do sistema imune (Hibbs Jr. et al., 1987; Marletta et al., 1988). Finalmente, foi observado que o NO é produzido no sistema nervoso central, demonstrando que sua síntese é estimulada por glutamato via receptores de NMDA (N-metil-d-aspartato) (Bredt et al., 1989; Knowles et al., 1989; Garthwaite et al., 1989).

O NO é molécula gasosa, encontrada normalmente na atmosfera em pequenas quantidades. A sua toxicidade deve-se à presença de radical livre que a torna um agente químico altamente reativo (Flora Filho et al., 2000). Além disso, sabe-se que o NO tem papel relevante na biologia celular. Trata-se de mensageiro celular com ação em diversos tecidos do organismo como rins, vasos sanguíneos, coração, pulmões, sistema imune, sistema nervoso, entre outros. Nesse sentido, vários estudos evidenciam que essa molécula participa de diferentes eventos celulares e que, dependendo da concentração e da depuração tecidual, o NO pode apresentar efeitos benéficos ou tóxicos à célula em questão (Domenico, 2004).

A liberação do NO ocorre a partir de uma reação de oxidação da L-arginina em L-citrulina, que é catalizada pela óxido nítrico sintase (NOS), enzima cálcio-dependente. A sequência de etapas bioquímicas inicia-se com o influxo de cálcio para o meio intracelular, em decorrência da ligação de glutamato aos receptores de NMDA presentes na membrana celular. O aumento do cálcio intracelular ativa moléculas de calmodulina que, por sua vez, ativam a enzima NOS, culminando com a formação de NO e L-citrulina (Zhang & Snyder, 1995).

2) Enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)

Conforme citado, as enzimas óxido nítrico sintases - NOS têm o papel de catalisar a reação na qual a L-arginina é oxidada em L-citrulina, o que libera NO. Três isoformas das enzimas NOS foram descritas: NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS endotelial (eNOS ou NOS3) e NOS induzida (iNOS ou NOS2). As duas primeiras são enzimas de expressão constitutiva e apresentam como característica a

dependência de íons de cálcio e de calmodulina para sua ativação. Já a iNOS é ativada por citocinas (Dusse, et al., 2003). A nNOS pode ser encontrada principalmente em neurônios, neutrófilos e astrócitos. Já a eNOS está localizada no endotélio vascular, além de astrócitos. Por fim, a iNOS está presente em células como macrófagos, hepatócitos e células da glia (Kavya, et al., 2006).

A estrutura das enzimas NOS é formada por dois domínios catalíticos: o domínio de oxigenase, que contém sítios de ligação para L-arginina, grupo heme, e tetrahidrobiopterina (BH₄), e o domínio redutase, que possui sítios de ligação para FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), FMN (Flavina Mononucleotídeo) e NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – P). Esses dois domínios são conectados por um sítio de ligação de calmodulina. Os grupos flavina, FAD e FMN, têm como função transferir elétrons doados pelo grupo NADPH para o grupo heme, localizado no domínio oxigenase, tornando possível a oxidação da L-arginina em L-citrulina, reação que libera o NO (Alderton, et al., 2001).

A enzima nNOS, objeto do atual estudo, apresenta variantes genéticas formadas por *splicing* alternativo. Nesse sentido, há quatro principais produtos funcionais descritos: nNOS- α , nNOS- β , nNOS- γ e nNOS- μ (Alderton, 2001; Kavya et al., 2006). O produto de tamanho completo do gene nNOS é denominado nNOS1, que corresponde à variante nNOS- α . Possui 29 exons que, com exceção do exon 1, são todos traduzidos para gerar uma proteína de 1434 aminoácidos com cerca de 160 Kda. A tradução inicia-se no códon ATG situado no exon 2 (Figura 1). Os variantes de *splicing* nNOS- β e nNOS- γ não apresentam esse exon 2. No caso do variante nNOS- β , a tradução inicia-se a partir do códon de iniciação CTG situado no exon 1a, gerando uma proteína de 136 Kda. O códon de iniciação da nNOS- γ (ATG) situa-se no exon 5, gerando uma proteína truncada de 125 Kda. Os variantes nNOS- β e nNOS- γ não apresentam, assim, o domínio PDZ [P]ostsynaptic density protein-95 (PSD-95) / *Drosophila* disc large / tumor suppressor-zonula occludens-1 protein (ZO-1)]. Assim, esses variantes nNOS- β e nNOS- γ permanecem dispersos no citoplasma. O variante nNOS- α , ao contrário, possui este domínio PDZ (ou DHR - *Dlg homologous region* ou GLGF - *glycine-leucine-glycine-phenylalanine*), que media a sua associação com a proteína PSD95, e permanece portanto ancorado à membrana plasmática neuronal na vizinhança do receptor de NMDA; dessa forma, a ativação da enzima está relacionada ao influxo de cálcio por esse receptor. Quanto

aos variantes nNOS- β e nNOS- γ , a ativação não é dependente do receptor de NMDA. Ensaios *in vitro* demonstraram que a enzima nNOS- γ não apresenta atividade catalítica comparável à variante nNOS- α , fato não observado com a enzima nNOS- β . Outros exemplos de variabilidade genética, como inserções e deleções de cassetes, também têm sido descritos (Kavya et al., 2006).

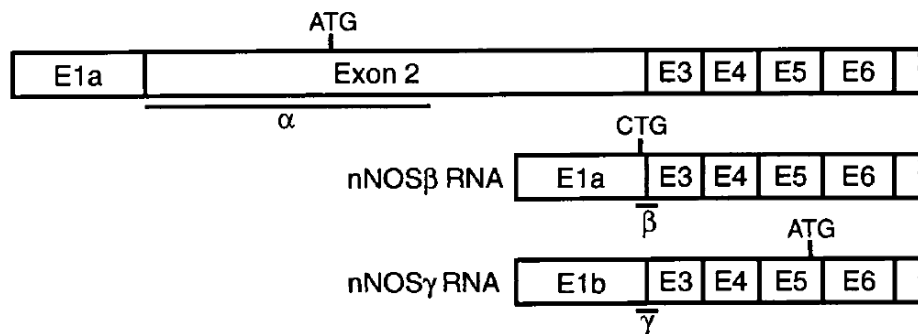


Figura 1: Variantes de *splicing* da enzima nNOS (nNOS α , nNOS β e nNOS γ), obtido de Eliasson et al. (1997).

3) Papel do NO em distúrbios neurodegenerativos

O fenômeno da morte celular pode ocorrer como parte de um processo fisiológico e importante para a manutenção da homeostase orgânica. Nesse caso, é descrito como morte celular programada (PCD), sendo classificado em três diferentes formas: tipo I, nuclear ou apoptótica; tipo II, autofágica; tipo III, citoplasmática. Cada forma pode acometer tipos celulares específicos, em diferentes fases de desenvolvimento. Podem, também, ser ativadas por diferentes tipos de injúrias, como lesão do DNA, neurotoxinas, acúmulo de proteínas mal-enoveladas, entre outros (Cunningham, 1982; Carke, 1990). Assim, a apoptose é uma forma de PCD de ocorrência natural na maioria dos tecidos durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal, também ocorrendo em tecidos proliferativos de organismos adultos. Nas células em apoptose, a morte é individual, ao redor de células vizinhas que estão saudáveis, sendo caracterizada por alterações morfológicas típicas (Bredesen et al., 2006).

A produção excessiva de NO pode iniciar um quadro neurotóxico. O NO atua sobre a enzima guanilato ciclase (GC) resultando na formação de cGMP (Salvemini,

et al. 1993). O glutamato e a ativação da enzima GC são capazes de induzir morte neuronal em quadros de isquemia cerebral focal. Além disso, a interação de moléculas de NO com O_2^- resulta na formação de peroxinitrito, um radical tóxico para as células nervosas capaz de induzir morte celular. A decomposição desse radical resulta na formação dos radicais hidroxila e dióxido de nitrogênio que também contribuem para os efeitos neurotóxicos (Yun et al. 1997).

Apoptose neuronal envolvendo o NO tem sido estudada em vários modelos animais, em particular naqueles que representam doenças neurodegenerativas crônicas, como o Parkinson. Nesse caso, há uma perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra que resulta em distúrbios motores típicos da doença (Beal, 2001). Outros exemplos de doenças neurodegenerativas que envolvem a via nitrérgica são o acidente vascular cerebral, a esclerose amiotrófica lateral e o Alzheimer (Domenico, 2004; Conforti et al., 2007).

4) Interferência de RNA (RNAi)

A técnica de RNAi já foi utilizada com sucesso para silenciar genes em células neuronais, sendo considerada ferramenta altamente promissora para a terapêutica de doenças neurológicas (Wood et al., 2003; Gonzales-Alegre, 2007). O mecanismo de RNAi baseia-se em processo celular composto de duas etapas. Inicialmente o RNA em dupla-fita (double-stranded RNA - dsRNA) é clivado dentro da célula em fragmentos de 21 - 23 nucleotídeos pela enzima nuclease *Dicer*. Em seguida, os pequenos fragmentos de dsRNA conhecidos como *small interfering RNAs (siRNAs)* se associam a proteínas celulares formando um complexo chamado *RISC (RNA Induced Silencing Complex)*. Uma enzima presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs e elimina uma das fitas (denominada *passenger*), permanecendo a fita *guide (antisense)* que irá guiar o complexo RISC até o RNAm alvo, para posterior degradação (Alton et al., 2007; Tieman & Rossi, 2009).

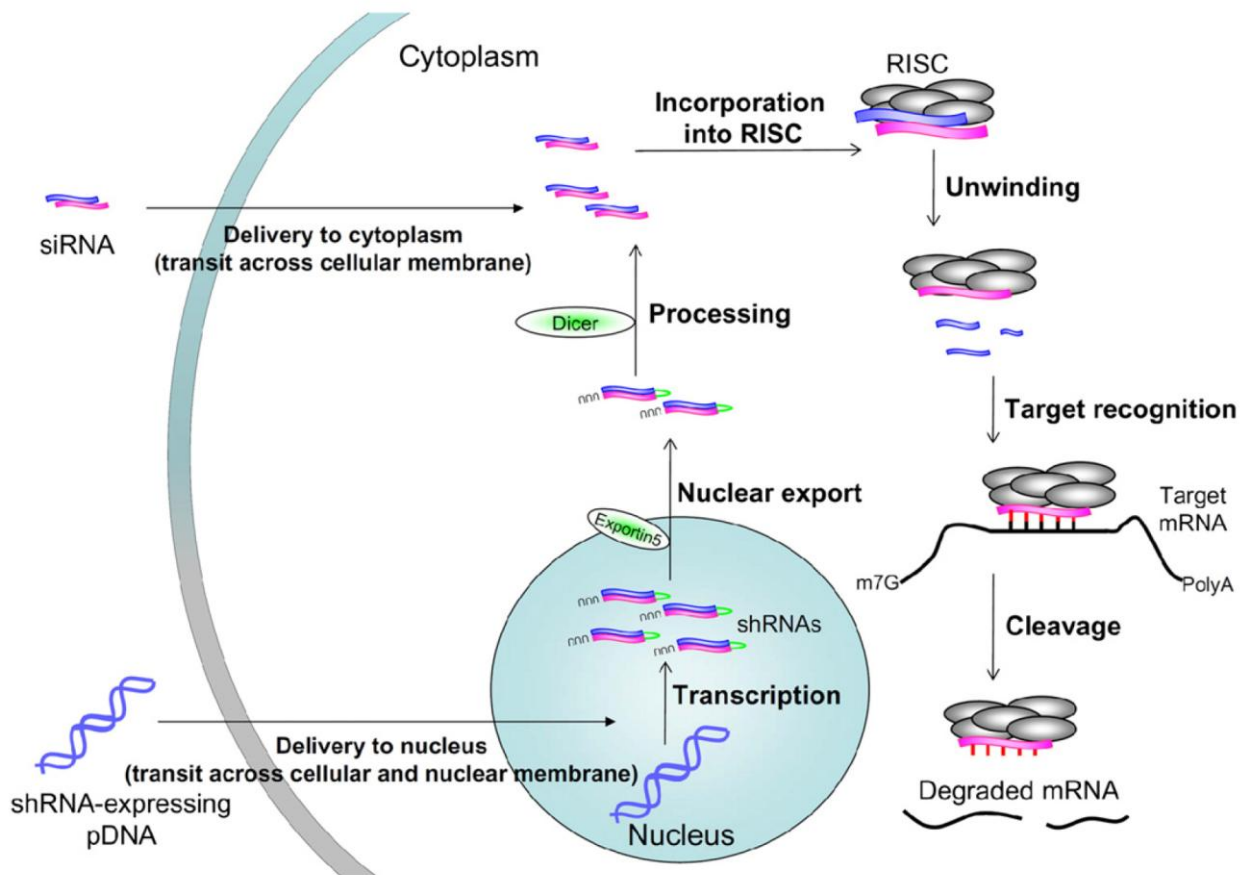


Figura 2: Esquema ilustrativo dos eventos de interferência de RNA (RNAi), obtido de Takahashi et al. (2006). Os shRNAs são transcritos a partir do DNA genômico e exportados ao citoplasma da célula pela proteína exportina 5 (*Exportin5*). São processados pela enzima *Dicer* e incorporados ao sistema enzimático RISC (*RNA-induced silencing complex*). A seguir a fita *passenger* (na cor roxa) é eliminada e a fita *guide*, representada em rosa, terá o papel de reconhecer a seqüência-alvo de RNAm (*target mRNA*) e “guiar” o complexo RISC a este alvo, que será posteriormente degradado. Os siRNAs são RNAs exógenos curtos e em dupla fita, que podem ser transfectados para o interior das células e diretamente incorporados ao complexo RISC.

OBJETIVOS

GERAL

- Desenvolver estratégia para silenciamento gênico da enzima nNOS, visando a terapêutica da apoptose neuronal.

ESPECÍFICOS

- Obter RNAs curtos em dupla fita (siRNAs) capazes de silenciar os variantes de *splicing* alfa, beta e gama da enzima nNOS;
- Avaliar a eficácia dos siRNAs na redução da apoptose de neuroblastomas causada por neomicina.

REFERÊNCIAS

- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, n.357, p.593-615, 2001.
- ALTON, E.; FERRARI, S.; GRIESENBACH, U. Progress and prospects: gene therapy clinical trials. **Gene Therapy**, n.14, p.1439-1447, 2007.
- BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, n.2, p.325-332, 2001.
- BREDESEN, D. E.; RAO, R. V.; MEHLEN, P. Cell death in the nervous system. **Nature**, n.443, p.796-802, 2006.
- BREDDT, D. S. & SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhanced of cGMP levels in the cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 86, p. 9030-9033, 1989.
- CLARKE, P.G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anatomy and Embryology**, n. 181 (3), p. 195-213, 1990.
- CONFORTI, L.; ADALBERT, R.; COLEMAN, M.P. Neuronal death: where does the end begin. **Trends in Neuroscience**, n. 30, p. 15-66, 2007.
- CUNNINGHAM, T.J. Naturally occurring neuron death and its regulation by developing neural pathways. **International Review of Cytology**, n.74, p.163-186, 1982.
- DOMENICO, R. Pharmacology of Nitric Oxide: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Current Pharmaceutical Design**, v.10, n.14. p.1667-1676,2004. [PubMed: 15134564].
- DUSSE, L.P.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

- ELIASSON, M. J. L.; BLACKSHAW, S.; SCHELL, M. J.; SNYDER, S. H. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.94, p.3396-3401, 1997).
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, n. 46 (3), p. 265-271, 2000.
- FURCHGOTT, R.T. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, n. 288, p. 373-376, 1980.
- GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal of Pharmacology**, n. 172, p. 413-416, 1989.
- GONZALES-ALEGRE, P. Technology insight: therapeutic RNA interference – how far from the neurology clinic? **Nature Clinical Practice. Neurology**, n.3, p.394-404, 2007.
- HARA, M.R.; SNYDER, S.H. Cell signaling and neuronal death. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, n.47, p.117-141, 2007.
- HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: Role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, n. 235, p. 473-476, 1987.
- KAVYA, R.; SALUJA, R.; SINGH, S.; DIKSHIT, M. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. **Nitric Oxide**, n.15, p.280-294, 2006.
- IGNARRO, L. J. Endothelium derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation Research**, n.61, p. 866-879, 1987.
- KNOWLES, R. G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 86, p. 5159-5162, 1989.

- LOSSI, L.; CANTILE, C.; TAMAGNO, I.; MERIGHI, A. Apoptosis in the mammalian CNS: lessons from animal models. **Veterinary Journal**, n.170, p.52-66, 2005.
- MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, n. 27, p. 8706-8711, 1988.
- MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochemical Pharmacology**, n. 1;37(13), p.2495-2501, 1988.
- PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S. & MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, n. 333, p. 664-666, 1987.
- SALVEMINI, D.; MISKO, T. P.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M. G.; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 90 (15), p. 7240-7244, 1993.
- TIEMANN K; ROSSI, J.J. RNAi-based therapeutics – current status, challenges and prospects. **EMBO Molecular Medicine**, n.1, p.142-151, 2009.
- WOOD, M. J.; TRÜLZSCH, B.; ABDELGANY, A.; BEESON, D. Therapeutic gene silencing in the nervous system. **Human Molecular Genetics**, n.12, p.R279-R284, 2003.
- YUN, H. Y.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. **Molecular Psychiatry**, n.2, p. 300-310, 1997.
- ZHANG, J.; SNYDER, S.H. Nitric oxide in the nervous system. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, n. 35, p. 213-233, 1995.
- ZIMMERMANN, T.S.; LEE, A. C.; AKINC, A.; BRAMLAGE, B.; BUMCROT, D.; FEDORUK, M. N.; HARBORTH, J.; HEYES, J. A.; JEFFS, L. B.; JOHN, M.; JUDGE, A. D.; LAM, K.; MCCLINTOCK, K.; NECHEV, L. V.; PALMER, L. R.; RACIE, T.; RÖHL, I.; SEIFFERT, S.; SHANMUGAM, S.; SOOD, V.; SOUTSCHEK, J.; TOUDJARSKA, I.; WHEAT, A. J.; YAWORSKI, E.; ZEDALIS, W.; KOTELIANSKY, V.; MANOHARAN, M.; VORNLOCHER, H. P.; MACLACHLAN, I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. **Nature**, n.441, p.111–114, 2006.

CAPÍTULO II

ARTIGO

SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL (nNOS) EM LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA VIA siRNAs SINTÉTICOS EM DUPLA FITA

Linus Q. Pereira^a; Simoneide S. Silva^a; Luciana M. Klüppel^a; Nádia R. Ferreira^b; Luis Pardo^c; Walter Stühmer^c; Elaine Del Bel^b; Ricardo Titze-de-Almeida, PhD^a.

^aLab. Tecnologias para Terapia Gênica, FAV, UnB, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, DF, Brasil, 70910-970.

^bLab. Neurofisiologia e Biologia Molecular, Dept. Morfologia Estomatologia e Fisiologia, FORP, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 14040-940.

^cMolecular Biology of Neuronal Signals, Max-Planck-Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany, 37075.

INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) é molécula sinalizadora relevante e ubiqüitária, que desempenha papel regulatório sobre diferentes processos fisiológicos de mamíferos (Thomas et al., 2008). Entre as várias funções reguladas por esse mensageiro celular destacam-se a pressão arterial, a defesa imunitária contra patógenos, bem como as funções neuronais de transmissão sináptica, plasticidade e memória. Trata-se de molécula gasosa, que é formada pela ação de enzimas óxido nítrico sintases (NOS) sobre o precursor L-arginina (Alderton et al., 2001). Três distintas isoformas de NOS foram identificadas em diferentes tipos celulares. A neuronal (nNOS ou NOS1) e a endotelial (eNOS ou NOS3) são comumente encontradas em neurônios e em células endoteliais, respectivamente. A isoforma induzida (iNOS ou NOS-2), por sua vez, é expressa em resposta a citocinas ou a componentes de um processo infeccioso, como lipopolissacarídeos microbianos (Zhou & Zhu, 2009). Quanto à isoforma neuronal ou nNOS, três principais variantes de *splicing* funcionais já foram descritos – alfa, beta e gama (Eliasson et al., 1997).

O NO tem papel relevante na fisiologia das células e na patogênese de vários distúrbios, podendo atuar no processo saúde-doença de forma positiva ou negativa (Domenico, 2004). Nesse sentido, há evidências de que as enzimas de síntese de NO tenham papel importante nos eventos celulares que levam à morte neuronal e,

consequentemente, na fisiopatologia de vários distúrbios neurodegenerativos (Conforti et al., 2007; Hara et al., 2007). No sentido terapêutico, a inibição farmacológica da enzima NOS pode reverter eventos neurodegenerativos, mas essa inibição acarreta sérios efeitos colaterais sobre o sistema cardiovascular e sobre a resposta imunitária (Török, 2008; Silverman, 2009; Haitao et al., 2009; Yu et al., 2011).

Recentemente foi descrita uma ferramenta capaz de inibir de forma específica a expressão de genes de interesse. Trata-se da interferência de RNA (RNAi), descoberta que revolucionou a pesquisa científica e projetou novas aplicações para a terapêutica de doenças graves como o câncer e o Parkinson (Fire et al., 1998; Gupta et al., 2004; Bushati & Cohem, 2007; Gonzales-Alegre & Paulson, 2007).

Com base no acima exposto, considera-se relevante o desenvolvimento de estratégias – nesse caso baseadas em RNAi – para silenciar a expressão da enzima nNOS. Os dois produtos tecnológicos que são o objeto do atual estudo são inovadores e permitem duas estratégias de silenciamento de nNOS: o silenciamento específico da variante de *splicing* alfa e o silenciamento conjunto das variantes alfa, beta e gama.

MATERIAL E MÉTODOS

O atual estudo foi organizado em quatro etapas experimentais. Na primeira etapa foi realizada a análise de bioinformática para levantamento e análise das sequências de nNOS e para identificação de sequências-alvo para RNAi. A estratégia do presente estudo foi utilizar a sequência inteira da região codante de nNOS para identificação destes alvos de RNAi. Caso houvesse mutações nestas regiões alvo, o alvo seria descartado. A etapa seguinte incluiu ensaios para silenciamento de nNOS, realizando-se cultivo de neuroblastomas e transfecção das células com siRNA sintéticos estruturados em lipossomas catiônicos. Na terceira etapa avaliou-se o grau de silenciamento gênico de nNOS, mediante extração de RNA, transcrição reversa e análise da expressão gênica por PCR em tempo real. Por fim, a quarta etapa verificou o efeito antiapoptótico dos siRNAs, a partir de testes fenotípicos de viabilidade celular baseados em ensaios de MTT.

Etapa I – Análise de bioinformática sobre sequências de nNOS e sobre alvos para interferência de RNA

1.1 Análise de sequências nucleotídicas de nNOS

As informações sobre a estrutura do gene nNOS humano, objeto do atual estudo, foram cuidadosamente analisadas, para a execução das etapas seguintes do projeto. Isso incluiu o levantamento da sequência de referência para o presente estudo, necessária para o desenho de silenciamentos exon-específicos. Também foram analisadas outras sequências de nNOS, no sentido de se evitar o direcionamento da RNAi sobre alvos situados em regiões de variabilidade. Os dois passos dessa etapa foram:

a) Levantamento das sequências de RNAm depositadas no GenBank, incluindo a sequência de referência para o estudo. Para este levantamento, foram utilizados os seguintes bancos de dados: 1. Genbank, que é o banco de dados sobre sequências genéticas do *National Institutes of Health (NIH) / National Center for Biotechnology Information (NCBI)* disponível no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Utilizou-se informações do projeto *HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)* para fins de nomenclatura padrão do gene de nNOS do homem, disponíveis no endereço <http://www.genenames.org/>.

b) Análise de variabilidade genética entre sequências de nNOS. Essa análise foi feita mediante o algoritmo de alinhamento de sequências múltiplas ClustalW, disponível no endereço <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. O resultado do alinhamento está apresentado no Anexo II.

1.2 Escolha do algoritmo para identificação de alvos para interferência de RNA - RNAi

Vários métodos foram descritos e disponibilizados para a identificação de regiões do RNAm de nNOS suscetíveis à interferência de RNA (Hajeri & Singh, 2009). O desempenho de diferentes metodologias foi recentemente avaliado de

forma comparativa, mostrando que os algoritmos BIOPREDSi, ThermoComposition e DSIR apresentam melhores previsões para silenciamento gênico (Matveeva et al., 2007). Com base nesse estudo, optou-se por utilizar o algoritmo BIOPREDSi, que é baseado em redes neurais artificiais (Huesken et al., 2005).

1.3 Uso do algoritmo BIOPREDSi para seleção de alvos de interferência de RNA sobre a enzima nNOS

O algoritmo BIOPREDSi, disponível no endereço <http://www.biopredsi.org/start.html>, foi utilizado para identificação de regiões-alvo para RNAi presentes na sequência codante do RNAm de nNOS. Esse algoritmo oferece resultados sobre dez *loci* para silenciamento gênico, que correspondem a sequências de 21 nucleotídeos para a fita *guide* (*antisense*) e para a fita *passenger* (*sense*), contendo o posicionamento na sequência de referência, o *ranking* e o respectivo *score*. Para o atual projeto, optou-se por utilizar duas sequências como alvos de silenciamento: 1. Sequência situada no exon 2, para silenciamento específico da isoforma alfa de nNOS, denominada de *exon2_hnNOS* e; 2. Sequência de RNAi situada no exon 28, para silenciamento das três isoformas de nNOS, alfa, beta e gama, denominada de *exon28_hnNOS*. As sequências não serão aqui apresentadas, pois são objeto de patenteamento para obtenção de propriedade intelectual. Foi utilizado o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ajustado para sequências curtas, que está disponível no endereço <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para avaliar a ocorrência de eventuais regiões de similaridade das duas sequências utilizadas para RNAi de nNOS com relação a outros genes depositados no GenBank. Caso as sequências dos alvos *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS* apresentassem similaridade com sequências de outros genes, esses alvos seriam imediatamente descartados para evitar-se efeitos de silenciamento inespecíficos. O controle negativo do atual estudo (*scramble*) corresponde a uma sequência de nucleotídeos sem homologia com qualquer gene descrito em mamíferos, denominada de All-Stars[®] negative control siRNA (Qiagen, nº 1027281, 20nmol).

Etapa II – Silenciamento de nNOS em neuroblastomas via interferência de RNA

2.1 Síntese química das sequências alvo para interferência de RNA

As sequências de siRNA *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS* foram sintetizadas com estrutura de duplas fitas de 21 ribonucleotídeos, pré-aneladas, na escala de 20 nmol/tubo (sintetizadas pela Qiagen). Os siRNA foram diluídos em um mililitro (mL) de água RNase free.

2.2 Cultura de células SH-SY5Y

O presente estudo utilizou cultivo de células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC[®] CRL-2266[™]), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Neurofisiologia e Biologia Molecular, Dept. Morfologia Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. O cultivo foi realizado sempre em triplicata. Utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Medium* + F12 (DMEM/F12 Gibco[™], Cat. No. 12400-024) aditivado de 10% de soro fetal bovino, 1% de Glutamax[™] I (Cat. No. 35050, Gibco[™]) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (Cat. No. A5955, Sigma-Aldrich[®]). A contagem de células para plaqueamento foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Tripán (Cat. No. 15250, GIBCO[™]). Os frascos com capacidade de 60 mL foram semeados com 3×10^5 células, e o cultivo foi realizado em estufa de CO₂ a 5%, umidade de 90%, a 37°C. As células foram obtidas por tripsinização, utilizando-se tripsina 0,05% e EDTA (Cat. No. 25300 – Gibco[™]), seguida de banhos com *Dulbecco's Phosphate-pBuffered Saline* (D-PBS – Gibco[™], Cat. No. 21600-010).

2.3 Transfecção de neuroblastomas em cultura com o siRNA *exon2_hnNOS* ou com o siRNA *exon28_hnNOS*

Os testes de silenciamento de nNOS foram realizados em dois grupos experimentais, um deles recebendo o siRNA *exon2_hnNOS* e o outro o siRNA *exon28_hnNOS*. Cada siRNA foi inicialmente estruturado em lipossoma catiônico, seguindo as orientações do fabricante (Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, Invitrogen). A metodologia de transfecção dos neuroblastomas em cultura foi baseada em publicações descritas por Zhao et al., 2008; Torchilin et al., 2005 e Hughes et al., 2010. Foram testadas duas concentrações de siRNA, 150 pmol e 300

pmol. O grupo controle negativo foi transfectado com a sequência *scramble* (All-Stars[®] negative control siRNA, Qiagen). A metodologia está descrita no POP 44 do anexo II.

2.4 Obtenção das células de neuroblastoma para posterior extração de RNA

Os cultivos celulares transfectados com o siRNA *exon2_hnNOS* ou com o siRNA *exon28_hnNOS*, nas concentrações acima descritas, foram incubados por 24 horas. As células foram obtidas por tripsinização, conforme POP 43.1 (Anexo II).

Etapa III – Quantificação do silenciamento gênico de nNOS

3.1 Extração de RNA total e análise de sua integridade

O RNA total das células foi extraído e purificado utilizando-se o kit comercial RNeasy[®] Plus Mini Kit (Cat. No. 74134 – Qiagen), de acordo com recomendações do fabricante (POP 46, anexo II). As amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio para análise de integridade e estimativa visual de rendimento.

3.2 Quantificação do RNA

O RNA extraído foi quantificado por fluorimetria (Qubit[®], Invitrogen). A qualidade da extração em termos de pureza foi determinada pela razão entre as concentrações de RNA e de proteína, que deve ser de 1,8 a 2,0 (Sambrook & Russel, 2001).

3.3 Obtenção do cDNA

Para realização do método de RT-qPCR descrito a seguir, foi inicialmente realizada a transcrição reversa (RT) do RNA em sequências de cDNA. Para tanto, utilizou-se o kit comercial SuperScript[™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Cat. No. 11904-018, Invitrogen[™]). A reação utilizou 250 ng RNA e foi realizada via sistema de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Cat. No. 18418-018, Invitrogen[™]), conforme POP 48 do Anexo II. Como controle negativo, foi feita a reação de transcrição reversa

sem incluir o RNA. Esse controle permite detectar a eventual contaminação da amostra com DNA genômico, o que traria consequências ao RT-qPCR.

3.4 RT-qPCR

O presente estudo utilizou a técnica de PCR em tempo real quantitativo após transcrição reversa - RT-qPCR (*reverse transcription quantitative real time PCR*) para quantificar o RNAm de nNOS nos neuroblastomas em estudo. Para realização da técnica, foram seguidos os seguintes passos:

a) Seleção de primers para amplificação de nNOS por RT-qPCR

Os *primers* utilizados no método de RT-qPCR foram obtidos de publicações anteriores via consulta ao National Center for Biotechnology Information – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Foi realizada análise pelo algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para confirmação da identidade e especificidade dos primers quanto ao alvo nNOS. Informações complementares sobre características dos primers foram obtidas no IDT (*Integrated DNA Technologies*) (<http://www.idtdna.com>), via software OligoAnalyser 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), incluindo conteúdo de G e C, *melting temperature* (T_m), *hairpins*, *self-dimers*, *hetero-dimers*, entre outros. Os *primers* foram selecionados para o atual estudo com base nas seguintes características: (i) o tamanho desejado do *amplicon* de 100 pares de base (bp); (ii) percentuais de guanina e citosina de aproximadamente 50%; (iii) reduzida complementariedade intramolecular, evitando-se *hairpins* e *self-dimers*; (iv) reduzida complementariedade intermolecular, evitando-se *hetero-dimers*; (v) reduzida variação nas temperaturas de anelamento $\Delta(T_m)$ entre os *primers forward* e *reverse*, preferencialmente próxima de 1°C. Os *primers* que melhor se adequaram a essas características foram selecionados para o presente estudo (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* de Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS) utilizados para RT-qPCR.

Sigla	Sequência (5' – 3')	Referência
nNOS_Agui	<i>Forward</i> : 5' – GTGGAGGTGCTGGAGGAGTT – 3'	Aguilera et al.;

Sigla	Sequência (5' – 3')	Referência
	<i>Reverse:</i> 5' – CGAGTGC <u>CGGT</u> AGGAA <u>ACGAT</u> – 3'*	2007
nNOS_Dotsch	<i>Forward:</i> 5' – GGTGGAGATCAATATCGCGGTT – 3' <i>Reverse:</i> 5' – CCGGCAGCGGTACTCATTCT – 3'	Dötsch et al.; 2000
nNOS_human	<i>Forward:</i> 5' – GAACTGGGAGACTGAGGTGGTTC – 3' <i>Reverse:</i> 5' – CTCAGTGCATCCC <u>GTTTCCA</u> – 3'	Gunningham et al.; 2007

* nucleotídeos sublinhados correspondem às divergências genéticas entre as sequências gênicas de nNOS do rato e do homem, ajustadas para atender aos ensaios aqui descritos e que utilizaram células humanas.

b) Seleção de genes controles endógenos

O atual estudo utilizou metodologia de RNAi, que atua sobre vias endógenas do metabolismo celular do RNA, portanto é fundamental a inclusão de genes controle endógenos (Tuzmen et al., 2007). Os critérios de seleção dos genes candidatos foram: (i) similaridade nas sequências nucleotídicas de todas as amostras; (ii) resistência às condições experimentais, ou seja, a expressão deve manter-se estável independente do teste realizado; (iii) possibilidade de utilização nas mesmas condições de RT-qPCR utilizadas para o gene alvo (VanGuilder et al., 2008). Neste sentido, optou-se por testar dois genes controle endógenos - hACTB e GAPDH, utilizando-se os *primers* descritos na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* para amplificação de genes controle endógenos.

Alvos	Sequência	Referência
hACTB	<i>Forward:</i> 5' – GACATCCGCAAAGACCTGTAGC – 3' <i>Reverse:</i> 5' – GCCAGGGCAGTGATCTCCTTC – 3'	Nabissi et al., 2010
GAPDH	<i>Forward:</i> 5' – CTCAGTGCATCCC <u>GTTTCCA</u> – 3' <i>Reverse:</i> 5' – GGACTGTGGTCATGAGTCCT – 3'	Dötsch et al., 2007

c) Método de RT-qPCR para quantificação do RNAm de nNOS

Os níveis de RNA mensageiro da enzima NO sintase neuronal foram quantificados por RT-qPCR, considerando cuidados anteriormente descritos para a padronização do método e para a sua utilização específica em ensaios com RNAi

(Bustin, 2000; Tuzmen et al., 2007). O equipamento utilizado foi o termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems).

A mistura de amplificação foi composta de: SYBR[®] Green mix, 5,0 µL; 2,0 µL de cDNA obtido da diluição 1:10 do produto de transcrição reversa de 250 ng de RNA; 0,4 µL de cada primer a 10pmol/µL; água milliQ autoclavada q.s.p. 10µL. Os ciclos de RT-qPCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguida de 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 1min, anelamento e extensão a 60°C por 1min). Foram testados os *primers* nNOS_Agui, nNOS_Dotsch, nNOS_human para quantificação de nNOS. Para amplificação dos genes controle endógenos foram utilizados os *primers* β-actina (hACTB) e GAPDH (gliceraldeído fosfato desidrogenase). Com base nos testes de qPCR, foram selecionados os primers nNOS_human para o gene alvo nNOS, bem como hACTB e GAPDH para os genes controles endógenos.

d) Quantificação relativa do silenciamento gênico

O nível de silenciamento gênico foi determinado pelo método de quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$), que representa quantas vezes a expressão gênica do RNAm alvo foi reduzida no grupo tratado em relação ao grupo controle (Livak & Schmittgen, 2001; Tuzmen et al., 2007). Assim, irá expressar a redução nos níveis de RNAm de nNOS obtida no grupo tratado com siRNAs (neuroblastomas transfectados com os siRNAs *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS*) quando comparado com o grupo controle negativo ou *scramble* (neuroblastomas transfectados com a sequência *scramble All-Stars[®]* negative control).

Etapa IV – Efeito dos siRNA sobre a apoptose de neuroblastomas induzida por neomicina

Os efeitos fenotípicos dos siRNAs sobre a apoptose de neuroblastomas foram determinados por ensaios de viabilidade celular pelo método de MTT, conforme será descrito abaixo. Inicialmente, os neuroblastomas foram distribuídos em placas de 96 poços, na densidade de 4×10^4 células por poço contendo 200 µL de meio DMEM, em triplicata, sendo mantidos por 24h em estufa de CO₂ a 37° C. Para avaliar os

efeitos dos siRNA de acordo com o tempo de lesão, dois ensaios foram conduzidos. No primeiro ensaio denominado tratamento I, a lesão e o tratamento com siRNA foram realizados simultaneamente. Para tanto, neuroblastomas foram lesados com neomicina na concentração de 300µg/mL e tratados imediatamente após com 150 pmols de cada siRNA por 4h (estufa de CO₂ a 37° C), *exon2_hnNOS*, *exon28_hnNOS* e controle negativo *scramble*. No segundo ensaio (tratamento II), a administração do siRNA foi realizado 24h após a lesão. Assim, neuroblastomas foram incubados com o agente apoptótico neomicina na mesma concentração (300 µg/mL) por 24h e em seguida tratados com 150 pmoles de cada um dos mesmos siRNA durante 4h (estufa de CO₂ a 37° C).

Para determinação da viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de MTT (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium; Invitrogen), conforme orientações do fabricante. Tal método baseia-se na avaliação da atividade mitocondrial. Neste caso, a metabolização do MTT por enzimas desidrogenases resulta em produto de coloração roxa denominado formazan; a intensidade dessa coloração indica o grau de viabilidade celular (Vistica et al., 1991). Assim, adicionou-se 15 µL de solução de 5 mg/mL de MTT diluído em 135 µL de DMEM a cada poço, sendo o material incubado por 3h em estufa de CO₂ a 37° C. Em seguida, removeu-se o meio contendo MTT, e adicionou-se 100 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan produzidos pelas células. Os resultados foram mensurados por verificação da densidade óptica (OD) a 595 nm. A porcentagem de viabilidade das células tratadas com as diferentes estruturas de siRNA foi determinada considerando-se como referência a densidade óptica dos controles negativos - células previamente incubadas e sem tratamento com RNAi, nos mesmos tempos dos experimentos I e II.

RESULTADOS

O atual projeto desenvolveu metodologia para silenciamento gênico da enzima nNOS, baseado em interferência de RNA. Foram identificados alvos e testados dois siRNAs para silenciamento gênico da enzima, um deles direcionado ao exon 2 e o outro ao exon 28. A sequência de resultados experimentais que levou à obtenção destes produtos está apresentada a seguir.

1.1 Resultados de bioinformática

O resultado da consulta às informações sobre o gene de nNOS junto ao Comitê de Nomenclatura de Genes (HGNC) mostrou que o nome aprovado para este locus é *nitric oxide synthase 1 (neuronal)*, sob código de identificação única – (HGNC ID) HGNC:7872 (<http://www.genenames.org/>). Esse locus pode ser abreviado como NOS1, tendo como sinônimo nNOS. Para fins do atual estudo, a sequência NOS1 será referida pelo seu sinônimo nNOS e terá como sequência de referência junto ao NCBI aquela representada pelo código NM_000620.4 e pelo Gene ID: 4842.

O locus de nNOS foi descrito no GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/484>) como variante de transcrito 1, que assim codifica a isoforma 1 da enzima NOS, ou seja, a nNOS. As duas sequências com status de revisadas são NM_000620.4 e NP_000611.1, caracterizadas como *nitric oxide synthase, brain isoform 1*. As sequências fonte originalmente depositadas no GenBank são: AC026364, AK294435, AK307481, BC033208, BE207961 e U17327. Assim, a sequência de consenso para a região codante de nNOS ou consensus CDS (CCDS) é a CCDS41842.1. Esta sequência CCDS41842.1 foi utilizada na seleção dos alvos para interferência de RNA, conforme será descrito posteriormente.

A sequência de nucleotídeos consenso da região codante de nNOS CCDS41842.1 (4305nt) está apresentada a seguir, onde a alternância de cores entre preto e azul representa cada mudança de exon a partir do códon de início da tradução (metionina, ATG) situado no exon 2 da isoforma alfa. As isoformas de nNOS com seus respectivos códons de iniciação serão caracterizadas posteriormente.

Exon 2 ATGGAGGATCACATGTTCCGGTGTTCAGCAAATCCAGCCCAATGTCATTTCTGTTTCGTCTCTTCAAGCG
CAAAGTTGGGGGCGTGGGATTTCTGGTGAAGGAGCGGGTCAGTAGTAAGCCGCCCGTGATCATCTCTG
ACCTGATTCGTGGGGGCGCCGAGAGCAGAGTGGCCTCATCCAGGCCGGAGACATCATTCTTGGCGTC
AACGGCCGGCCCTTGGTGGACCTGAGCTATGACAGCGCCCTGGAGGTACTCAGAGGCATTGCCTCTGA
GACCCACGTGGTCTCATTCTGAGGGGCCCTGAAGGTTTCACCACGCACCTGGAGACCACCTTTACAG
GTGATGGGACCCCCAAGACCATCCGGGTGACACAGCCCTGGGTCCCCCACC AAAGCCGTGGATCTG
TCCCACCAGCCACCGCCGGCAAAGAACAGCCCTGGCAGTGGATGGGGCCTCGGGTCCCGGAATGG
GCCTCAGCATGCCTACGATGATGGGCAGGAGGCCTGGCTCAC TCCCCCATGCCAACGGCCTGGCCCCA
GGCCCCCAGGCCAGGACCCCGCAAGAAAGCAACCAGAGTCAGCAGCCTCCAAGGCAGAGGGGAGAAC
AATGAACTGCTCAAGGAGATAGAGCCTGTGCTGAGCCTTCTCACCAGTGGGAGCAGAGGGGTCAAGGG
AGGGGCACCTGCCAAGGCAGAGATGAAAGATATGGGAATCCAGGTGGACAG

Exon 3 AGATTTGGACGGCAAGTCACACAAACCTCTGCCCTCGGCGTGGAGAACGACCGAGTCTTCAATGACC
TATGGGGGAAGGGCAATGTGCCTGTCTCTCAACAACCCATATTCAGAGAAGGAGCAG

Exon 4 CCCCCACCTCAGGAAAACAGTCCCCCACAAAGAATGGCAGCCCCCTCCAAGTGTCCACGCTTCCTCAA
GGTCAAGAACTGGGAGACTGAGGTGGTTCCTCAC TGACACCCCTCCACCTTAAGAGCACATTG
Exon 5 GAAACGGGATGCACTGAGTACATCTGCATGGGCTCCATCATGCATCCTTCTCAGCATGCAAGGAGGCC
TGAAGACGTCCGCACAAAAGGACAGCTCTTCCCTCTCGCCAAAGAGTTTATTGATCAATACTATTTCAT
CAATTAAAAG
Exon 6 ATTTGGCTCCAAAGCCCACATGGAAAGGCTGGAAGAGGTGAACAAAGAGATCGACACCACTAGCACTT
ACCAGCTCAAGGACACAGAGCTCATCTATGGGGCCAAGCACGCC TGGCGGAATGCCTCGCGCTGTGTG
GGCAGGATCCAGTGGTCCAAGCTGCAG
Exon 7 GTATTCGATGCCCCGTGACTGCACCACGGCCACGGGATGTTCAACTACATCTGTAACCATGTCAAGTA
TGCCACCAACAAAAGGGAACCTCAG
Exon 8 GTCTGCCATCACCATATCCCCAGAGGACAGACGGCAAGCACGACTTCCGAGTCTGGAACCTCCAGC
TCATCCGTACGCTGGCTACAAGCAGCCTGACGGCTCCACCC TGGGGGACCCAGCCAATGTGCAGTTC
ACAGAG
Exon 9 ATATGCATACAGCAGGGCTGGAAACC GCCTAGAGGCCGCTTCGATGTCC TGCCGCTCCTGCTTCAGGC
CAACGGCAATGACCCCTGAGCTCTTCCAGATTCC TCCAGAGCTGGTGTGGAAAGTTCCCATCAGGCACC
CCAA
Exon 10 GTTTGAGTGGTTC AAGGACCTGGGGCTGAAGTGGTACGGCCTCCCCGCCGTGTCCAACATGCTCCTAG
AGATTGGCGGCC TGGAGTTCAGCGCCTGTCCCTTCAGTGGCTGGTACATGGGCACAGAGATTGGTGTG
CGCGACTACTGTGACAACTCCCGCTACAATATCCTGGAG
Exon 11 GAAGTGGCCAAGAAGATGAAC TTAGACATGAGGAAGACGTCTCCCTGTGGAAGGACCAGGCGCTGGT
GGAGATCAATATCGCGGTTCTCTATAGCTTCCAG
Exon 12 AGTGACAAAAGTGACCATTGTTGACCATCAC TCCGCCACCGAGTCC TTCATTAAGCACATGGAGAATGA
GTACCCTGCGGGGGGGCTGCCCTGCCGACTGGGTGTGGATCGTGCCCCCATGTCCGGAAGCATCA
CCCCTGTGTTCACCAGGAGATGCTCAACTACCGGCTCACCCCTCCTTCGAATACCAG
Exon 13 CCTGATCCCTGGAACACGCATGTCTGGAAGGCACCAACGGGACCCCACAAAGCGGCGAGCCATTGG
CTTCAAGAAGCTAGCAGA
Exon 14 AGCTGTCAAGTTC TCGGCCAAGCTGATGGGGCAGGCTATGGCCAAGAGGGTGAAGCGACCATCCTCT
ATGCCACAGAGACAGGCAAATCGCAAGCTTATGCCAAGACCTTGTGTGAGATCTTCAAACACGCCTTT
GATGCCAAG
Exon 15 GTGATGTCCATGGAAGAATATGACATTGTGCACCTGGAACATGAAACTCTGGTCTTGTGGTACCAG
CACCTTTGGCAATGGAGATCCCCCTGAGAATGGGGAG
Exon 16 AAATTCGGCTGTGCTTTGATGGAAATGAGGCACCCCAACTCTGTGCAGGAAGAAAGGAA
Exon 17 GAGCTACAAGGTCCGATTCAACAGCGTCTCCTCCTACTCTGACTCCCAAAAATCATCAGGCGATGGGC
CCGACCTCAGAGACAACTTTGAGAGTGTGGACCCCTGGCCAATGTGAG
Exon 18 GTTCTCAGTTTTTTGGCCTCGGCTCACGAGCATACCCTCAC TTTTGGCCTTCGGACACGCTGTGGACA
CCCTCCTGGAAGAACTGGGAGGGGAGAGGATCCTGAAGATGAGGGAAGGGGATGAGCTCTGTGGGCAG
GAAGAGGCTTTCAGGACCTGGGCCAAGAAGTCTTCAAG
Exon 19 GCAGCCTGTGATGTCTTCTGTGTGGGAGATGATGTCAACATTGAAAAGGCCAACAATTCCCTCATCAG
CAATGATCGCAGCTGGAAGAGAAACAAGTTCCGCC TCACTTTGTGGCCGAAGCTCCAGAACTCACAC
AAG
Exon 20 GTCTATCCAATGTCCACAAAAGCGAGTCTCAGCTGCCCGGCTCCTTAGCCGTCAAACCTCCAGAGC
CCTAAATCCAG
Exon 21 TCGGTCAACTATCTTCGTGCGTCTCCACACCAACGGGAGCCAGGAGCTGCAGTACCAGCCTGGGGACC
ACCTGGGTGTCTTCCCTGGCAACCACGAGGACCTCGTGAATGCCCTGATCGAGCGGCTGGAGGACCGG
CCGCTGTCAACCAGATGGTGAAAGTGGAACTGCTGGAGGAGCGGAACACGGCTTTAG
Exon 22 GTGTCATCAGTAACTGGACAGACGAGCTCCGCC TCCCGCC TGCACCATCTTCCAGGCCTTCAAGTAC
TACCTGGACATCACCACGCCACCAACGCCCTGCAGCTGCAGCAGTTTGCC TCCCTAGCTACCAGCGA
GAAGGAGAAGCAGCGTCTGCTGGTCTCAGCAAG
Exon 23 GGTTCGAGGAGTACGAGGAATGGAAATGGGGCAAGAACCCACCATCGTGGAGGTGCTGGAGGAGTT
CCCATCTATCCAGATGCCGGCCACCC TGTCTGACCCAGCTGTCCCTGCTGCAGCCCCGCTACTATT
CCATCAGCTCCTCCCCAGACATGTACCCTGATGAAGTGCACCTCAC TGTGGCCATCGTTTTCTACC GC
ACTCGAG
Exon 24 ATGGAGAAGGACCAATTCACCACGGCGTATGCTCCTCCTGGCTCAACCGGATACAGGCTGACGAACTG
GTCCCCTGTTTCGTGAGAGG
Exon 25 AGCACCAGCTTCCACCTGCCCGGAACCCCAAGTCCCTGCATCCTCGTTGGACCAGGCACCGGCA
TTGCCCTTTCCGAAGCTTCTGGCAACAGCGGCAATTTGATATCCAACACAAAG
Exon 26 GAATGAACCCCTGCCCATGGTCC TGGTCTTCGGGTGCCGGCAATCCAAGATAGATCATATCTACAGG
GAAGAGACCC TGCAGGCCAAGAACAAGGGGGTCTT CAGAGAGCTGTACACGGCTTACTCCCGGGAGCC
AGACAAAACCAAAG

Exon 27 AAGTACGTGCAGGACATCCTGCAGGAGCAGCTGGCGGAGTCTGTGTACCGAGCCCTGAAGGAGCAAGG
 GGGCCACATATACGTCTGTGGGGACGTCACCATGGCTGCTGATGTCCCAAAGCCATCCAGCGCATCA
 TGACCCAGCAGGGGAAGCTCTCGGCAGAGGACGCCGGCGTATTCATCAGCCGGATGAGG
Exon 28 GATGACAACCGATACCATGAGGATATTTTTGGAGTCACCCGCGAACGTACGAAGTGACCAACCGCCT
 TAGATCTGAGTCCATTGCC TTCATTGAAGAGAGCAAAAAAGACACCGATGA
Exon 29 GGTTTTTCAGCTCCTAA

Figura 3. Exons e respectivos nucleotídeos da região codante da seqüência de referência CCDS41482.1.

Essa seqüência codante de nNOS apresenta 4305 nucleotídeos que são traduzidos em uma proteína de 1434 aminoácidos.

A análise de similaridade genética entre seqüências representativas de nNOS citadas acima foi realizada pelo algoritmo de alinhamento de seqüências múltiplas ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e está apresentada no anexo II. Para fins de simplificação, foram apresentadas seqüências da região codante, que foi a região utilizada para seleção dos alvos de RNAi. Verificou-se que as seqüências de nNOS são conservadas, encontrando-se apenas algumas mutações de um único nucleotídeo e que estão localizadas em regiões distintas daquelas utilizadas para interferência de RNA. Como exemplos de mutações observadas, pode-se citar: AK307481.1, três mutações (A→G; C→T; C→T); AK294435.1, três mutações (G→T; A→T; T→C) e; U17327.1, uma mutação (T→C).

1.2 Resultados de extração de RNA, transcrição reversa e *primers*

Todas as etapas de cultivo celular e transfecção foram devidamente padronizadas, possibilitando condições adequadas para os testes de silenciamento gênico de nNOS em neuroblastomas.

A extração do RNA total dos neuroblastomas via kits comerciais apresentou bom rendimento, obtendo-se concentrações próximas de 50 ng/μL. Essa concentração possibilitou iniciar a transcrição reversa com quantidade satisfatória de RNA, ou seja, 250 ng. Conforme apresentado na figura 3, o RNA apresentou integridade satisfatória. Podem ser visualizadas as bandas de RNA ribossomal 18S e 28S, com 1900 e 4800 nucleotídeos, respectivamente, bem como ausência de rastro de degradação ou *smear*.

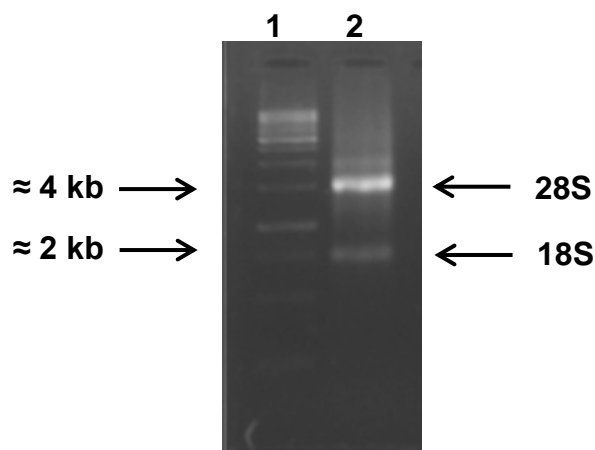


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo representativo de ensaio de extração de RNA. Canaleta 1, marcador de massa molecular 1KB *size marker* DNA Ladder (Real Biotech Corporation); canaleta 2, amostra de RNA extraído de cultivos celulares.

A transcrição reversa (RT) via oligo(dT) também foi bem sucedida. Os controles negativos desta etapa - transcrições reversas realizadas sem a enzima transcriptase reversa, mostraram resultados de amplificação tardios, indicando que essas amostras não continham quantidade de DNA genômico suficiente para afetar os resultados de qPCR.

Quanto aos *primers* para amplificação de nNOS e dos genes endógenos no método de qPCR, todos apresentaram resultados de amplificação positivos. Porém, os *primers* nNOS_human, hACTB e GAPDH apresentaram menores valores de CT e maior reprodutibilidade inter-ensaios, razão pela qual foram selecionados para esse estudo.

1.3 Resultados de silenciamento gênico de nNOS

Os siRNAs *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS* causaram silenciamento gênico da enzima nNOS, em ambas as concentrações testadas - 150 pmol e 300 pmol. Esse resultado foi determinado por qPCR e expresso na forma de quantificação relativa.

Os resultados foram organizados de acordo com as doses e estruturas de siRNA, e normalizados pelo controle negativo *scramble* (Figuras 4, 5, 6 e 7). Os dados mostram que as estruturas em teste causam aceleração da taxa de

decaimento do RNAm de nNOS, no intervalo de 0,6 a 0,8 vezes o valor do controle negativo. Ou seja, foi possível reduzir para até 60% a quantidade do RNAm desta enzima via interferência de RNA.

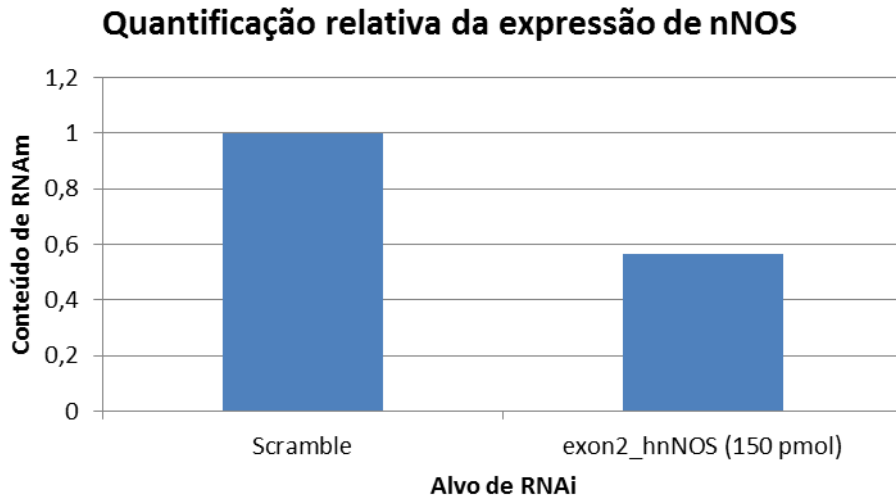


Figura 5. Redução do conteúdo do RNA mensageiro de nNOS por siRNA. Culturas de neuroblastomas humano da linhagem SH-SY5Y foram transfectadas com 150 pmol do siRNA estruturado em lipossoma catiônico. O conteúdo de RNAm foi normalizado em relação ao controle negativo *scramble*. O nível de nNOS foi determinado no tempo de 24h, em triplicata, sendo expresso pelo método da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Scramble All-Stars® negative control siRNA (Qiagen); *exon2_hnNOS* – siRNA sintético em dupla fita, direcionado a sequência do RNAm de nNOS codificada pelo exon 2.

Quantificação relativa da expressão de nNOS

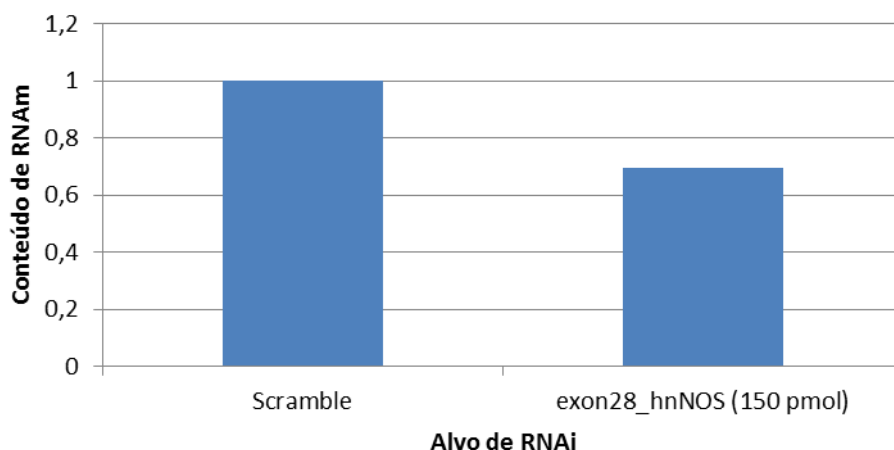


Figura 6. Redução do conteúdo do RNA mensageiro de nNOS por siRNA. Culturas de neuroblastomas humano da linhagem SH-SY5Y foram transfectadas com 150 pmol do siRNA estruturado em lipossoma catiônico. O conteúdo de RNAm foi normalizado em relação ao controle negativo *scramble*. O nível de nNOS foi determinado no tempo de 24h, em triplicata, sendo expresso pelo método da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Scramble All-Stars[®] negative control siRNA (Qiagen); *exon28_hnNOS* – siRNA sintético em dupla fita, direcionado a sequência do RNAm de nNOS codificada pelo exon 28.

Quantificação relativa da expressão de nNOS

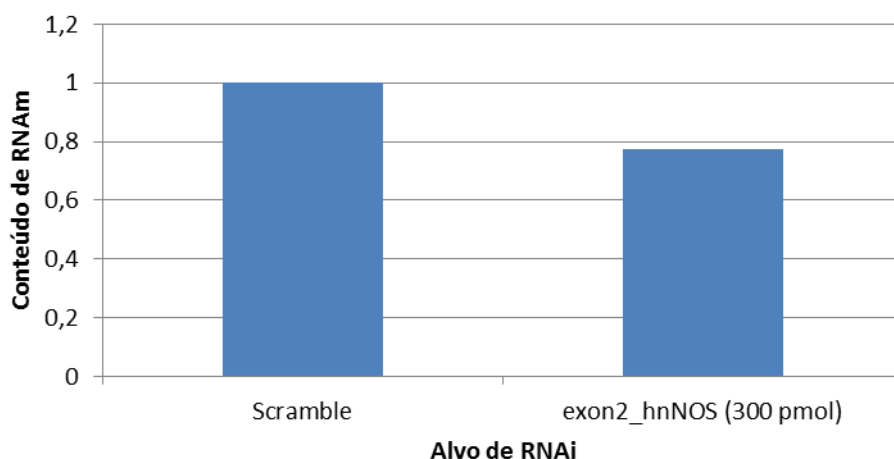


Figura 7. Redução do conteúdo do RNA mensageiro de nNOS por siRNA. Culturas de neuroblastomas humano da linhagem SH-SY5Y foram transfectadas com 300 pmol do siRNA estruturado em lipossoma catiônico. O conteúdo de RNAm foi normalizado em relação ao controle negativo *scramble*. O nível de nNOS foi determinado no tempo de 24h, em triplicata, sendo expresso pelo método da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Scramble All-Stars[®] negative control siRNA (Qiagen); *exon2_hnNOS* – siRNA sintético em dupla fita, direcionado a sequência do RNAm de nNOS codificada pelo exon 2.

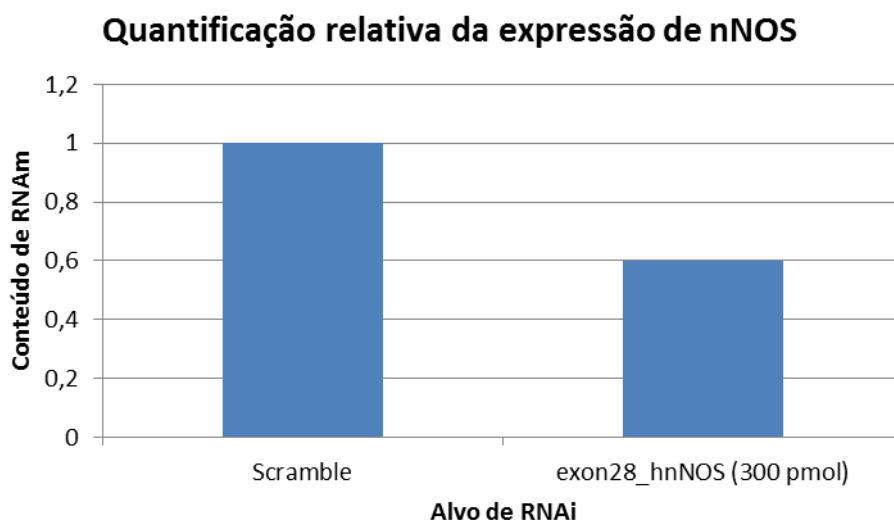


Figura 8. Redução do conteúdo do RNA mensageiro de nNOS por siRNA. Culturas de neuroblastomas humano da linhagem SH-SY5Y foram transfectadas com 300 pmol do siRNA estruturado em lipossoma catiônico. O conteúdo de RNAm foi normalizado em relação ao controle negativo *scramble*. O nível de nNOS foi determinado no tempo de 24h, em triplicata, sendo expresso pelo método da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Scramble All-Stars[®] negative control siRNA (Qiagen); *exon28_hnNOS* – siRNA sintético em dupla fita, direcionado a sequência do RNAm de nNOS codificada pelo exon 28.

1.4 Efeitos dos siRNA sobre a apoptose de neuroblastomas induzida por neomicina

De acordo com os resultados descritos no item anterior, as estruturas de siRNA *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS* promoveram decaimento dos níveis de RNAm de nNOS para valores de até 60% e 80% dos níveis do controle negativo. O presente ensaio foi realizado para verificar se este silenciamento gênico seria capaz de produzir efeitos fenotípicos, ou seja, redução da apoptose de neuroblastomas lesados com neomicina. Nesse sentido, os dois ensaios de MTT realizados mostraram que os siRNAs promovem redução da apoptose celular. O valor máximo de queda na apoptose celular foi de 28,7%, variando de acordo com o siRNA utilizado (*exon2_hnNOS* ou *exon28_hnNOS*) e com o ponto temporal do tratamento, imediatamente após a lesão ou 24h após a lesão (Tabela 3).

Tabela 3. Ensaio de MTT para determinação da viabilidade de neuroblastomas lesados com neomicina e tratados com siRNA.

siRNA	Tratamento I*	Tratamento II**
	Viabilidade celular (%)	Viabilidade celular (%)
<i>Exon2_hnNOS</i>	14,8%	7,8%
<i>Exon28_hnNOS</i>	5,9%	28,7%
<i>Scramble</i>	-15,8%	-5,2%

*Neuroblastomas lesados com neomicina e tratados com siRNA imediatamente após a lesão.

**Neuroblastomas lesados com neomicina e tratados com siRNA 24h após a lesão.

DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou a eficácia de duas estruturas de RNA interferente curto e em dupla fita – aqui denominadas de *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS* para silenciamento gênico da enzima NO sintase neuronal - nNOS. O efeito silenciador ocorreu em ambos os alvos, um deles situado no exon 2 e o outro no exon 28, e foi identificado nas duas concentrações de RNAi testadas, 150 pmol e 300 pmol. Em termos de nível de silenciamento, o conteúdo de RNAm de nNOS no grupo tratado foi reduzido para até 60% daquele observado no grupo controle.

O NO e a sua enzima nNOS têm sido intensamente investigados sob dois paradigmas essencialmente importantes na neurociência – aquele mais científico, que investiga a fisiopatologia dos distúrbios neurodegenerativos, e o outro mais tecnológico e pragmático, que trata do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Considerando que o atual projeto buscou silenciar a expressão de nNOS em células neuronais, ambos os paradigmas são relevantes e constituem-se nos eixos temáticos da presente discussão.

O NO tem participação relevante na patogênese de várias doenças, atuando como radical livre altamente reativo. Trata-se do melhor exemplo de mensageiro

intracelular que apresenta propriedades tanto citotóxicas quanto citoprotetoras, aspecto que tem impulsionado pesquisas para melhor elucidar o seu papel no processo saúde-doença (Heales et al., 1999; Domenico, 2004). Neste sentido, há evidências de que as enzimas de síntese de NO – NOS, participem dos eventos celulares que levam à morte neuronal e, conseqüentemente, da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas (Conforti et al., 2007; Hara et al., 2007). Quanto ao objeto do atual estudo – a enzima nNOS, vários estudos mostram que sua expressão está aumentada em distúrbios neurológicos, tais como o acidente vascular cerebral, Parkinson, Alzheimer e esclerose amiotrófica lateral (Hunot et al., 1996; Love, 1999; Simic et al., 2000; Catania et al., 2001). A regulação da transcrição do gene de nNOS é altamente complexa, havendo promotores situados na região não traduzida (UTR) do exon 2 com sítios de ligação para CREB (cAMP response element-binding protein) e AP1 (activator protein 1). Esses fatores de transcrição CREB / AP1 que regulam a expressão de nNOS podem ser ativados por várias moléculas, incluindo db-cAMP (dibutilil-cAMP), bFGF (basic fibroblast growth factor), ácido valpróico, entre outros (Bros et al., 2007; Luo & Zhu, 2011). Na medida em que os siRNA *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS* obtidos no presente estudo mostraram capacidade de silenciar a enzima nNOS, poderão contribuir para novas investigações sobre a participação dessa enzima na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, distinguindo papéis entre a isoforma alfa e o conjunto das demais isoformas.

Diante do fato de que as enzimas NOS participam da patogênese da morte neuronal, vários estudos foram realizados para avaliar se inibidores farmacológicos teriam efeito neuroprotetor. O inibidor da enzima nNOS NG-nitro-L-arginine (L-NOARG), por exemplo, foi capaz de reverter eventos neurodegenerativos induzidos pela injeção intra-estriatal da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos (Gomes et al., 2008). A grande desvantagem de inibidores não-seletivos de NOS (L-NOARG, N-nitro-L-arginina metil ester - L-NAME) é o risco de causarem efeitos colaterais graves. Destaca-se aqui o aumento da pressão arterial e a elevação da resistência vascular periférica, acompanhados das respectivas conseqüências funcionais e estruturais do quadro hipertensivo (Török, 2008). Nesse sentido, foi dada grande atenção para a busca de inibidores seletivos da isoforma neuronal da enzima - nNOS, que assim teriam efeito protetor contra a degeneração de células

nervosas, sem causar efeitos hipertensivos – devido à inibição de eNOS, ou problemas sobre o sistema imune – devido à inibição de iNOS (Haitao et al., 2009; Yu et al., 2011). Apesar da vantagem de apresentarem menores efeitos colaterais, alguns compostos seletivos para nNOS são altamente polares, o que dificulta a penetração na barreira hemato-encefálica e, conseqüentemente, limita o seu emprego no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central (Silverman, 2009). Cabe ainda ressaltar que esses fármacos são inibidores de nNOS, ou seja, a inibição enzimática afetará os três variantes de *splicing* da enzima, que podem ter papéis diferenciados no desenvolvimento do processo neurodegenerativo. Nesse sentido, o atual estudo apresenta a possibilidade de silenciamento específico do variante de *splicing* alfa de nNOS, via o siRNA *exon2_hnNOS*, sem afetar os demais variantes que estão dispersos no citoplasma celular e podem ter papéis relevantes para a biologia da célula nervosa.

O silenciamento gênico mediado por interferência de RNA (RNAi) tem impulsionado novas descobertas sobre a função de genes de interesse, trazendo assim contribuição significativa para a ciência e o desenvolvimento tecnológico no campo das ciências biológicas e da saúde (Fire et al., 1998; Gupta et al., 2004; Bushati & Cohem, 2007; Gonzales-Alegre & Paulson, 2007). Não há consenso sobre o mecanismo de ação que resulta em RNAi, mas sabe-se que: 1. O evento ocorre em nível pós-transcricional no citoplasma da célula; 2. Depende do pareamento de bases entre a fita *guide* do RNA interferente e a sequência complementar do RNAm alvo e; 3. Há participação de sistemas enzimáticos específicos, em particular o *RNA-induced silencing complex* - RISC (Meister & Tuschl, 2004; Zimmerman et al., 2006; Carthew & Sontheimer, 2009; Jinek & Doudna, 2009). Nesse sentido, estudos prévios utilizaram a metodologia de RNAi para silenciamento de nNOS. O silenciamento gênico de nNOS em áreas cerebrais já foi realizado utilizando-se vetores reguláveis e microRNAs (Liu et al., 2010). Outro estudo utilizou vetores lentivirais para silenciamento de nNOS em áreas cerebrais do rato, direcionados ao exon 10 da enzima (Mahairaki et al., 2009). Até onde o nosso conhecimento alcança, os resultados aqui apresentados são totalmente inéditos, ou seja, trata-se da primeira descrição de silenciamento gênico de nNOS via siRNA sintéticos em células de neuroblastomas. Nossos resultados mostram que os efeitos variam em função do alvo silenciado pelos siRNAs *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS*, respectivamente

presentes nos exons 2 e 28. Também foi observada diferença no silenciamento quanto às concentrações de siRNA utilizadas, 150 e 300 pmol. Esse tipo de variação de resultados já foi descrito em publicações anteriores, a exemplo do silenciamento do canal de potássio dependente de voltagem Eag1 (Weber et al., 2006).

Apoptose neuronal é caminho comum para a morte de neurônios em diversas doenças neurodegenerativas, havendo consenso quanto à participação do óxido nítrico neste fenômeno celular. A sequência de eventos que culmina na apoptose inicia-se com a ativação do receptor de NMDA, o que desencadeia aumento do cálcio intracelular. O cálcio leva à ativação da nNOS situada em sua proximidade, com conseqüente síntese de NO. NO atua como mensageiro intracelular, ativa a guanilato ciclase e participa de vias de transdução de sinais que envolvem guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Além disto, NO liga-se à citocromo c oxidase, sendo capaz de inibir a respiração celular, e também levar à liberação de ânions peróxido da cadeia respiratória mitocondrial (Moncada & Bolaños, 2006; Luo & Zhu, 2011). Portanto, o silenciamento de nNOS passa a ter impacto significativo sobre o controle da apoptose neuronal, o que motivou a realização do atual estudo. Entre as contribuições mais relevantes do atual trabalho está a descoberta do efeito antiapoptótico dos siRNAs *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS*. Nossos resultados mostram que é possível reduzir a apoptose neuronal em até 28,7% mediante o uso desta metodologia, e que a morte neuronal pode ser atenuada pelos siRNA quando administrados no momento da lesão ou, também, 24h após a sua ocorrência.

Ainda sobre a temática da morte neuronal, estudo anterior verificou aumento da expressão das três isoformas da enzima NO sintase – nNOS, eNOS e iNOS, em células neuronais do sistema nervoso central de ratos após lesão com a neurotoxina ácido quinolínico, a qual ativa o receptor de NMDA (Aguilera et al., 2007). Esse mesmo estudo mostrou que as curvas temporais de expressão gênica variam de acordo com a isoforma (nNOS, eNOS ou iNOS), o que pode indicar papéis diferenciados no desenvolvimento da degeneração nervosa. Especificamente quanto à enzima nNOS, quatro principais variantes de *splicing* funcionais já foram descritos – nNOS- α , nNOS- β , nNOS- γ e nNOS- μ . Evidências indicam que há diferenças na atividade destes variantes, em função de sua localização nos compartimentos da célula neuronal. O aspecto mais significativo refere-se à presença do exon 2 na variante alfa. Esse exon codifica o domínio PDZ, que ancora

a nNOS- α em região da membrana plasmática neuronal próxima ao receptor de NMDA (ácido N-metil D aspártico). Conforme citado, trata-se de receptor acoplado a canal de cálcio e ativado por aminoácidos excitatórios. O influxo de cálcio através deste receptor causa rápida ativação da isoforma alfa de nNOS situada na sua proximidade, e conseqüente formação de óxido nítrico. Os demais variantes de *splicing* - nNOS- β e nNOS- γ não contém o exon 2 que codifica este domínio de ancoragem, permanecendo assim livres no citoplasma celular (Alderton, 2001; Kavia et al., 2006). Essa característica funcional da ativação da isoforma alfa, dependente do receptor de NMDA, pode estar relacionada com as diferenças de efeitos observadas entre os siRNA *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS* nos dois tratamentos, imediatamente após a lesão ou 24h após esse evento. O siRNA *exon2_hnNOS*, que silencia apenas a isoforma alfa, apresentou maior efeito antiapoptótico quando administrado imediatamente após a lesão (14,8%). Já a estrutura *exon28_hnNOS*, que silencia as três isoformas de nNOS, alfa, beta e gama, foi a mais eficaz quando administrada 24h após a lesão, reduzindo a morte neuronal em 28,7%.

CONCLUSÕES

Concluindo, o presente estudo obteve e testou duas sequências de siRNA em dupla fita, que mostraram capacidade de silenciar a enzima nNOS e de reverter a apoptose de neuroblastomas induzida por neomicina. Esse resultado vincula a expressão da enzima nNOS com o fenômeno da neurodegeneração e apresenta, além disso, uma nova ferramenta com potencial terapêutico, focada em silenciamento gênico via siRNAs. Projetos futuros poderão clarificar as vias de apoptose que foram comprometidas após o silenciamento de nNOS e, no sentido tecnológico, avançar nos testes em modelos animais de doenças neurodegenerativas. Esses ensaios permitirão determinar se os efeitos antiapoptóticos ocorrem também *in vivo* e se os siRNAs apresentam algum efeito indesejado sobre o sistema nervoso ou sobre a resposta imune dos animais.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, P.; CHÁNEZ-CÁRDENAS, M.E.; FLORIANO-SÁNCHEZ, E; BARRERA, D.; SANTAMARÍA, A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, D.J.; PÉREZ-SEVERIANO, F.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; JIMÉNEZ, P.D. Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. **Neurotoxicology**, n.28, p. 1200-1207, 2007.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, n.357, p.593-615, 2001.
- BUSHATI, N.; COHEN, S. M. MicroRNA Functions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, n.23, p.175–205, 2007.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, n. 25 (2), p. 169-193, 2000.
- BROS, M.; BOISSEL, J. P.; GÖDTEL-ARMBRUST, U.; FÖRSTERMANN U. The untranslated region of exon 2 of the human neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene exerts regulatory activity. **Gene**, n. 405 (1-2), p. 36-46, 2007.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNA and siRNA. **Cell**, n.136, p.642-655, 2009.
- CATANIA, M.V.; ARONICA, E.; YANKAYA, B.; TROOST, D., Increased expression of neuronal nitric oxide synthase spliced variants in reactive astrocytes of amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord. **The Journal of Neuroscience**, n. 21, p. RC148, 2001.
- CONFORTI, L.; ADALBERT, R.; COLEMAN, M.P. Neuronal death: where does the end begin. **Trends in Neuroscience**, n. 30, p. 15-66, 2007.
- DOMENICO, R. Pharmacology of Nitric Oxide: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Current.Pharmaceutical Design**, v.10, n.14. p.1667-1676,2004. [PubMed: 15134564].
- DÖTSCH, J.; HARMJANZ, A.; CHRISTIANSEN, H.; HÄNZE, J.; LAMPERT, F.; RASCHER, W. Gene expression of neuronal nitric oxide synthase and adrenomedullin in human neuroblastoma using real-time PCR. **International Journal of Cancer**, n. 88, p. 172-175, 2000.

- ELIASSON, M. J. L.; BLACKSHAW, S.; SCHELL, M. J.; SNYDER, S. H. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.94, p.3396-3401, 1997).
- FIRE, A. Z. Gene silencing by double-stranded RNA. **Cell Death and Differentiation**, n.12, p. 1998-2012, 1998.
- GOMES, M.Z.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL BEL, E. A. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. **Brain Research**, n.1203, p.160-169, 2008.
- GONZALES-ALEGRE, P. Technology insight: therapeutic RNA interference – how far from the neurology clinic? **Nature Clinical Practice. Neurology**, n.3, p.394-404, 2007.
- GUNNINGHAM, S. P.; CURRIE, M. J.; MORRIN, H. R.; TAN, E. Y.; TURLEY, H.; DACHS, G. U.; WATSON, A. I.; FRAMPTON, C.; ROBINSON, B. A.; FOX, S. B. The angiogenic factor thymidine phosphorylase up-regulates the cell adhesion molecule P-selectin in human vascular endothelial cells and is associated with P-selectin expression in breast cancers. **The Journal of Pathology**, n. 212, p. 335–344, 2007.
- GUPTA, S.; SCHOER, R. A.; EGAN, J. E.; HANNON, G. J.; MITTAL, V. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.101, p.1927–1932, 2004.
- HAITAO, Ji; HUIYING, Li; MARTÁSEK, P.; ROMAN, L.J.; POULOS, T.L.; SILVERMAN, R.B. Discovery of highly potent and selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase by fragment hopping. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, n.3, p,779–797, 2009.
- HAJERI, P.; SINGH S. K. siRNAs: their potential as therapeutic agents. Designing siRNAs. **Drug Discovery Today**, n.14, p.851-858, 2009.
- HARA, M.R.; SNYDER, S.H. Cell signaling and neuronal death. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, n.47, p.117-141, 2007.
- HEALES, S.J.; BOLANOS, J.P.; STEWART, V.C.; BROOKES, P.S.; LAND, J.M.;

- CLARK, J.B. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochimica et Biophysica Acta.**, n. 1410, p. 215–228, 1999.
- HUESKEN, D.; LANGE, J.; MICKANIN, C.; WEILER, J.; ASSELBERGS, F.; WARNER, J.; MELOON, B.; ENGEL, S.; ROSENBERG, A.; COHEN, D.; LABOW, M.; REINHARDT, M.; NATT, F.; HALL, J. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. **Nature Biotechnology**, n.23, p.995-1001, 2005.
- HUGHES, J.; YADAVA, P.; MESAROS, R. Liposomal siRNA Delivery. In: Liposomes, **V. Methods in Molecular Biology**, vol. 605, c. 31, p. 445-459, 2010.
- HUNOT, S.; BOISSIÈRE, F.; FAUCHEUX, B.; BRUGG, B.; MOUATT-PRIGENT, A.; AGID, Y.; HIRSCH, E. C. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Neuroscience**, n. 72, p. 355–363, 1996.
- JINEK, M.; DOUDNA, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. **Nature**, n.457, p.405-412, 2009.
- KAVYA, R.; SALUJA, R.; SINGH, S.; DIKSHIT, M. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. **Nitric Oxide**, n.15, p.280-294, 2006.
- LIU, B.; XU, H.; PATON, J. F.; KASPAROV, S. Cell- and region-specific miR30-based gene knock-down with temporal control in the rat brain. **BMC Molecular Biology**, 11:93, 2010.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, n.25, p.402–408, 2001.
- LOVE, S. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain Pathology**, n 9, p. 119–131, 1999.
- LUO, C. X.; ZHU, D. Y. Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase. **Neuroscience Bulletin**, n. 27(1), p. 23-35, 2011.
- MAHAIRAKI, V.; XU, L.; FARAH, M. H.; HATFIELD, G.; KIZANA, E.; MARBÁN, E.; KOLIATSOS, V. E. Targeted knock-down of neuronal nitric oxide synthase expression in basal forebrain with RNA interference. **Journal of Neuroscience Methods**, n. 179(2), p. 292-299, 2009.
- MATVEEVA, O.; NECHIPURENKO, Y.; ROSSI, L.; MOORE, B.; SAETROM, P.;

- OGURTSOV, A. Y.; ATKINS, J. F.; SHABALINA, S. A. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. **Nucleic Acids Research**, n.35, p.63, 2007.
- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double stranded RNA. **Nature**, n.431. p.343-349, 2004.
- MONCADA, S.; BOLAÑOS, J. P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, n.97(6), p.1676-1689, 2006.
- NABISSI, M.; MORELLI, M. B.; AMANTINI, C.; FARFARIELLO, V.; RICCI-VITIANI, L.; CAPRODOSSI, S.; ARCELLA, A.; SANTONI, M.; GIANGASPERO, F.; DE MARIA, R.; SANTONI, G. TRPV2 channel negatively controls glioma cell proliferation and resistance to Fas-induced apoptosis in ERK-dependent manner. **Carcinogenesis**, n. 31(5), p. 794-803, 2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SILVERMAN, R. B. Design of selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases. **Accounts of Chemical Research**., v.42, n.3, p. 439–451, march, 2009.
- SIMIC, G.; LUCASSEN, P. J.; KRSNIK, Z.; KRUSLIN, B.; KOSTOVIC, I.; WINBLAD, B.; BOGDANOVI. nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. **Experimental Neurology**, n. 165, p. 12–26, 2000.
- THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C. H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C. A.; HARRIS, C. C.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, n.1, p.18–31, 2008.
- TORCHILIN. Recent advances of liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews. Drug Discovery**, n.4, p.145, 2005.
- TÖRÖK, J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. **Physiological Research**, v. 57, p. 813-825, 2008.
- TUZMEN, S.; KIEFER, J.; MOUSSES, S. Validation of short interfering RNA knockdowns by quantitative real-time PCR. **Methods in Molecular Biology**,

n.353, p.177-203, 2007.

- VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, n.44 (5), p. 619-626, 2008.
- VISTICA, D. T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M. R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Research**, n. 51(10), p. 2515-2520, 1991.
- WEBER, C.; MELLO DE QUEIROZ, F.; DOWNIE, B. R.; SUCKOW, A.; STÜHMER, W.; PARDO, L. A. Silencing the activity and proliferative properties of the human Eagl Potassium Channel by RNA Interference. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 13033-13037, 2006.
- YU, L.; DERRICK, M.; JI, H.; SILVERMAN, R. B.; WHITSETT, J.; VÁSQUEZ-VIVAR, J.; TAN, S. Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents Cerebral Palsy following Hypoxia-Ischemia in Fetal Rabbits: Comparison between JI-8 and 7-Nitroindazole. **Developmental Neuroscience**, n.10, Jun 2011.
- ZHAO, M.; YANG, H.; JIANG, X.; ZHOU, W.; ZHU, B.; ZENG, Y.; YAO, K.; REN, C Lipofectamine RNAiMAX: an efficient siRNA transfection reagent in human embryonic stem cells. **Molecular Biotechnology**, n.40, p.19-26, 2008.
- ZHOU, L.; ZHU, D. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide**, n.20, p.223-230, 2009.
- ZIMMERMANN, T.S.; LEE, A. C.; AKINC, A.; BRAMLAGE, B.; BUMCROT, D.; FEDORUK, M. N.; HARBORTH, J.; HEYES, J. A.; JEFFS, L. B.; JOHN, M.; JUDGE, A. D.; LAM, K.; MCCLINTOCK, K.; NECHEV, L. V.; PALMER, L. R.; RACIE, T.; RÖHL, I.; SEIFFERT, S.; SHANMUGAM, S.; SOOD, V.; SOUTSCHEK, J.; TOUDJARSKA, I.; WHEAT, A. J.; YAWORSKI, E.; ZEDALIS, W.; KOTELIANSKY, V.; MANOHARAN, M.; VORNLOCHER, H. P.; MACLACHLAN, I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. **Nature**, n.441, p.111–114, 2006.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

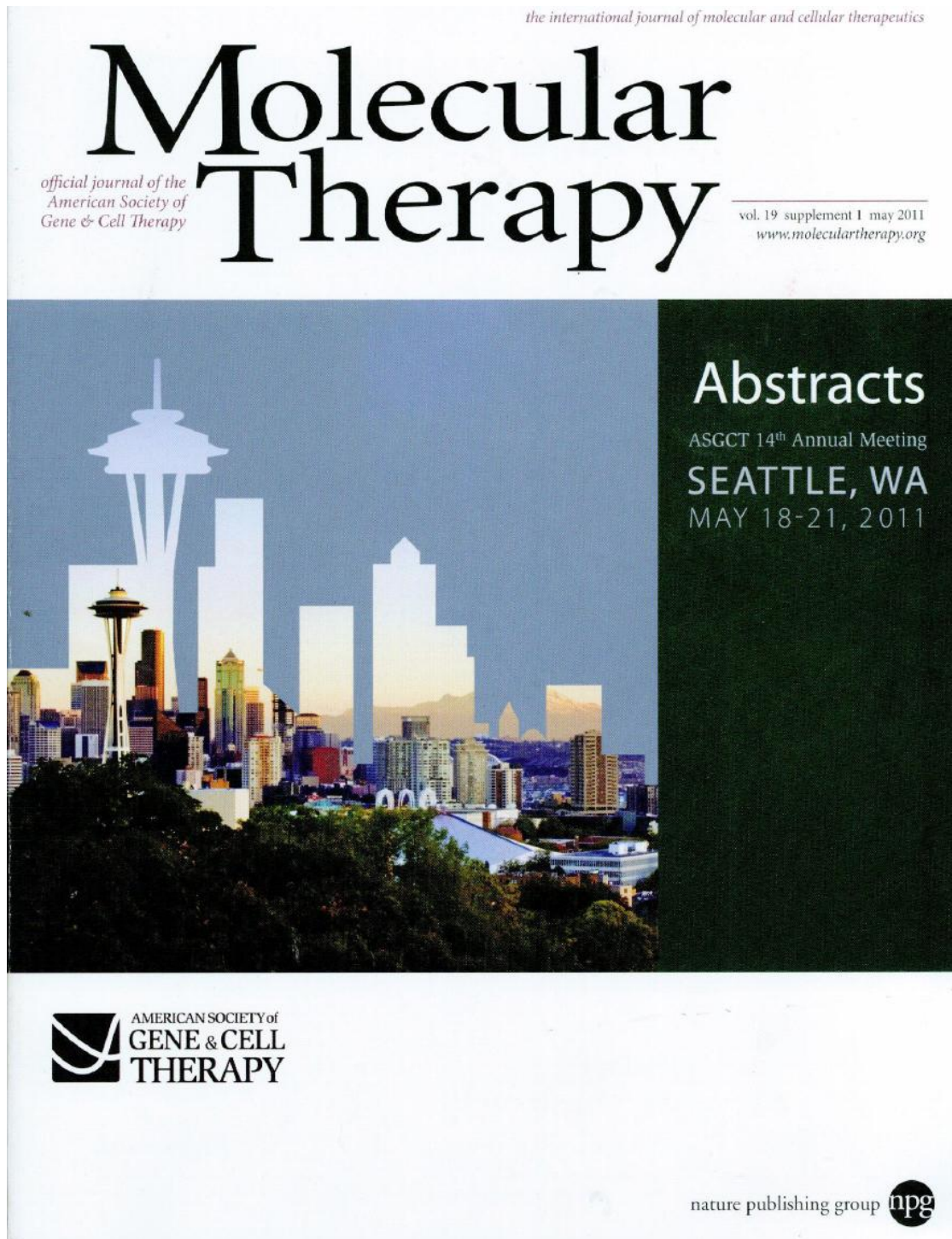
O uso das estruturas de siRNA *exon2_hnNOS* e *exon28_hnNOS* possibilitou o silenciamento gênico da enzima NO sintase neuronal em neuroblastomas. Estas mesmas estruturas mostraram efeitos anti-apoptóticos em neuroblastomas lesados com neomicina. Considerando-se que o silenciamento da enzima nNOS reduziu a apoptose neuronal, infere-se que a via nitrérgica participa da cascata de eventos que culmina com a morte neuronal.

Os resultados do presente estudo evidenciam o grande potencial da utilização da interferência de RNA para investigações sobre a biologia da célula neuronal e sobre a patogênese de doenças neurodegenerativas. Estudos posteriores poderão elucidar quais vias de apoptose celular foram afetadas pelo silenciamento da enzima nNOS. Por fim, os resultados aqui obtidos abrem caminhos para novos testes em modelos de doenças neurodegenerativas, estimulando o desenvolvimento de produtos biotecnológicos inovadores e com potencial de mercado, baseados em interferência de RNA sobre alvos da via nitrérgica.

ANEXOS

Anexo I

i. Resumo publicado no congresso *ASGCT 14^o Annual Meeting*, ocorrido em Seattle, WA de 18 a 21 de maio de 2011



851. Silencing the Expression of the alpha Isoform of the Neuronal Nitric Oxide Synthase Enzyme (nNOS) in Neuroblastoma Cells by Synthetic Double-Stranded siRNA

Linus Q. Pereira,¹ Luciana M. Klüppel,¹ Nádia R. Ferreira,² Simoneide S. Silva,¹ Luis Pardo,³ Walter Stühmer,³ Elaine Del Bel,² Ricardo Titze-de-Almeida.¹

¹Lab. Tecnologias para Terapia Gênica, FAV, UnB, University of Brasília - UnB, Brasília, Distrito Federal, Brazil; ²Lab. Neurofisiologia e Biologia Molecular, Dept. Morfologia Estomatologia e Fisiologia, FORP, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ³Molecular Biology of Neuronal Signals, Max-Planck-Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany.

The nNOS enzyme is expressed in brain areas submitted to injury, and its pharmacological blocking can decrease the neurotoxic effects of 6-OHDA on dopaminergic neurons. The enzyme has three main splicing variants isoforms - alfa, beta, and gama, which may have distinct roles in neurodegenerative diseases. We described here an RNAi protocol designed to silence specifically the nNOS alfa. This isoform is structurally coupled to the NMDA receptor through a domain coded by the exon 2. Firstly, we used an artificial neuronal network algorithm to identify potential targets for RNAi present only in exon 2. The synthetic siRNA duplexes with 21 nucleotides targeted to this sequence (exon2_nNOS) were synthesized by Qiagen. In our study, we transfected neuroblastoma cells (ATCC SH-SY5Y) with 150 pmol of this exon2_nNOS siRNA mixed with Lipofectamine® (Invitrogen). The negative control sequence was the commercial scramble All-Star® (Qiagen). The cell culture media used in this study were Optimen® and DMEM® (Gibco), for the first 6 h and for the remaining 24 h of incubation, respectively. We used commercial kits for RNA extraction (RNeasy Plus MiniKit®, Qiagen) and reverse transcription (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen). The relative expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$) of nNOS was determined by quantitative real-time PCR with SYBR Green® (Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System). The forward and reverse primers for nNOS were 5'-GAACTGGGAGACTGAGGTGGTTC-3' and 5'-CTCAGTGCATCCCCTTTCCA-3'. For the housekeeping gene GAPDH, we used the primers 5'-CAACTACATGGTTTACATGTTCC-3', and 5'-GGACTGTGGTTCATGAGTCCT-3'. The PCR mixture contained the following reagents: SYBR Green mix 5.0 µL, cDNA 500 ng, 0.8 µL of each primer 10 µM/µL, MilliQ water up to 10 µL. The qPCR conditions were: initial denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of amplification (95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min). Each sample run in triplicate wells in the same plate. The siRNA targeted to the nNOS alfa splicing variant produced a marked decrease on nNOS expression. The relative expression of nNOS in the treated group was 0.134 fold in comparison to the negative control. In conclusion, we report here an accurate method to silence the alfa splicing variant isoform of nNOS by using a synthetic double-stranded RNA. Our data encourage the use of RNAi protocols for silencing effects on enzyme isoforms, with the aim to study their roles in brain diseases or to highlight new strategies for gene therapy.

Stem Cell Therapies III

852. Similarities between Cancer Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells

Ruan van Rensburg,¹ Robert Strauss,¹ Ines Beyer,¹ Oleg Denisenko,² Karol Bomsztyk,² Andre Lieber.¹

¹Division of Medical Genetics, University of Washington, Seattle, WA; ²UW Medicine Lake Union, University of Washington, Seattle WA.

It is now generally accepted that relapse and chemotherapy resistance of cancer involves subpopulation(s) of cancer cells with stem cell feature (cancer stem cells - CSC). In our studies of ovarian cancer biopsies we have identified subpopulations of cells that are in a transitory E/M hybrid stage, i.e. cells that simultaneously express epithelial and mesenchymal markers. Based on the differences in the levels and cellular localization of the markers E-cadherin, CD133, Tie2 and CD44, we were able to isolate a cell fraction from ovarian cancer biopsies that is highly enriched for tumor-forming cells and that displays features which are generally associated with cancer stem cells. This fraction undergoes a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) during tumor formation upon transplantation into immunodeficient mice, i.e. it differentiates into epithelial tumor cells that form the bulk of the tumor. MET was also triggered when primary ovarian cancer cultures were exposed to cisplatin and resistant cells had a CSC phenotype. On the other hand, MET initiates and is required for the nuclear reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem (iPS) cells. Similarities between iPS cells and CSC are supported by our confocal immunofluorescent microscopy analyses. Both cell types were in an E/M hybrid stage, e.g. expressed the epithelial marker E-cadherin and the mesenchymal marker N-cadherin. Undifferentiated iPS cells (positive for the stem cell antigen Tra-1-160) and CSC displayed characteristic cytoplasmic punctuated staining for E-cadherin. In contrast, epithelial cells derived from these undifferentiated iPS and CSC contained membrane localized E-cadherin as a part of intercellular junctions. A key gene in the regulation of MET is E-cadherin. We therefore plan to study the epigenetic regulation of the E-cadherin promoter during *i*) fibroblast reprogramming (fibroblasts before and after infection with lentivirus vectors expressing Oct4, Klf4, Sox2, and c-Myc), *ii*) tumor formation (primary ovarian cancer cells before and after transplantation), and *iii*) during acquisition of cisplatin resistance (primary ovarian cancer cells before and after cisplatin treatment). As noted above, all three processes involve MET. Toward this goal, we have performed matrix chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays on six iPS cell lines derived from different sources to study the occupancy of the E-cadherin promoter by marks for open and closed chromatin. As expected, we found a closed chromatin configuration in stable iPS cell lines. However, there were significant differences in the chromatin structure of the E-cadherin promoter in different iPS cell lines and we are currently studying whether this correlates with their level of pluripotency, as measured by the ability for secondary hematopoietic differentiation. A better understanding of how CSC form and are maintained during tumor growth and under genotoxic stress can reveal new targets for cancer therapy, which has to be directed towards CSC.

Anexo II

i. POP 43.1 – Procedimentos para Manutenção Celular – Plaqueamento

Procedimentos para Manutenção Celular - Plaqueamento Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	43.1

1/2

Usuário: _____, Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

- Falcon 50 mL
- Meio de cultura (específico para cada tipo celular)
- DPBS
- Tripsina/EDTA 0,05% ou 0,25%
- Álcool 70%
- Garrafas de cultivo celular
- Luvas
- Pipetas
- Ponteiras: p200 e p1000
- Eppendorfs
- Azul Tripán
- Câmara de Neubauer

PROCEDIMENTOS

- **Desinfecção geral**
 - Use álcool 70% para limpeza de plásticos, garrafas, fluxo laminar, luvas, bancadas
- **Descarte do meio de cultura antigo**
 - Transfira para um Falcon e reserve
- **Lavagem**
 - Adicione 3,0 mL (40 cm²) ou 10 mL (70cm²) DPBS e misture
 - Transfira o DPBS para o Falcon contendo o meio de cultura
- **Tripsinização**
 - Adicione X mL de Tripsina na garrafa contendo o cultivo e misture
 - Incube a 37°C por 3 min.
 - Observe em microscópio a liberação celular, bata levemente na garrafa se necessário
 - Transfira o conteúdo do Falcon para a garrafa e misture
 - Transfira novamente o conteúdo para o Falcon para centrifugação – use 1200 RPM por 3 min
 - Descarte o sobrenadante
 - Dilua o pellet em 1,0mL DPBS e misture, use o vortex se necessário
- **Contagem celular**
 - misture 30 µL de DPBS contendo as células com 90 µL AzulTripán, use o vortex.

Comentários:

Tripsinização: 2,0 mL Tripsina (0,05%) para células de gliomas e neuroblastomas, 1,0 mL para células HEK.
1,0 mL Tripsina (0,25%) para células de gliomas e neuroblastomas, 0,5 mL para células HEK.

Procedimentos para Manutenção Celular - Plaqueamento

Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica

POP

43.1

1/2

- Preencha a Câmara de Neubauer com 10 μ L
- Conte o total de células nos 4 quadrantes e use a fórmula: $\frac{\text{Total de células} \times 4}{4} \cdot 10^4$
- O resultado indica a quantidade de células em 1mL
- **Plaqueamento**
- Em uma nova garrafa adicione 5,0mL de meio de cultura novo para garrafas de 25 cm² ou 20 mL para garrafas de 75 cm²
- Adicione 50 – 100 μ L de DPBS contendo células e misture
- Observe em um microscópio
- Incube a 37°C e 5% de CO₂
- **Armazenamento**
- Centrifugue o resto da solução de DPBS contendo as células
- Descarte o sobrenadante
- Armazene o pellet a -20° C.

FIM.

Comentários:

Tripsinização: 2,0 mL Tripsina (0,05%) para células de gliomas e neuroblastomas, 1,0 mL para células HEK.
1,0 mL Tripsina (0,25%) para células de gliomas e neuroblastomas, 0,5 mL para células HEK.

ii. POP 43.2 – Procedimentos para Manutenção Celular – Troca de Meio de Cultura

Procedimentos para Manutenção Celular – Troca do Meio de Cultura Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	43.2

1/1

Usuário: _____ . Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

- Meio de cultura (específico para cada célula)
- Pipetas
- Luvas
- Ponteiras: p 1000
- Álcool 70%

PROCEDIMENTOS

- Desinfecção geral
- Com álcool 70%, limpe todos os objetos e superfícies
- Descarte o meio de cultura antigo
- Adicione 5,0mL de meio de cultura novo emu na garrafa
- Misture
- Observe em um microscópio
- Incube

OBJETIVOS

- Manutenção de células com meio de cultura novo
- Manutenção do crescimento

CUIDADOS

- Contaminação
 - Morte celular
 - Crescimento excessivo
-

FIM.

Comentários:

iii. POP 43.3 – Procedimentos para Manutenção Celular – Adição de Meio de Cultura

Procedimentos para Manutenção Celular – Adição de Meio de Cultura Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	43.3

1/ 1

Usuário: _____ . Data: ____ / ____ / _____

OBJETIVOS

- Restabelecer nutrientes para as células
- Minimizar a manipulação da cultura
- Buscar o aumento do crescimento celular

CUIDADOS

- Contaminação
- Morte celular

MATERIAIS

- Meio de cultura (específico para cada célula)
- Pipetas
- Luvas
- Ponteiras: P1000
- Álcool 70%

PROCEDIMENTOS

- Desinfecção geral
 - Use álcool 70% para limpar todos os objetos e superfícies
 - Adicione 5,0 mL de meio de cultura no na garrafa contendo o cultivo
 - Misture
 - Incube a 37°C e 5% de CO₂
-

FIM.

Comentários:

iv. POP 43.4 – Criopreservação Celular

Criopreservação Celular Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	43.4

1/2

Usuário: _____, Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

- Criotubos estéreis
- DMSO
- Soro Fetal Bovino – FBS filtrado
- DMEM + 1% Glutamax + 10% FBS
- DPBS

PROCEDIMENTOS

- Após realizada a tripsinização normal do cultivo, POP 43.1, prosseguir com a contagem celular em câmara de Neubauer, o ideal é que se alcance uma contagem de pelo menos 1.000.000 de células por mL de DPBS.
 - Preparar os criotubos com solução crioprotetora utilizando as seguintes concentrações:
 - 500 µL de DMEM (com 1% Glutamax + 10% FBS);
 - 200 µL de FBS;
 - 100 µL de DMSO;
 - 200 µL de DPBS com células (200.000 células aproximadamente).
 - Fechar e identificar cada criotubo com tipo celular, data e nome do laboratório.
 - Manter em caixa apropriada com gelo imediatamente ao fechamento e encaminhar o mais rápido possível ao Freezer -70° C, deixar por 24 horas.
 - Retirar do Freezer e transferir para botijão de Nitrogênio Líquido a -180°C.
 - Lembrar de identificar o canister no botijão e também de fixar os criotubos em estantes próprias para evitar que os mesmos fiquem sobrenadantes no Nitrogênio.
-

FIM.

Comentários:

v. POP 43.5 – Descongelamento de Células

Descongelamento de Células Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	43.5

1/1

Usuário: _____ Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

- Criotubos com solução crioprotetora e células – Vial;
- Banho maria;
- Meio de cultura completo;
- Pipetas;
- Frascos de cultivo.

PROCEDIMENTOS

- Aquecer o Vial com as células, armazenadas em Nitrogênio Líquido (- 180°C), em banho maria a 37° C até descongelar totalmente;
 - Em uma garrafa de cultivo com capacidade para 200 mL acrescentar 10 mL de meio completo;
 - Juntar toda a solução crioprotetora, contendo as células, aos 10 mL de meio no frasco de cultivo e homogeneizar;
 - Visualizar o aspecto das células ao microscópio invertido, as mesmas devem se apresentar com citoplasma arredondado, intacto e estar flutuantes no meio;
 - Acrescentar mais 10 mL de meio completo, homogeneizar e guardar em estufa a 37°C;
Caso necessite, acrescentar ao meio de cultura antibióticos em dosagem adequada.
-

FIM.

Comentários:

vi. POP 44 – Transfecção Celular

Transfecção celular Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	44

1/2

Usuário: _____, Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

- Microtubos 1,5 µL
- Garrafas para cultivo
- siRNA
- Lipofectamina 2000
- Optímem + Glutamax
- DPBS
- DMEM F12 + 1% Glutamax + 10% FBS

PROCEDIMENTOS

1. Preparação dos microtubos para os agentes de transfecção
 - a. Tubo 1 Lipofectamina (uma reação)
 - 15 µL de Lipofectamina 2000
 - 185 µL de Optímem
 - b. Para 3 reações (controle, scramble, amostra a ser testada)
 - 45 µL de Lipofectamina 2000
 - 555 µL de Optímem
 - c. Incubar os reagentes da transfecção diluídos em Optímem por 10 minutos à Temperatura ambiente.
2. Preparação do siRNA
 - a. Tubo 2.1 (para amostra Scramble - "All Star")
 - 7,5 µL amostra RNA 20 µM(150 pmol)
 - 192,5 µL Optímem
 - b. Tubo 2.2 (para amostra a ser testada. ex: KV 2.1-3)
 - 7,5 µL amostra RNA 20 µM(150 pmol)
 - 192,5 µL Optímem
 - c. Tubo 2.3 (para amostra Control Pure Cell – Transfectado apenas com Lipossoma)
 - 200 µL Optímem
3. Adicionar 200 µL do Tubo 1 a cada um dos tubos 2 (2.1, 2.2, etc.). Volume final será 400 µL. Incubar à Temperatura ambiente por 20 min.

Comentários:

Transfecção celular

Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica

PCP

44

2/2

4. Preparação dos meios celulares e transfecções

Para transfecção com Lipofectamina, primeiro lave as células com 3 mL de DPBS.

- a. Remover o meio de crescimento.
- b. Lavar com 3 mL de DPBS.
- c. Adicionar 5 mL de Optímem+Glutamax (Gibco 51985).
- d. Transfectar os 400 μ L resultantes Tubo 1 + Tubo 2.
- e. Incubar por 6 hs após a transfecção.
- f. Retirar o meio.
- g. Adicionar DMEM F12 + 1% glutamax + 10% de FBS (Soro Fetal Bovino).
- h. Incubar as células por 24 hs.

FIM.

Comentários:

vii. POP 46 – Extração de RNA com kit comercial RNeasy Plus QIAGEN

Extração de RNA com Kit comercial RNeasy Plus QIAGEN Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	46

1/2

Usuário: _____ . Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

- Células ou tecido desejado;
- Kit RNeasy;
- β -mercaptoethanol (β -ME);
- Etanol 70%;
- Ponteiros estéreis e RNase free.

PROCEDIMENTOS

- Para pellet congelado, descongelar em banho maria a 37°C, ressuspender e contar;
- Para cultivo, tripsinizar (POP 43.1) e contar;
- Preparar *Buffer RLT plus*, acrescentando 10 μ L de β -mercaptoethanol (β -ME) para cada 1,0 mL de *Buffer RLT plus*; -- Lembrando que o *Buffer* preparado com *mercaptoethanol* tem validade de 30 dias;
- Para concentrações de até 5.000.000 de células usar 350 μ L de *Buffer RLT plus* + β -ME;
- Para quantidades maiores de células usar 600 μ L de *Buffer RLT plus*+ β -ME;
- LISE CELULAR: Juntar em um tubo para centrifuga as células e o *Buffer RLT* + β -ME, com movimentos "up & down" homogeneizar a solução até que se dissolvam totalmente as células, ideal é que se faça ao menos 20 movimentos;
- Transferir todo o homogeneizado (solução com células e *buffer*) para a coluna *gDNA Eliminator spin column* (Fornecida junto com o Kit, vem montado em um *ependorf* com capacidade para 2,0 mL);
- Centrifugar a coluna durante 30 segundos a 10.000 rpm ou 8.000 xg)
- Descartar a coluna e guardar o filtrado (caso necessite, repetir a centrifugação);
- Acrescentar etanol 70% na mesma quantidade de filtrado, "dobrar a solução" (se necessário medir com a pipeta);
- Homogeneizar a solução com movimentos "up & down", não pode centrifugar!
* nesta etapa pode haver formação de precipitado, o que é normal;
- Transferir 700 μ L da solução anterior para a coluna *RNeasy spin column* (fornecida com o Kit); * caso a quantidade de solução seja maior que 700 μ L, centrifugar em alíquotas menores;
- Fechar a tampa gentilmente e centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm ou 8.000 xg;
- Descartar o filtrado, mantendo o mesmo *ependorf*;
- Acrescentar 700 μ L de *Buffer RW1* à coluna e centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm ou 8.000xg;

Comentários:

Extração de RNA com Kit comercial RNeasy Plus QIAGEN

Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica

POP

46

2/2

- Descartar o filtrado e reutilizar o tubo para o próximo passo;
- Cuidado para não encostar a coluna no filtrado após a centrifugação!!!
- Acrescentar 500 μ L de *Buffer RPE* (VERIFICAR SE ESTÁ DILUÍDO) à coluna e centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm ou 8.000xg;
- Descartar o filtrado e reutilizar o tubo para o próximo passo;
- Acrescentar 500 μ L de *Buffer RPE* à coluna e centrifugar durante 2 minutos a 10.000 rpm ou 8.000xg;
- Verificar se ainda há líquido na coluna após a centrifugação, caso tenha, re-centrifugar;
- Não encostar a coluna no filtrado, traços de etanol interferem na amostra, CUIDADO!!
- Trocar o eppendorf e centrifugar a coluna durante 1 minuto a 10.000 rpm para confirmar a ausência de etanol;
- Descartar o tubo, transferir a coluna para um tubo de 1.5 mL NOVO!
- Acrescentar entre 30 a 50 μ L de água destilada *RNAse free* (acompanha o Kit) no centro da coluna e centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm ou 8.000xg;
- Caso a quantidade obtida de filtrado (que agora contém o RNA) seja pequena, pode-se repetir a centrifugação com mais 30 μ L de água destilada *RNAse Free*;
- Descartar a coluna e armazenar o filtrado (RNA) em freezer, ideal que seja a -70°C .

FIM.

Comentários:

viii. POP 48 – Transcrição Reversa – Max Planck

Transcrição Reversa – Max Planck Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	48

1/2

Usuário: _____, Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

- Superscript III 200 ou 50 u/μL – Invitrogen, cat. 18080-044;
- Oligo DT 0,5mg/μL – Invitrogen, cat. 18418-012;
- Ribonuclease H 2U/μL – Invitrogen, cat. 18021-071;
- Água RNase free DEPC;
- 10x RT buffer – Invitrogen, cat. 53032;
- MgCl₂ 25mM – Invitrogen, cat. Y02222;
- 10mM dNTP mix – Invitrogen, cat. Y02256;
- 0,1 DTT – Invitrogen, cat. Y00122;
- Amostra de RNA devidamente quantificada;
- Tubos tipo eppendorf de 0,5mL;
- Ponteiros e pipetas – P2, P10 e P20.

PROCEDIMENTOS

- Verificar programação do termociclador;
- Passo 1 – Mix primer mais RNA
 - Misturar o volume correspondente de RNA para chegar à concentração de 1,5 a 2,5 microgramas por reação, lembrando que o volume máximo será de 11μL de RNA;
 - 1μL de Oligo DT;
 - Água RNase free para completar 12μL.
 - Mix;
 - Spin em centrifuga;
 - Incubar 10 minutos a 70°C;
 - Descansar no gelo ou 4 °C por 1 minuto.
- Passo 2 – Buffer RT
 - Recomendado preparar um mix para todas as amostras enquanto espera os 10 minutos da primeira etapa, depois basta acrescentar 7μL do mix RT Buffer em cada amostra e passar ao próximo passo.
 - 2μL de 10x RT Buffer;
 - 2μL de MgCl₂ 25mM;
 - 2μL de DTT;
 - 1μL de dNTP mix 10mM;

Comentários:

Transcrição Reversa – Max Planck

Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica

POP

48

2/2

- *Mix*;
- *Spin* em centrífuga;
- Incubar por 5 minutos a 42°C.

- **Passo 3 – SuperScript III (200 ou 50 U/μL)**
- acrescentar 1μL de SuperScript III em cada amostra;
- no caso de testar controle negativo, acrescentar 1 μL de Água.
- *Mix*;
- *Spin* em centrífuga;
- incubar 50 minutos à 42°C;
- Terminar a reação incubando 15 minutos à 70°C;
- Descansar no gelo;
- *Spin*.

- **Passo 4 – RNase**
- Acrescentar 1μL de Ribonuclease H – RNase H (2U/μL) em cada amostra;
- *mix*;
- *Spin*;
- Incubar 20 minutos à 37°C.

- **Passo 5 – Acertar volume**
- Acrescentar 4μL de água DEPC em cada amostra, corrigindo o volume total para 25μL de cDNA.

FIM.

Comentários:

ix: Análise de similaridade entre as seqüências de nNOS NM_000620.4 (referência), U17327.1 (fonte originalmente depositada) e CCDS41842.1 (consenso para a região codante)

```

NM_000620.4      ATGGAGGAT 720
CCDS41842.1     ATGGAGGAT 9
U17327.1       ATGGAGGAT 694
                *****

NM_000620.4      CACATGTTTCGGTGTTCAGCAAATCCAGCCCAATGTCATTTCTGTTCGTCTCTTCAAGCGC 780
CCDS41842.1     CACATGTTTCGGTGTTCAGCAAATCCAGCCCAATGTCATTTCTGTTCGTCTCTTCAAGCGC 69
U17327.1       CACATGTTTCGGTGTTCAGCAAATCCAGCCCAATGTCATTTCTGTTCGTCTCTTCAAGCGC 754
                *****

NM_000620.4      AAAGTTGGGGGCCTGGGATTTCTGGTGAAGGAGCGGGTCAGTAAGCCGCCGTGATCATC 840
CCDS41842.1     AAAGTTGGGGGCCTGGGATTTCTGGTGAAGGAGCGGGTCAGTAAGCCGCCGTGATCATC 129
U17327.1       AAAGTTGGGGGCCTGGGATTTCTGGTGAAGGAGCGGGTCAGTAAGCCGCCGTGATCATC 814
                *****

NM_000620.4      TCTGACCTGATTCGTGGGGGCGCCGAGAGCAGAGTGGCCTCATCCAGGCCGGAGACATC 900
CCDS41842.1     TCTGACCTGATTCGTGGGGGCGCCGAGAGCAGAGTGGCCTCATCCAGGCCGGAGACATC 189
U17327.1       TCTGACCTGATTCGTGGGGGCGCCGAGAGCAGAGTGGCCTCATCCAGGCCGGAGACATC 874
                *****

NM_000620.4      ATTCTTGCGGTCAACGGCCGGCCCTTGGTGGACCTGAGCTATGACAGCGCCCTGGAGGTA 960
CCDS41842.1     ATTCTTGCGGTCAACGGCCGGCCCTTGGTGGACCTGAGCTATGACAGCGCCCTGGAGGTA 249
U17327.1       ATTCTTGCGGTCAACGGCCGGCCCTTGGTGGACCTGAGCTATGACAGCGCCCTGGAGGTA 934
                *****

NM_000620.4      CTCAGAGGCATTGCCTCTGAGACCCACGTGGTCCTCATTTCTGAGGGGCCCTGAAGGTTTC 1020
CCDS41842.1     CTCAGAGGCATTGCCTCTGAGACCCACGTGGTCCTCATTTCTGAGGGGCCCTGAAGGTTTC 309
U17327.1       CTCAGAGGCATTGCCTCTGAGACCCACGTGGTCCTCATTTCTGAGGGGCCCTGAAGGTTTC 994
                *****

NM_000620.4      ACCACGCACCTGGAGACCACCTTTACAGGTGATGGGACCCCCAAGACCATCCGGGTGACA 1080
CCDS41842.1     ACCACGCACCTGGAGACCACCTTTACAGGTGATGGGACCCCCAAGACCATCCGGGTGACA 369
U17327.1       ACCACGCACCTGGAGACCACCTTTACAGGTGATGGGACCCCCAAGACCATCCGGGTGACA 1054
                *****

NM_000620.4      CAGCCCTGGGTCCCCCACCAGCCTGGATCTGTCCACCAGCCACCGCCGGCAA 1140
CCDS41842.1     CAGCCCTGGGTCCCCCACCAGCCTGGATCTGTCCACCAGCCACCGCCGGCAA 429
U17327.1       CAGCCCTGGGTCCCCCACCAGCCTGGATCTGTCCACCAGCCACCGCCGGCAA 1114
                *****

NM_000620.4      GAACAGCCCTGGCAGTGGATGGGGCCTCGGGTCCCGGAATGGGCCTCAGCATGCCTAC 1200
CCDS41842.1     GAACAGCCCTGGCAGTGGATGGGGCCTCGGGTCCCGGAATGGGCCTCAGCATGCCTAC 489
U17327.1       GAACAGCCCTGGCAGTGGATGGGGCCTCGGGTCCCGGAATGGGCCTCAGCATGCCTAC 1174
                *****

NM_000620.4      GATGATGGGCAGGAGGCTGGCTCACTCCCCATGCCAACGGCCTGGCCCCAGGCCCCCA 1260
CCDS41842.1     GATGATGGGCAGGAGGCTGGCTCACTCCCCATGCCAACGGCCTGGCCCCAGGCCCCCA 549
U17327.1       GATGATGGGCAGGAGGCTGGCTCACTCCCCATGCCAACGGCCTGGCCCCAGGCCCCCA 1234
                *****

NM_000620.4      GGCCAGGACCCCGGAAGAAAGCAACCAGAGTCAGCCTCCAAGGCAGAGGGGAGAACAAT 1320
CCDS41842.1     GGCCAGGACCCCGGAAGAAAGCAACCAGAGTCAGCCTCCAAGGCAGAGGGGAGAACAAT 609
U17327.1       GGCCAGGACCCCGGAAGAAAGCAACCAGAGTCAGCCTCCAAGGCAGAGGGGAGAACAAT 1294
                *****

NM_000620.4      GAACTGCTCAAGGAGATAGAGCCTGTGCTGAGCCTTCTCACCAGTGGGAGCAGAGGGGTC 1380
CCDS41842.1     GAACTGCTCAAGGAGATAGAGCCTGTGCTGAGCCTTCTCACCAGTGGGAGCAGAGGGGTC 669
U17327.1       GAACTGCTCAAGGAGATAGAGCCTGTGCTGAGCCTTCTCACCAGTGGGAGCAGAGGGGTC 1354
                *****

```

NM_000620.4 AAGGGAGGGGCACCTGCCAAGGCAGAGATGAAAGATATGGGAATCCAGGTGGACAGAGAT 1440
 CCDS41842.1 AAGGGAGGGGCACCTGCCAAGGCAGAGATGAAAGATATGGGAATCCAGGTGGACAGAGAT 729
 U17327.1 AAGGGAGGGGCACCTGCCAAGGCAGAGATGAAAGATATGGGAATCCAGGTGGACAGAGAT 1414

NM_000620.4 TTGGACGGCAAGTCACACAAACCTCTGCCCTCGGCGTGGAGAACGACCGAGTCTTCAAT 1500
 CCDS41842.1 TTGGACGGCAAGTCACACAAACCTCTGCCCTCGGCGTGGAGAACGACCGAGTCTTCAAT 789
 U17327.1 TTGGACGGCAAGTCACACAAACCTCTGCCCTCGGCGTGGAGAACGACCGAGTCTTCAAT 1474

NM_000620.4 GACCTATGGGGGAAGGGCAATGTGCCTGTCGTCTCAACAACCCATATTCAGAGAAGGAG 1560
 CCDS41842.1 GACCTATGGGGGAAGGGCAATGTGCCTGTCGTCTCAACAACCCATATTCAGAGAAGGAG 849
 U17327.1 GACCTATGGGGGAAGGGCAATGTGCCTGTCGTCTCAACAACCCATATTCAGAGAAGGAG 1534

NM_000620.4 CAGCCCCCACCTCAGGAAAACAGTCCCCCACAAGAATGGCAGCCCCCTCCAAGTGTCCA 1620
 CCDS41842.1 CAGCCCCCACCTCAGGAAAACAGTCCCCCACAAGAATGGCAGCCCCCTCCAAGTGTCCA 909
 U17327.1 CAGCCCCCACCTCAGGAAAACAGTCCCCCACAAGAATGGCAGCCCCCTCCAAGTGTCCA 1594

NM_000620.4 CGCTTCCTCAAGGTCAAGAACTGGGAGACTGAGGTGGTTCTCACTGACACCCTCCACCTT 1680
 CCDS41842.1 CGCTTCCTCAAGGTCAAGAACTGGGAGACTGAGGTGGTTCTCACTGACACCCTCCACCTT 969
 U17327.1 CGCTTCCTCAAGGTCAAGAACTGGGAGACTGAGGTGGTTCTCACTGACACCCTCCACCTT 1654

NM_000620.4 AAGAGCACATTGGAACGGGATGCACTGAGTACATCTGCATGGGCTCCATCATGCATCCT 1740
 CCDS41842.1 AAGAGCACATTGGAACGGGATGCACTGAGTACATCTGCATGGGCTCCATCATGCATCCT 1029
 U17327.1 AAGAGCACATTGGAACGGGATGCACTGAGTACATCTGCATGGGCTCCATCATGCATCCT 1714

NM_000620.4 TCTCAGCATGCAAGGAGGCTGAAGACGTCGCGCACAAGGACAGCTCTTCCCTCTCGCC 1800
 CCDS41842.1 TCTCAGCATGCAAGGAGGCTGAAGACGTCGCGCACAAGGACAGCTCTTCCCTCTCGCC 1089
 U17327.1 TCTCAGCATGCAAGGAGGCTGAAGACGTCGCGCACAAGGACAGCTCTTCCCTCTCGCC 1774

NM_000620.4 AAAGAGTTTATTGATCAATACTATTTCATCAATTTAAAGATTTGGCTCCAAAGCCACATG 1860
 CCDS41842.1 AAAGAGTTTATTGATCAATACTATTTCATCAATTTAAAGATTTGGCTCCAAAGCCACATG 1149
 U17327.1 AAAGAGTTTATTGATCAATACTATTTCATCAATTTAAAGATTTGGCTCCAAAGCCACATG 1834

NM_000620.4 GAAAGGCTGGAAGAGGTGAACAAAGAGATCGACACCACCTAGCACTTACCAGCTCAAGGAC 1920
 CCDS41842.1 GAAAGGCTGGAAGAGGTGAACAAAGAGATCGACACCACCTAGCACTTACCAGCTCAAGGAC 1209
 U17327.1 GAAAGGCTGGAAGAGGTGAACAAAGAGATCGACACCACCTAGCACTTACCAGCTCAAGGAC 1894

NM_000620.4 ACAGAGCTCATCTATGGGGCCAAGCAGCCTGGCGGAATGCCTCGCGCTGTGTGGGCAGG 1980
 CCDS41842.1 ACAGAGCTCATCTATGGGGCCAAGCAGCCTGGCGGAATGCCTCGCGCTGTGTGGGCAGG 1269
 U17327.1 ACAGAGCTCATCTATGGGGCCAAGCAGCCTGGCGGAATGCCTCGCGCTGTGTGGGCAGG 1954

NM_000620.4 ATCCAGTGGTCCAAGCTGCAGGTATTCGATGCCCGTACTGCACCACGGCCCACGGGATG 2040
 CCDS41842.1 ATCCAGTGGTCCAAGCTGCAGGTATTCGATGCCCGTACTGCACCACGGCCCACGGGATG 1329
 U17327.1 ATCCAGTGGTCCAAGCTGCAGGTATTCGATGCCCGTACTGCACCACGGCCCACGGGATG 2014

NM_000620.4 TTCAACTACATCTGTAACCATGTCAAGTATGCCACCAACAAGGGAACCTCAGGTCTGCC 2100
 CCDS41842.1 TTCAACTACATCTGTAACCATGTCAAGTATGCCACCAACAAGGGAACCTCAGGTCTGCC 1389
 U17327.1 TTCAACTACATCTGTAACCATGTCAAGTATGCCACCAACAAGGGAACCTCAGGTCTGCC 2074

NM_000620.4 ATCACCATATTCCCCAGAGGACAGACGGCAAGCACGACTTCCGAGTCTGGAACCTCCAG 2160
 CCDS41842.1 ATCACCATATTCCCCAGAGGACAGACGGCAAGCACGACTTCCGAGTCTGGAACCTCCAG 1449
 U17327.1 ATCACCATATTCCCCAGAGGACAGACGGCAAGCACGACTTCCGAGTCTGGAACCTCCAG 2134

NM_000620.4 CTGATCCGCTACGCTGGCTACAAGCAGCCTGACGGCTCCACCCTGGGGGACCCAGCCAAT 2220
 CCDS41842.1 CTGATCCGCTACGCTGGCTACAAGCAGCCTGACGGCTCCACCCTGGGGGACCCAGCCAAT 1509
 U17327.1 CTGATCCGCTACGCTGGCTACAAGCAGCCTGACGGCTCCACCCTGGGGGACCCAGCCAAT 2194

NM_000620.4 GTGCAGTTCACAGAGATATGCATACAGCAGGGCTGGAAACCGCCTAGAGGCCGCTTCGAT 2280
 CCDS41842.1 GTGCAGTTCACAGAGATATGCATACAGCAGGGCTGGAAACCGCCTAGAGGCCGCTTCGAT 1569
 U17327.1 GTGCAGTTCACAGAGATATGCATACAGCAGGGCTGGAAACCGCCTAGAGGCCGCTTCGAT 2254

NM_000620.4 GTCTGCGCTCCTGCTTCAGGCCAACGGCAATGACCCTGAGCTCTTCCAGATTCTCTCA 2340
 CCDS41842.1 GTCTGCGCTCCTGCTTCAGGCCAACGGCAATGACCCTGAGCTCTTCCAGATTCTCTCA 1629
 U17327.1 GTCTGCGCTCCTGCTTCAGGCCAACGGCAATGACCCTGAGCTCTTCCAGATTCTCTCA 2314

NM_000620.4 GAGCTGGTGTGGAAAGTTCCCATCAGGCACCCCAAGTTTGAGTGGTTC AAGGACCTGGGG 2400
 CCDS41842.1 GAGCTGGTGTGGAAAGTTCCCATCAGGCACCCCAAGTTTGAGTGGTTC AAGGACCTGGGG 1689
 U17327.1 GAGCTGGTGTGGAAAGTTCCCATCAGGCACCCCAAGTTTGAGTGGTTC AAGGACCTGGGG 2374

NM_000620.4 CTGAAGTGGTACGGCCTCCCCGCGTGTCCAACATGCTCCTAGAGATTGGCGGCCTGGAG 2460
 CCDS41842.1 CTGAAGTGGTACGGCCTCCCCGCGTGTCCAACATGCTCCTAGAGATTGGCGGCCTGGAG 1749
 U17327.1 CTGAAGTGGTACGGCCTCCCCGCGTGTCCAACATGCTCCTAGAGATTGGCGGCCTGGAG 2434

NM_000620.4 TTCAGCGCCTGTCCCTTCAGTGGCTGGTACATGGGCACAGAGATTGGTGTCCGCGACTAC 2520
 CCDS41842.1 TTCAGCGCCTGTCCCTTCAGTGGCTGGTACATGGGCACAGAGATTGGTGTCCGCGACTAC 1809
 U17327.1 TTCAGCGCCTGTCCCTTCAGTGGCTGGTACATGGGCACAGAGATTGGTGTCCGCGACTAC 2494

NM_000620.4 TGTGACAACCTCCCGCTACAATATCCTGGAGGAAGTGGCCAAGAAGATGAACTTAGACATG 2580
 CCDS41842.1 TGTGACAACCTCCCGCTACAATATCCTGGAGGAAGTGGCCAAGAAGATGAACTTAGACATG 1869
 U17327.1 TGTGACAACCTCCCGCTACAATATCCTGGAGGAAGTGGCCAAGAAGATGAACTTAGACATG 2554

NM_000620.4 AGGAAGACGTCCCTCCCTGTGGAAGGACCAGGCGCTGGTGGAGATCAATATCGCGGTTCTC 2640
 CCDS41842.1 AGGAAGACGTCCCTCCCTGTGGAAGGACCAGGCGCTGGTGGAGATCAATATCGCGGTTCTC 1929
 U17327.1 AGGAAGACGTCCCTCCCTGTGGAAGGACCAGGCGCTGGTGGAGATCAATATCGCGGTTCTC 2614

NM_000620.4 TATAGCTTCCAGAGTGACAAAGTGACCATTTGTTGACCATCACTCCGCCACCGAGTCTCTC 2700
 CCDS41842.1 TATAGCTTCCAGAGTGACAAAGTGACCATTTGTTGACCATCACTCCGCCACCGAGTCTCTC 1989
 U17327.1 TATAGCTTCCAGAGTGACAAAGTGACCATTTGTTGACCATCACTCCGCCACCGAGTCTCTC 2674

NM_000620.4 ATTAAGCACATGGAGAATGAGTACCCTGCCGGGGGGCTGCCCTGCCGACTGGGTGTGG 2760
 CCDS41842.1 ATTAAGCACATGGAGAATGAGTACCCTGCCGGGGGGCTGCCCTGCCGACTGGGTGTGG 2049
 U17327.1 ATTAAGCACATGGAGAATGAGTACCCTGCCGGGGGGCTGCCCTGCCGACTGGGTGTGG 2734

NM_000620.4 ATCGTGCCCCCATGTCCGGAAGCATCACCCCTGTGTTCCACCAGGAGATGCTCAACTAC 2820
 CCDS41842.1 ATCGTGCCCCCATGTCCGGAAGCATCACCCCTGTGTTCCACCAGGAGATGCTCAACTAC 2109
 U17327.1 ATCGTGCCCCCATGTCCGGAAGCATCACCCCTGTGTTCCACCAGGAGATGCTCAACTAC 2794

NM_000620.4 CGGCTCACCCCTCCTTCGAATACCAGCCTGATCCCTGGAAACACGCATGTCTGGAAAGGC 2880
 CCDS41842.1 CGGCTCACCCCTCCTTCGAATACCAGCCTGATCCCTGGAAACACGCATGTCTGGAAAGGC 2169
 U17327.1 CGGCTCACCCCTCCTTCGAATACCAGCCTGATCCCTGGAAACACGCATGTCTGGAAAGGC 2854

NM_000620.4 ACCAACGGGACCCCCACAAGCGGCGAGCCATTGGCTTCAAGAAGCTAGCAGAAGCTGTCT 2940
 CCDS41842.1 ACCAACGGGACCCCCACAAGCGGCGAGCCATTGGCTTCAAGAAGCTAGCAGAAGCTGTCT 2229
 U17327.1 ACCAACGGGACCCCCACAAGCGGCGAGCCATTGGCTTCAAGAAGCTAGCAGAAGCTGTCT 2914

NM_000620.4 AAGTTCTCGGCCAAGCTGATGGGGCAGGCTATGGCCAAGAGGGTGAAAGCGACCATCCTC 3000
 CCDS41842.1 AAGTTCTCGGCCAAGCTGATGGGGCAGGCTATGGCCAAGAGGGTGAAAGCGACCATCCTC 2289
 U17327.1 AAGTTCTCGGCCAAGCTGATGGGGCAGGCTATGGCCAAGAGGGTGAAAGCGACCATCCTC 2974

NM_000620.4 TATGCCACAGAGACAGGCAAATCGCAAGCTTATGCCAAGACCTTGTGTGAGATCTTCAA 3060
 CCDS41842.1 TATGCCACAGAGACAGGCAAATCGCAAGCTTATGCCAAGACCTTGTGTGAGATCTTCAA 2349
 U17327.1 TATGCCACAGAGACAGGCAAATCGCAAGCTTATGCCAAGACCTTGTGTGAGATCTTCAA 3034

NM_000620.4 CACGCCTTTGATGCCAAGGTGATGTCCATGGAAGAATATGACATTGTGCACCTGGAACAT 3120
 CCDS41842.1 CACGCCTTTGATGCCAAGGTGATGTCCATGGAAGAATATGACATTGTGCACCTGGAACAT 2409
 U17327.1 CACGCCTTTGATGCCAAGGTGATGTCCATGGAAGAATATGACATTGTGCACCTGGAACAT 3094

NM_000620.4 GAAACTCTGGTCCTTGTGGTCACCAGCACCTTTGGCAATGGAGATCCCCCTGAGAATGGG 3180
 CCDS41842.1 GAAACTCTGGTCCTTGTGGTCACCAGCACCTTTGGCAATGGAGATCCCCCTGAGAATGGG 2469
 U17327.1 GAAACTCTGGTCCTTGTGGTCACCAGCACCTTTGGCAATGGAGATCCCCCTGAGAATGGG 3154

NM_000620.4 GAGAAATTCGGCTGTGCTTTGATGGAAATGAGGCACCCCAACTCTGTGCAGGAAGAAAGG 3240
 CCDS41842.1 GAGAAATTCGGCTGTGCTTTGATGGAAATGAGGCACCCCAACTCTGTGCAGGAAGAAAGG 2529
 U17327.1 GAGAAATTCGGCTGTGCTTTGATGGAAATGAGGCACCCCAACTCTGTGCAGGAAGAAAGG 3214

NM_000620.4 AAGAGCTACAAGGTCCGATTTCAACAGCGTCTCCTCCTACTCTGACTCCCAAAAATCATCA 3300
 CCDS41842.1 AAGAGCTACAAGGTCCGATTTCAACAGCGTCTCCTCCTACTCTGACTCCCAAAAATCATCA 2589
 U17327.1 AAGAGCTACAAGGTCCGATTTCAACAGCGTCTCCTCCTACTCTGACTCCCAAAAATCATCA 3274

NM_000620.4 GGCATGGGCCCCGACCTCAGAGACAACCTTTGAGAGTGCTGGACCCCTGGCCAATGTGAGG 3360
 CCDS41842.1 GGCATGGGCCCCGACCTCAGAGACAACCTTTGAGAGTGCTGGACCCCTGGCCAATGTGAGG 2649
 U17327.1 GGCATGGGCCCCGACCTCAGAGACAACCTTTGAGAGTGCTGGACCCCTGGCCAATGTGAGG 3334

NM_000620.4 TTCTCAGTTTTTGGCCTCGGCTCACGAGCATAACCTCACTTTTGGCCCTTCGGACACGCT 3420
 CCDS41842.1 TTCTCAGTTTTTGGCCTCGGCTCACGAGCATAACCTCACTTTTGGCCCTTCGGACACGCT 2709
 U17327.1 TTCTCAGTTTTTGGCCTCGGCTCACGAGCATAACCTCACTTTTGGCCCTTCGGACACGCT 3394

NM_000620.4 GTGGACACCCCTCCTGGAAGAAGTGGGAGGGGAGAGGATCCTGAAGATGAGGGAAGGGGAT 3480
 CCDS41842.1 GTGGACACCCCTCCTGGAAGAAGTGGGAGGGGAGAGGATCCTGAAGATGAGGGAAGGGGAT 2769
 U17327.1 GTGGACACCCCTCCTGGAAGAAGTGGGAGGGGAGAGGATCCTGAAGATGAGGGAAGGGGAT 3454

NM_000620.4 GAGCTCTGTGGGCAGGAAGAGGCTTTCAGGACCTGGGCCAAGAAGGCTTCAAGGCAGCC 3540
 CCDS41842.1 GAGCTCTGTGGGCAGGAAGAGGCTTTCAGGACCTGGGCCAAGAAGGCTTCAAGGCAGCC 2829
 U17327.1 GAGCTCTGTGGGCAGGAAGAGGCTTTCAGGACCTGGGCCAAGAAGGCTTCAAGGCAGCC 3514

NM_000620.4 TGTGATGTCTTCTGTGTGGGAGATGATGTCAACATTGAAAAGGCCAACAATTCCTCATC 3600
 CCDS41842.1 TGTGATGTCTTCTGTGTGGGAGATGATGTCAACATTGAAAAGGCCAACAATTCCTCATC 2889
 U17327.1 TGTGATGTCTTCTGTGTGGGAGATGATGTCAACATTGAAAAGGCCAACAATTCCTCATC 3574

NM_000620.4 AGCAATGATCGCAGCTGGAAGAGAAACAAGTTCGCCTCACCTTTGTGGCCGAAGCTCCA 3660
 CCDS41842.1 AGCAATGATCGCAGCTGGAAGAGAAACAAGTTCGCCTCACCTTTGTGGCCGAAGCTCCA 2949
 U17327.1 AGCAATGATCGCAGCTGGAAGAGAAACAAGTTCGCCTCACCTTTGTGGCCGAAGCTCCA 3634

NM_000620.4 GAACTCACACAAGGTCTATCCAATGTCCACAAAAGCGAGTCTCAGCTGCCCGGCTCCTT 3720
 CCDS41842.1 GAACTCACACAAGGTCTATCCAATGTCCACAAAAGCGAGTCTCAGCTGCCCGGCTCCTT 3009
 U17327.1 GAACTCACACAAGGTCTATCCAATGTCCACAAAAGCGAGTCTCAGCTGCCCGGCTCCTT 3694

NM_000620.4 AGCCGTCAAACCTCCAGAGCCCTAAATCCAGTCGGTCAACTATCTTCGTGCGTCTCCAC 3780
 CCDS41842.1 AGCCGTCAAACCTCCAGAGCCCTAAATCCAGTCGGTCAACTATCTTCGTGCGTCTCCAC 3069
 U17327.1 AGCCGTCAAACCTCCAGAGCCCTAAATCCAGTCGGTCAACTATCTTCGTGCGTCTCCAC 3754

NM_000620.4 ACCAACGGGAGCCAGGAGCTGCAGTACCAGCCTGGGGACCACCTGGGTGTCTTCCTGGC 3840
 CCDS41842.1 ACCAACGGGAGCCAGGAGCTGCAGTACCAGCCTGGGGACCACCTGGGTGTCTTCCTGGC 3129
 U17327.1 ACCAACGGGAGCCAGGAGCTGCAGTACCAGCCTGGGGACCACCTGGGTGTCTTCCTGGC 3814

NM_000620.4 AACCCAGGAGCCTCGTGAATGCCTGATCGAGCGGCTGGAGGACGCGCCGCTGTCAAC 3900
 CCDS41842.1 AACCCAGGAGCCTCGTGAATGCCTGATCGAGCGGCTGGAGGACGCGCCGCTGTCAAC 3189
 U17327.1 AACCCAGGAGCCTCGTGAATGCCTGATCGAGCGGCTGGAGGACGCGCCGCTGTCAAC 3874

NM_000620.4 CAGATGGTGAAAGTGGAAGTGCCTGGAGGAGCGGAACACGGCTTTAGGTGTCATCAGTAAC 3960
 CCDS41842.1 CAGATGGTGAAAGTGGAAGTGCCTGGAGGAGCGGAACACGGCTTTAGGTGTCATCAGTAAC 3249
 U17327.1 CAGATGGTGAAAGTGGAAGTGCCTGGAGGAGCGGAACACGGCTTTAGGTGTCATCAGTAAC 3934

NM_000620.4 TGGACAGACGAGCTCCGCCTCCCGCCCTGCACCATCTTCCAGGCCTTCAAGTACTACCTG 4020
 CCDS41842.1 TGGACAGACGAGCTCCGCCTCCCGCCCTGCACCATCTTCCAGGCCTTCAAGTACTACCTG 3309
 U17327.1 TGGACAGACGAGCTCCGCCTCCCGCCCTGCACCATCTTCCAGGCCTTCAAGTACTACCTG 3994

NM_000620.4 GACATCACCACGCCACCAACGCCTCTGCAGCTGCAGCAGTTTGCCTCCCTAGCTACCAGC 4080
 CCDS41842.1 GACATCACCACGCCACCAACGCCTCTGCAGCTGCAGCAGTTTGCCTCCCTAGCTACCAGC 3369
 U17327.1 GACATCACCACGCCACCAACGCCTCTGCAGCTGCAGCAGTTTGCCTCCCTAGCTACCAGC 4054

NM_000620.4 GAGAAGGAGAAGCAGCGTCTGCTGGTCCCTCAGCAAGGGTTTGCAGGAGTACGAGGAATGG 4140
 CCDS41842.1 GAGAAGGAGAAGCAGCGTCTGCTGGTCCCTCAGCAAGGGTTTGCAGGAGTACGAGGAATGG 3429
 U17327.1 GAGAAGGAGAAGCAGCGTCTGCTGGTCCCTCAGCAAGGGTTTGCAGGAGTACGAGGAATGG 4114

NM_000620.4 AAATGGGGCAAGAACCCACCATCGTGGAGGTGCTGGAGGAGTTCCCATCTATCCAGATG 4200
 CCDS41842.1 AAATGGGGCAAGAACCCACCATCGTGGAGGTGCTGGAGGAGTTCCCATCTATCCAGATG 3489
 U17327.1 AAATGGGGCAAGAACCCACCATCGTGGAGGTGCTGGAGGAGTTCCCATCTATCCAGATG 4174

NM_000620.4 CCGGCCACCCTGCTCCTGACCCAGCTGTCCCTGCTGCAGCCCCGCTACTATTCCATCAGC 4260
 CCDS41842.1 CCGGCCACCCTGCTCCTGACCCAGCTGTCCCTGCTGCAGCCCCGCTACTATTCCATCAGC 3549
 U17327.1 CCGGCCACCCTGCTCCTGACCCAGCTGTCCCTGCTGCAGCCCCGCTACTATTCCATCAGC 4234

NM_000620.4 TCCTCCCCAGACATGTACCCTGATGAAGTGCACCTCACTGTGGCCATCGTTTCCCTACCGC 4320
 CCDS41842.1 TCCTCCCCAGACATGTACCCTGATGAAGTGCACCTCACTGTGGCCATCGTTTCCCTACCGC 3609
 U17327.1 TCCTCCCCAGACATGTACCCTGATGAAGTGCACCTCACTGTGGCCATCGTTTCCCTACCGC 4294

NM_000620.4 ACTCGAGATGGAGAAGGACCAATTCACCACGGCGTATGCTCCTCCTGGCTCAACCGGATA 4380
 CCDS41842.1 ACTCGAGATGGAGAAGGACCAATTCACCACGGCGTATGCTCCTCCTGGCTCAACCGGATA 3669
 U17327.1 ACTCGAGATGGAGAAGGACCAATTCACCACGGCGTATGCTCCTCCTGGCTCAACCGGATA 4354

NM_000620.4 CAGGCTGACGAACTGGTCCCCTGTTTCGTGAGAGGAGCACCAGCTTCCACCTGCCCCGG 4440
 CCDS41842.1 CAGGCTGACGAACTGGTCCCCTGTTTCGTGAGAGGAGCACCAGCTTCCACCTGCCCCGG 3729
 U17327.1 CAGGCTGACGAACTGGTCCCCTGTTTCGTGAGAGGAGCACCAGCTTCCACCTGCCCCGG 4414

NM_000620.4 AACCCCCAAGTCCCCTGCATCCTCGTTGGACCAGGCACCGGCATTGCCCTTTCCGAAGC 4500
 CCDS41842.1 AACCCCCAAGTCCCCTGCATCCTCGTTGGACCAGGCACCGGCATTGCCCTTTCCGAAGC 3789
 U17327.1 AACCCCCAAGTCCCCTGCATCCTCGTTGGACCAGGCACCGGCATTGCCCTTTCCGAAGC 4474

NM_000620.4	TTCTGGCAACAGCGGCAATTTGATATCCAACACAAAGGAATGAACCCCTGCCCATGGTC	4560
CCDS41842.1	TTCTGGCAACAGCGGCAATTTGATATCCAACACAAAGGAATGAACCCCTGCCCATGGTC	3849
U17327.1	TTCTGGCAACAGCGGCAATTTGATATCCAACACAAAGGAATGAACCCCTGCCCATGGTC	4534

NM_000620.4	CTGGTCTTCGGGTGCCGGCAATCCAAGATAGATCATATCTACAGGGAAGAGACCCCTGCAG	4620
CCDS41842.1	CTGGTCTTCGGGTGCCGGCAATCCAAGATAGATCATATCTACAGGGAAGAGACCCCTGCAG	3909
U17327.1	CTGGTCTTCGGGTGCCGGCAATCCAAGATAGATCATATCTACAGGGAAGAGACCCCTGCAG	4594

NM_000620.4	GCCAAGAACAAGGGGTCTTCAGAGAGCTGTACACGGCTTACTCCCGGGAGCCAGACAAA	4680
CCDS41842.1	GCCAAGAACAAGGGGTCTTCAGAGAGCTGTACACGGCTTACTCCCGGGAGCCAGACAAA	3969
U17327.1	GCCAAGAACAAGGGGTCTTCAGAGAGCTGTACACGGCTTACTCCCGGGAGCCAGACAAA	4654

NM_000620.4	CCAAAGAAGTACGTGCAGGACATCCTGCAGGAGCAGCTGGCGGAGTCTGTGTACCGAGCC	4740
CCDS41842.1	CCAAAGAAGTACGTGCAGGACATCCTGCAGGAGCAGCTGGCGGAGTCTGTGTACCGAGCC	4029
U17327.1	CCAAAGAAGTACGTGCAGGACATCCTGCAGGAGCAGCTGGCGGAGTCTGTGTACCGAGCC	4714

NM_000620.4	CTGAAGGAGCAAGGGGGCCACATATACGTCTGTGGGGACGTCACCATGGCTGCTGATGTC	4800
CCDS41842.1	CTGAAGGAGCAAGGGGGCCACATATACGTCTGTGGGGACGTCACCATGGCTGCTGATGTC	4089
U17327.1	CTGAAGGAGCAAGGGGGCCACATATACGTCTGTGGGGACGTCACCATGGCTGCTGATGTC	4774

NM_000620.4	CTCAAAGCCATCCAGCGCATCATGACCCAGCAGGGGAAGCTCTCGGCAGAGGACGCCGGC	4860
CCDS41842.1	CTCAAAGCCATCCAGCGCATCATGACCCAGCAGGGGAAGCTCTCGGCAGAGGACGCCGGC	4149
U17327.1	CTCAAAGCCATCCAGCGCATCATGACCCAGCAGGGGAAGCTCTCGGCAGAGGACGCCGGC	4834

NM_000620.4	GTATTCATCAGCCGGATGAGGGATGACAACCGATACCATGAGGATATTTTGGAGTCACC	4920
CCDS41842.1	GTATTCATCAGCCGGATGAGGGATGACAACCGATACCATGAGGATATTTTGGAGTCACC	4209
U17327.1	GTATTCATCAGCCGGATGAGGGATGACAACCGATACCATGAGGATATTTTGGAGTCACC	4894

NM_000620.4	CTGCGAACGTACGAAGTGACCAACCGCCTTAGATCTGAGTCCATTGCCTTCATTGAAGAG	4980
CCDS41842.1	CTGCGAACGTACGAAGTGACCAACCGCCTTAGATCTGAGTCCATTGCCTTCATTGAAGAG	4269
U17327.1	CTGCGAACGTACGAAGTGACCAACCGCCTTAGATCTGAGTCCATTGCCTTCATTGAAGAG	4954

NM_000620.4	AGCAAAAAAGACACCGATGAGGTTTTTCAGCTCCTAACTGGACCCCTTTGCCAGCCGGCT	5040
CCDS41842.1	AGCAAAAAAGACACCGATGAGGTTTTTCAGCTCCTAA-----	4305
U17327.1	AGCAAAAAAGACACCGATGAGGTTTTTCAGCTCCTAACTGGACCCCTTTGCCAGCCGGCT	5014

Os asteriscos indicam identidade entre a sequência de consenso CCDS41842.1 e as demais sequências representativas de nNOS.