

LUDMYLLA COSTA CUNHA

Interferência de RNA direcionada ao canal de potássio
Eag1 – efeitos sobre a expressão gênica e viabilidade
celular do glioma

Brasília 2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUDMYLLA COSTA CUNHA

Interferência de RNA direcionada ao canal de potássio
Eag1 – efeitos sobre a expressão gênica e viabilidade
celular do glioma

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida

Brasília 2012

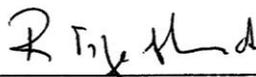
LUDMYLLA COSTA CUNHA

INTERFERÊNCIA DE RNA DIRECIONADA AO CANAL DE POTÁSIO EAG1 –
EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA E VIABILIDADE CELULAR DO GLIOMA

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Aprovada em 02 de AGOSTO de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida
Universidade de Brasília



Prof. Dra. Cilene Lino de Oliveira
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dra. Ana Carolina Mortari
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Ricardo Titze pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e pela dedicada orientação.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica, Cátia Lustosa, Fernando Resende e Simoneide Silva, que contribuíram para a realização desta pesquisa com conhecimento, apoio e amizade. E àqueles que fazem ou fizeram parte do grupo e que, de certa forma, deixaram a sua contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários e técnicos que contribuíram para o bom funcionamento do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica, garantindo um ambiente funcional para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais, Luiz Gonzaga e Elizete, e ao meu irmão Frederico, pelo constante amor e incentivo dedicados.

Aos queridos amigos e àqueles que estiveram ao meu lado durante esta jornada.

RESUMO

Gliomas representam o tipo de tumor cerebral primário de maior malignidade. Entre as alterações que conferem competência tumoral ao glioma, está o aumento na expressão do canal de potássio hEag1. Na última década, a interferência de RNA (RNAi) tem se destacado como técnica para estudo da função de genes em mamíferos, via silenciamento gênico pós-transcricional. Neste sentido, a técnica de RNAi foi utilizada no atual estudo para silenciar o gene Eag1 em células de glioma. Na primeira etapa deste projeto, foram identificados alvos para RNAi na região codante do gene hEag1 (NM_172362.2), via algoritmo baseado em redes neurais artificiais. Foram identificados 25 alvos de RNAi, com escores variando de 0,82 a 0,87, e selecionados para o atual estudo os dois alvos com maiores escores. Foi realizada síntese química de siRNAs para estes alvos situados nos exons 2 e 8, daí a denominação e2_hEag1 e e8_hEag1. Também foram sintetizados o siRNA controle positivo descrito anteriormente Kv10.1-3 e o controle negativo scramble (Qiagen). Foi inicialmente determinado o ponto temporal (4h, 8h, ou 48h) e a concentração (18,75 nM, 37,5 nM ou 75,0 nM) de maior silenciamento de hEag1, utilizando-se os siRNAs controles transfectados em lipossomas catiônicos. O maior silenciamento foi observado no tempo de 8h pós-transfecção, na menor dosagem testada, 18,75 nM. Nesta condição experimental, foi testado o grau de silenciamento de Eag1 causado pelos dois novos siRNAs, em comparação com o controle positivo Kv10.1-3. Ambos siRNAs desenhados no atual estudo - e2_hEag1 e e8_hEag1 - foram mais efetivos que o controle positivo Kv10.1-3, reduzindo assim o conteúdo relativo de hEag1 em 0,46 vezes e 0,52 vezes, respectivamente, em relação ao valor obtido no controle negativo scramble ($p < 0,05$). Na última etapa deste estudo, foi avaliado se vetores de expressão de *short hairpins* RNAs (shRNA) direcionados ao alvo 5' - GTCCACTTGGTCCATGTCCAG - 3' do controle positivo Kv10.1-3 (pKv10.1-3hum_LI), causariam alteração de fenótipo celular, ou seja, redução da viabilidade dos gliomas. O efeito destes vetores de expressão (pKv10.1-3hum_LI ou pScramble, dose de 0,2 µg) sobre a viabilidade de gliomas, em uso isolado ou em combinação com interferon gama (IFN-γ, 25 ng/mL), foi testado pelo ensaio de MTT. A redução de viabilidade obtida com a combinação do vetor pKv10.1-3hum_LI e IFN-γ (40,4%) foi superior àquela obtida com o uso isolado de ambos, 16,0% e 11,4%, nesta ordem ($p < 0,05$). Este efeito sinérgico não foi observado com o vetor controle negativo pScramble, o que indica tratar-se de efeito sequência-específico, ou seja, dependente da sequência do shRNA expresso pelo vetor pKv10.1-3hum_LI. Em síntese, o presente estudo mostra que é possível silenciar a expressão de hEag1 de gliomas via siRNAs sintéticos. Além disto, revela a importância de hEag1 para a viabilidade celular do glioma, principalmente durante a injúria por IFN-γ. No sentido tecnológico, o atual estudo apresenta um protocolo inovador com potencial uso na terapêutica de gliomas, baseado na associação de RNAi sobre hEag1 com o agente imunomodulador IFN-γ.

Palavras-chave: glioma, canal de potássio, silenciamento gênico, RNAi, hEag1, siRNA, viabilidade celular.

ABSTRACT

Glioma is the most common type of primary malignant brain tumor. The disease presents poor clinical outcome and the treatment is essentially palliative. Among the genetic changes that confer capability to tumor cells is the hEag1 gene overexpression. RNA interference (RNAi) has rapidly advanced into a practical technique for mammalian gene function studies, through post-transcriptional genetic silencing. The technique was used in the present study to silence hEag1 gene in glioma cells in culture. We first identified RNAi targets in the coding region of hEag1 (NM_172362.2) by using algorithms based on artificial neural networks. Twenty-five hEag1 RNAi targets were found, with scores ranging from 0.82 to 0.87; the two highest rated were selected. They were chemically synthesized as short interfering RNAs (siRNAs), and designated e2_hEag1 and e8_hEag1, according to the targeted exon. Positive and negative siRNA controls were the previously published Kv10.1-3, and the scramble All Star (Qiagen), respectively. We first determined the time-point (4h, 8h, or 48h) and siRNA concentration (18.75 nM, 37.5 nM, or 75.0 nM) that provide the highest silencing effect, by using RT-qPCR. The best hEag1 knock-down occurred at 8h post-transfection with 18.75 nM siRNA concentration. We used this experimental condition to compare the two new siRNAs – e2_hEag1 and e8_hEag1 – with the positive control Kv10.1-3. Both siRNAs in test produced higher silencing effects compared to Kv10.1-3 ($p < 0.05$). The mRNA fold decrease varied from 0.46 to 0.52, according to each transfected siRNA e2_hEag1 or e8_hEag1, respectively. Finally, we evaluated whether an expressed short hairpin RNA (shRNA) to the same hEag1 Kv10.1-3 target sequence (5'- GTCCACTTGGTCCATGTCCAG – 3') would decrease the glioma cell viability. The expression vectors (pKv10.1-3hum_LI or a scramble control one – pScramble, dose 0.2 μ g) were transfected into glioma cells, with or without interferon gamma concurrent treatment (IFN- γ , 25 ng/mL). The cell viability was determined by MTT assay. The association of the vector pKv10.1-3hum_LI and IFN- γ decreased the glioma cell viability to 40.4%, which surpassed the results obtained from their isolate use, 16.0% and 11.4%, respectively ($p < 0.05$). As pScramble showed no synergism with IFN- γ , we consider the pKv10.1-3hum_LI effects were sequence-specific. In conclusion, this study showed the ability of two unpublished siRNAs to knock-down hEag1. Our results are in agreement with previous data that established a role for Eag1 in the tumor cell viability. This role seems to be even more important during IFN- γ injury. Regarding to biotechnology, this study presents an innovative treatment able to reduce the glioma cell viability, based on the association of shRNA expression vector to hEag1 and the immunomodulatory agent IFN- γ .

Key-words: glioma, potassium channel, gene silencing, hEag1, siRNA, RNAi, cell viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo de interferência de RNA	14
Figura 2 Fluxograma dos procedimentos experimentais	19
Figura 3 Efeito do siRNA Kv10.1-3 sobre o conteúdo de RNAm hEag1	33
Figura 4 Redução do conteúdo relativo de RNAm hEag1 via siRNAs sintéticos	34
Figura 5 Efeitos de tratamentos com vetor de expressão de shRNA e/ou IFN- γ	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 <i>Primers</i> utilizados na quantificação relativa da expressão de hEag1	26
Tabela 2 Genes endógenos testados na quantificação relativa da expressão gênica de hEag1	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCRJ- Banco de células do Rio de Janeiro
BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool*
cDNA- DNA complementar
DMEM- *Dulbecco's Modified Medium*
DNA- Ácido desoxirribonucléico
DPBS- *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
dsRNA- *Double stranded RNA*
EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético
hEag1- *human ether-à-go-go 1*
HIV- vírus da imunodeficiência humana
HPV- papilomavírus humano
INCA- Instituto Nacional do Câncer
INF- γ - Interferon gama
KCNH1- *potassium channel 1*
MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo
NCBI- *National Center for Bitechology Information*
OMS- Organização Mundial da Saúde
PAPOLA- *Poly(A) polymerase alpha*
PCR- Reação da polimerização em cadeia
RCBP- Registro de câncer de base populacional
RISC- *RNA Interference Specificity Complex*
RNA- Ácido ribonucléico
RNAi- Interferência de RNA
RNAm- RNA mensageiro
RT-qPCR- *Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*
shRNA- *short hairpin RNA*
siRNA- *short interfering RNA*
STAT3- transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

SUMÁRIO

1. Introdução	10
1.1 Canal de potássio dependente de voltagem <i>ether à go-go</i>	10
1.2 Interferência de RNA como método de terapia gênica	11
1.2.1 Mecanismos de interferências de RNA mediado por siRNA sintéticos	13
1.2.2 Vetores de expressão de <i>short hairpin</i> RNA (shRNA)	13
1.3 Gliomas – tumores do Sistema Nervoso Central	15
2. Objetivos	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. Métodos	18
3.1 Análise de sequências de hEag1 e identificação de alvos para RNAi	20
3.1.1 Obtenção da sequência nucleotídica de hEag1 para posterior identificação de alvos de RNAi	20
3.1.2 Seleção de alvos de RNAi sobre o RNAm do canal de potássio hEag1	20
3.1.3 Síntese química de <i>short interfering</i> RNA (siRNAs)	21
3.2 Cultura de gliomas e transfecção com siRNAs sintéticos	21
3.2.1 Cultivo celular de gliomas	22
3.2.2 Transfecção de gliomas em cultura com siRNAs sintéticos direcionados a hEag1	22
3.3 Quantificação do silenciamento gênico de hEag1	23
3.3.1 Extração de RNA total e análise de sua integridade	23
3.3.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)	24
3.3.3 PCR em tempo real ou RT-qPCR	24
3.3.3.1 Seleção de <i>primers</i> para amplificação de hEag1 por RT-qPCR	24
3.3.3.2 Seleção de genes endógenos ou genes de referência	25
3.3.3.3 Quantificação do conteúdo relativo de RNAm de hEag1	26
3.4 Determinação da viabilidade celular de gliomas por ensaio com MTT	28
3.4.1 Grupos experimentais	28
3.4.2 Obtenção de vetores de expressão de <i>short hairpin</i> RNA	29
3.4.3 Estudo do efeito do vetor de expressão de shRNA sobre a viabilidade de gliomas	30
4 Resultados	31
4.1 Identificação das sequências alvo	31
4.2 Eficiência na extração de RNA e transcrição reversa	31
4.3 Silenciamento de hEag1 via siRNAs sintéticos	32
4.4 Redução da viabilidade celular de gliomas por vetor de expressão de shRNA	35
5 Discussão	37
6 Conclusões	43
Referências	44
Anexos	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 CANAL DE POTÁSSIO DEPENDENTE DE VOLTAGEM *ETHER À GO-GO* (Eag)

Os canais iônicos de membrana constituem numeroso grupo de proteínas que exercem papéis importantes em processos fisiológicos e patológicos [1]. Neste grupo encontra-se a família dos canais de potássio dependentes de voltagem (Kv), objeto do presente estudo. Os canais de potássio estão envolvidos na geração do potencial de ação, na sinapse de células excitáveis e contribuem para o estabelecimento do potencial de repouso da membrana, seja em células excitáveis ou não [2,3]. Há muito se sabe que canais iônicos têm participação ativa no processo de proliferação celular [4]. Quanto ao câncer, há evidências de que canais de potássio dependentes de voltagem são excessivamente expressos em vários tipos de neoplasias e, portanto, podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento tumoral [4,5].

O primeiro canal de potássio implicado na oncogênese foi o *ether-à-go-go1*(Eag1, KCNH1 ou Kv 10.1) [1], codificado pelo gene KCNH1 [3]. Este canal de potássio Eag1 foi inicialmente identificado em *Drosophila melanogaster* [6] e é o primeiro membro descrito da família Eag [7]. O canal Eag1, em humanos, é expresso de forma restrita nas células excitáveis do tecido nervoso e, de forma discreta, em tecidos periféricos [4,8,9]. O padrão de expressão dos canais Eag1 varia ao longo do ciclo celular [10] e sua superexpressão confere à célula atipia característica de neoplasia [7,11], com mudanças na atividade e/ou na expressão que podem levar a uma alteração no transporte de íons através da membrana [4].

A presença de canais Eag1 vem sendo observada em neoplasias humanas de diversas origens, incluindo câncer de mama [12], cólon, próstata [4,8], carcinoma cervical, neuroblastoma e melanoma [8,9,13]. Na carcinogênese, o Eag1 potencializa a proliferação celular e é necessário para a manutenção da vida da célula. Portanto, é potencial alvo para agentes terapêuticos e pode servir, também, como um marcador para diagnóstico e prognóstico [3,4,5,9].

Muitos estudos acerca da função oncogênica do Eag1 têm sido feitos para elucidar a sua participação na proliferação celular [1,3,4]. Este conhecimento permitiria desenvolver terapias voltadas para inibição da atividade do Eag1, diminuindo, assim, o potencial proliferativo de células neoplásicas. Alguns fármacos que modulam canais de potássio são capazes de inibir a atividade do Eag1 [5,9], contudo a ação bloqueadora é inespecífica. A inibição com anticorpos monoclonais é mais seletiva, porém menos eficaz [1,3]. Desta forma, a falta de bloqueadores seletivos e eficazes na terapia anti-Eag1 leva à demanda para o desenvolvimento de novas estratégias de inibição, como a tecnologia da interferência de RNA (RNAi).

Atualmente, é possível encontrar na literatura diversos trabalhos que relacionam o canal Eag1 a tumores malignos [1,8,9,12] e ainda estudos sobre terapia gênica via RNAi para neoplasias [14,15,16], porém nenhum menciona o uso desta técnica para inibição deste alvo em gliomas, intuito da atual pesquisa.

1.2 INTERFERÊNCIA DE RNA COMO MÉTODO DE TERAPIA GÊNICA

O primeiro protocolo clínico de terapia gênica em humanos foi realizado nos Estados Unidos, no início da década de 1990 [14,15]. Esta terapia baseia-se na transferência de ácidos nucleicos para células somáticas, com o objetivo de corrigir desordens genéticas [15,16]. Desde 1989, mais de 900 testes clínicos com uso da terapia gênica já foram aprovados em todo o mundo e cerca de 70% foram realizados na terapia do câncer [15]. Os principais alvos para a terapia do câncer são os conhecidos oncogenes e genes que possam estar envolvidos com a angiogênese, metástase, mecanismo antiapoptótico, ou seja, aqueles cuja superexpressão resulte em proteínas funcionalmente relevantes para o desenvolvimento do tumor. A escolha do alvo deve considerar também que o produto gênico seja expresso em níveis insignificantes em tecido normal, para evitar efeitos colaterais [17]. O sucesso parcial desses protocolos tem causado grande excitação na comunidade científica, levando ao desenvolvimento de pesquisas e inventos biotecnológicos para uso da terapia gênica. O sequenciamento do genoma humano, finalizado no início do século XXI, aliado à bioinformática, ampliou a visão

de que várias doenças humanas estavam relacionadas a defeitos em genes específicos. Assim, a possibilidade de modificar padrões de expressão gênica em um indivíduo, por meio da terapêutica baseada em ácidos nucleicos, surgiu como possibilidade de tratamento para diversos problemas de saúde [14,16].

Um estudo *in vivo* feito em camundongos adultos mostrou que células de mamíferos regulam a expressão de seus genes por meio de RNAi – um conceito de silenciamento gênico em nível pós-transcricional introduzido na década de 1990, após estudos realizados em plantas, fungos e ciliado [16,18,19]. O mecanismo de RNAi foi primeiramente descrito no nematódeo *Caenorhabditis elegans* [18] e consiste, basicamente, na degradação parcial ou total de um RNA mensageiro (RNAm), evitando que seja traduzido em proteína. Este mecanismo endógeno de interferência de RNA, que regula a expressão de um gene *in vivo* está amplamente descrito e revisado na literatura [18,21,22]. Brevemente, o mecanismo inicia com a expressão de RNA interferente em fita, que é clivado no citoplasma em fragmentos de 21-23 nucleotídeos pela enzima Dicer. Tais fragmentos são conhecidos como *short interfering RNA* (siRNA), também constituídos de duas fitas. A primeira fita (*sense*) contém sequência de nucleotídeos similar à sequência alvo do RNAm, enquanto a segunda fita (*antisense*) possui sequência nucleotídica parcialmente complementar a esta mesma sequência alvo. Estes siRNAs associam-se a proteínas citoplasmáticas, formando um complexo denominado **RNA Interference Specificity Complex** ou **RISC**. Uma enzima presente no complexo protéico RISC abre a fita dupla do siRNA, libera a fita *sense* e acopla-se apenas à fita *antisense*, cujo o papel é guiar todo o complexo até o RNAm. A fita *antisense* anela-se à sequência alvo complementar no RNAm e o mecanismo de degradação é ativado, ocorrendo, assim, o silenciamento pós-transcricional da expressão gênica [23,24].

1.2.1 Mecanismo de interferência de RNA mediado por *short interfering* RNA (siRNA) sintéticos

Experimentalmente, uma forma de mimetizar o processo biológico de RNAi descrito anteriormente é a partir da síntese de curtas moléculas de RNA fita dupla, conhecidas como siRNAs sintéticos [21,23,24]. Nestas estruturas sintéticas, a fita *antisense* possui sequência nucleotídica totalmente complementar à sequência alvo do RNAm. O uso de siRNAs sintéticos, que agem como silenciadores gênicos por meio de mecanismos de interferência de RNA destacou-se como nova abordagem terapêutica, [14,20]. A indução do mecanismo de RNAi mediado por siRNAs sintéticos é ilustrado na Figura 1A.

A interferência de RNA revelou-se uma técnica útil na pesquisa biomédica em estudos de genômica funcional. No sentido biotecnológico, siRNAs sintéticos são potenciais agentes terapêuticos para diferentes doenças, como HIV, hepatite viral, doenças metabólicas, neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer [17,25]. A versatilidade da técnica se deve à possibilidade de definir diferentes objetivos terapêuticos, em termos de linhagem celular, e em relação ao gene que se pretende regular.

1.2.2 Vetores de expressão de *short hairpin* RNA (shRNA)

Outra forma de induzir o mecanismo de RNAi, é introduzir na célula vetores de expressão, vírus ou DNA plasmidial, que se incorporam ao núcleo celular. Uma vez no núcleo, o vetor de expressão tem a sequência de interesse transcrita naturalmente pela maquinaria celular. Os transcritos são sequências de RNA fita dupla na forma de grampos daí a denominação de **short hairpin RNA (shRNA)**. O shRNA é levado ao citoplasma, onde sofre um processo de clivagem pela enzima *Dicer*, gerando curtos fragmentos de RNA fita dupla. Estes curtos fragmentos de RNA gerados são também siRNAs, formados por duas fitas de nucleotídeos complementares (fitas *sense* e *antisense*). Os siRNAs, então, associam-se ao mesmo grupo de proteínas citoplasmáticas para formar o complexo RISC, que após

liberar a fita *sense*, é guiado até o RNAm pela fita *antisense*, induzindo o processo de degradação do mesmo (Figura 1B) [24,25].

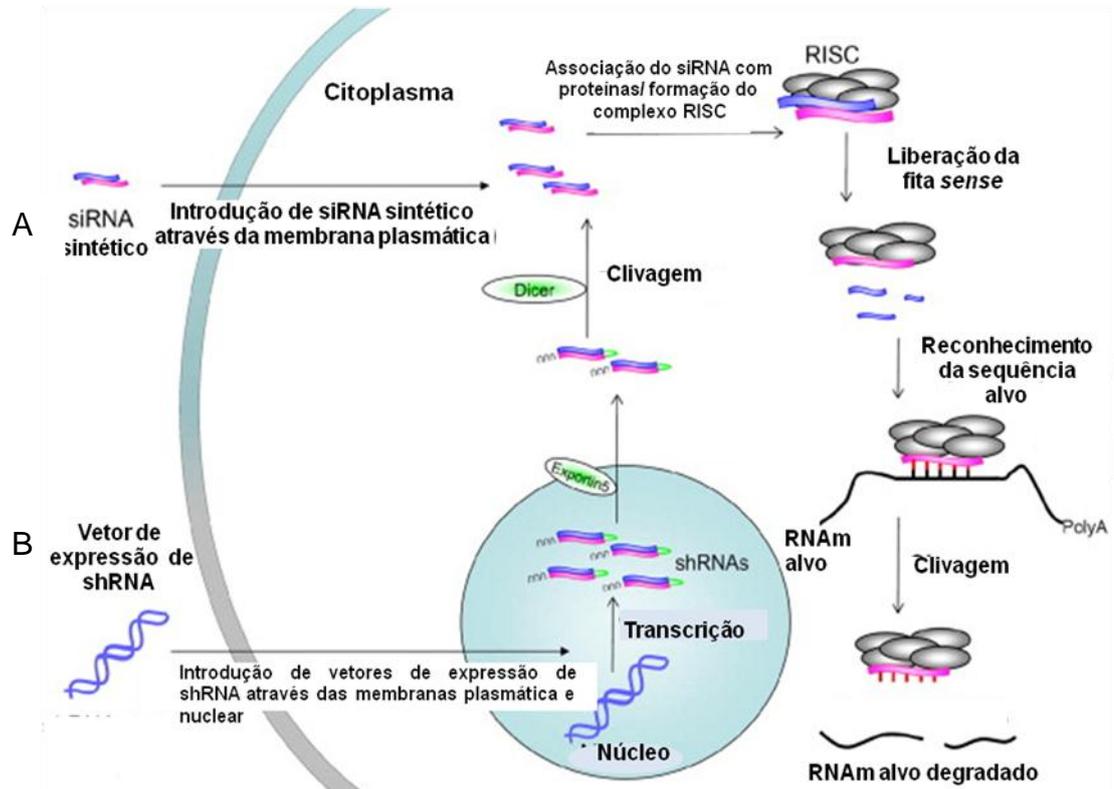


Figura 1- Mecanismo de interferência de RNA. A) Ilustração do mecanismo de interferência de RNA (RNAi) mediada por *short interfering RNA* (siRNA) sintéticos. Moléculas curtas de RNA fita dupla, também denominados siRNAs sintéticos, são transfectadas na célula. Uma vez no citoplasma, os siRNAs sintéticos associam-se a proteínas celulares, formando o complexo RISC. O complexo RISC separa as duas fitas, acoplando-se apenas à fita *antisense* que anela-se à sequência alvo no RNAm. O RNAm é então degradado, finalizando o mecanismo de interferência. B) RNAi mediada por vetores de expressão de *short harpin RNA* (shRNA). Vetores de expressão são transfectados na célula. Uma vez no núcleo, os shRNAs plasmidiais são transcritos e exportados para o citoplasma, onde sofrem clivagem pela enzima *Dicer*. Os fragmentos gerados na clivagem, os siRNAs, associam-se a proteínas celulares, formando o complexo RISC, o qual degrada o RNAm alvo (adaptada da ref. Takahashi *et al*, 2006).

Concluindo, siRNAs são estruturas genéticas capazes de interferir na expressão de genes específicos. A possibilidade de induzir este mecanismo *in vitro* e *in vivo* fez com que a metodologia do RNAi se tornasse, atualmente, uma ferramenta promissora no tratamento de doenças. Dentro deste contexto, avalia-se que a técnica de RNAi seja uma terapia em potencial para lidar com a malignidade dos gliomas, a partir da inativação de proteínas essenciais para a sobrevivência e proliferação do tumor, como por exemplo os canais de potássio dependentes de voltagem, que vem sendo relacionados com a geração, progressão e metástase de tumores, incluindo os gliomas [26,27].

1.3 GLIOMAS – TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Gliomas são tumores que se desenvolvem a partir de células da glia, tais como astrócitos, oligodendrócitos e ependimócitos [28]. A maioria dos gliomas ainda não tem sua etiologia determinada, embora alguns sejam associados com mutações somáticas adquiridas e com algumas síndromes hereditárias [26,27].

A classificação dos gliomas segue a escala de malignidade das neoplasias do sistema nervoso estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). De acordo com a OMS, os tumores variam do grau I ao IV. As neoplasias de grau I possuem baixo potencial proliferativo e possibilidade de cura após a remoção cirúrgica do tumor; as de grau II são geralmente mais invasivas e, apesar da baixa capacidade de proliferação, podem ocorrer recidivas. Os tumores de grau III tendem a progredir para o grau IV, o mais elevado na escala de malignidade. A designação de grau IV reflete grandes alterações na morfologia celular, na atividade mitótica, na vascularização e necrose, acompanhadas por evolução contínua no quadro da doença, resultando em óbito [27,29].

Dentre as neoplasias classificadas como gliomas, o grupo dos astrocitomas é o que abrange tumores de vários graus de malignidade. Faz parte deste grupo o glioblastoma (GBM), o tipo de glioma mais agressivo e frequente [26,27,29,30], que foi escolhido como modelo celular na presente pesquisa.

O glioma é o tipo mais comum dentre os tumores malignos do sistema nervoso central, representando cerca de 40% dos tumores cerebrais primários, classificando-se entre as neoplasias de pior prognóstico [26,27,29]. Um estudo realizado (2008) pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), com base em 20 registros de câncer de base populacional (RCBP) realizados em diversas regiões do Brasil, mostrou que a taxa de incidência de gliomas ajustada por idade (1 a 18 anos) variou entre 1 e 194 casos por 1.000.000 de pessoas (1996-2004), sendo o astrocitoma um dos mais incidentes. No Distrito Federal, a taxa de incidência de gliomas foi de 44 por milhão (1999-2002), sendo o astrocitoma o mais frequente [31].

O tratamento de gliomas, atualmente, inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia usadas individualmente ou combinadas de acordo com o tipo e o grau de malignidade. Contudo, o tratamento é muitas vezes paliativo, pois gliomas malignos podem ser inoperáveis; comumente requerem doses complementares de quimio-radioterapia, que podem causar danos ao tecido nervoso: edema, necrose e déficits neurológicos [27,33,34]. A imunoterapia com interferons também é utilizada no tratamento de tumores cerebrais malignos. Os interferons constituem uma grande família de proteínas com vários papéis fisiológicos, incluindo atividade antiviral, antitumoral e imunomodulatória. O imunomodulador interferon gama (IFN- γ) tem a capacidade de aumentar a imunogenicidade do tumor, interferir nos mecanismos de proliferação celular e inibir a angiogênese [32]. Estudos mostraram que IFN- γ regula a expressão de genes envolvidos na resposta imunológica antitumoral em linhagens de gliomas de murinos e humanos. Outro estudo revelou que o tratamento intratumoral com IFN- γ mediado por vetores de expressão aumentou o recrutamento de linfócitos para o sítio de localização do glioma em modelo de camundongo, porém não houve aumento na sobrevivência do animal [35,36].

Assim, nas últimas décadas, tais tratamentos têm contribuído de forma limitada para a melhora do prognóstico de pacientes com glioma o que desperta o interesse no desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas para esta neoplasia.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver protocolo experimental para o tratamento de gliomas, baseado no silenciamento gênico pós-transcricional de hEag1 via interferência de RNA.

2.2 ESPECÍFICOS

- i. Selecionar alvos para RNAi e obter estruturas genéticas capazes de silenciar hEag1;
- ii. Quantificar os efeitos de silenciamento de hEag1 via siRNA em linhagem celular de gliomas;
- iii. Determinar os efeitos de vetores de expressão de shRNA, em uso isolado ou associados ao IFN- γ , sobre a viabilidade celular de linhagem de gliomas.

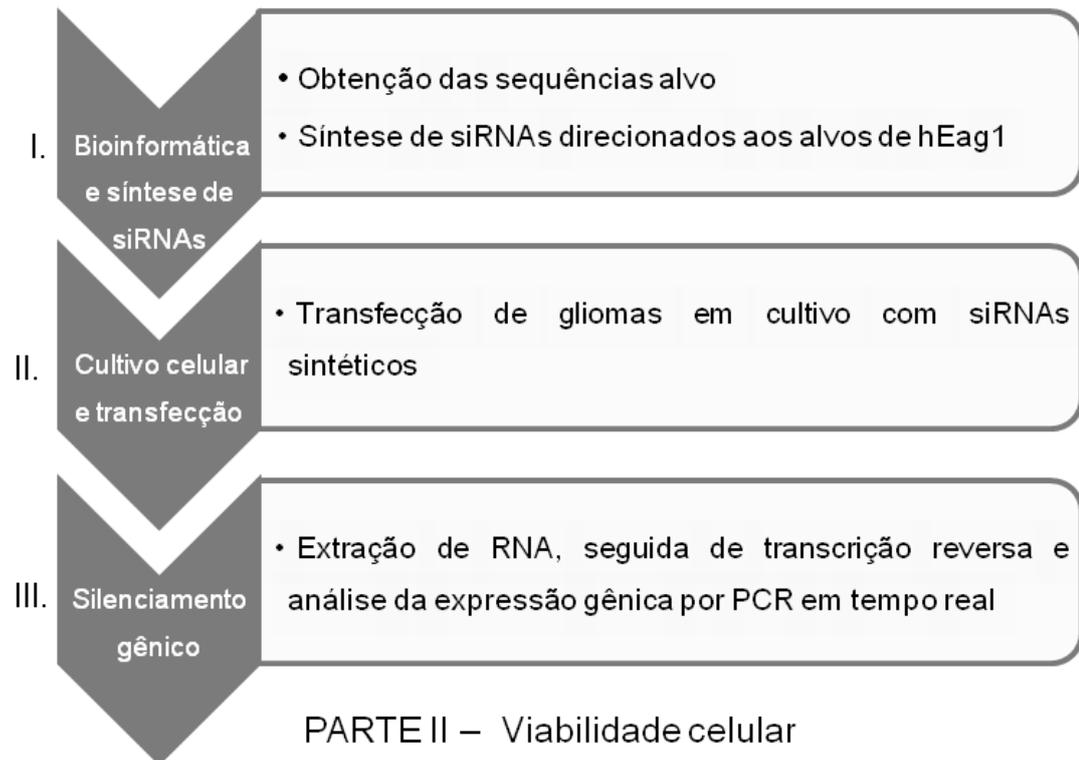
3 MÉTODOS

A atual pesquisa foi organizada em duas partes experimentais. A primeira parte estudou o efeito de RNAi sobre a expressão gênica de hEag1, enquanto a segunda, determinou o efeito de RNAi sobre a viabilidade celular de gliomas.

A primeira parte da pesquisa foi subdividida em três etapas: inicialmente, realizou-se um trabalho de bioinformática para análise das sequências de cDNA correspondentes ao RNAm de hEag1 e para identificação de sequências alvo para RNAi. A estratégia utilizada para escolher o alvo específico de RNAi foi selecionar a região codante do gene hEag1, evitando-se alvos situados em regiões que apresentassem mutações. Em seguida, as sequências alvo selecionadas foram utilizadas na síntese de siRNAs. Na segunda etapa, células de glioma foram cultivadas e transfectadas com siRNAs sintéticos estruturados em lipossomas catiônicos. Na terceira etapa, o grau de silenciamento de hEag1 foi quantificado por PCR em tempo real (RT-qPCR), após extração de amostras de RNA, seguida de transcrição reversa.

A segunda parte do presente trabalho iniciou com a obtenção de vetores de expressão de shRNA, utilizados para induzir o mecanismo de interferência nas células de glioma. Em seguida, grupos de gliomas foram transfectados com vetores de shRNA estruturados em lipossomas catiônicos. Finalmente, foram feitos ensaios de MTT, para determinar o efeito de vetores de expressão de shRNA sobre viabilidade de gliomas *in vitro*, em uso isolado ou associados ao IFN- γ . A viabilidade celular foi medida por espectrofotometria.

PARTE I – Expressão gênica



PARTE II – Viabilidade celular

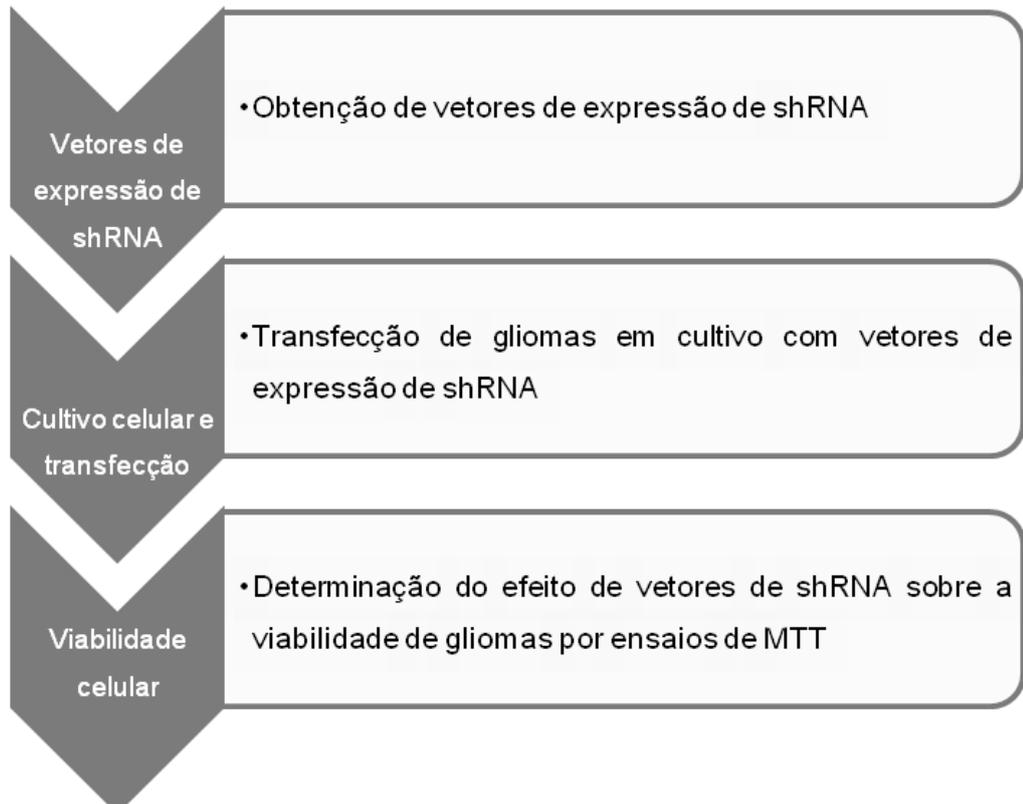


Figura 2- Fluxograma dos procedimentos experimentais.

PARTE I — Expressão gênica

ETAPA I – Bioinformática e síntese de siRNAs

3.1 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE hEAG1 E IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS PARA INTERFERÊNCIA DE RNA

3.1.1 Obtenção da sequência nucleotídica de Eag1 para posterior identificação de alvos de RNAi

A sequência de nucleotídeos de cDNA correspondente ao RNAm de Eag1 foi obtida no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com acesso via endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Foi selecionada a sequência NM_172362.2 (Entrez GeneID) para a busca dos alvos de RNAi, no seguinte endereço na Internet: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_172362.2. Estes alvos foram utilizados para desenhar as sequências de siRNAs sintéticos e a sequência dos insertos para clonagem, conforme descrito a seguir.

3.1.2 Seleção de alvos de RNAi sobre o RNAm do canal de potássio hEag1

Os alvos para interferência de RNA sobre hEag1 foram obtidos mediante o algoritmo Biopredsi, que se fundamenta em redes neurais artificiais (Huesken *et al. Nat Biotechnol* 23:995-1001, 2005). Para a busca das sequências alvo para RNAi, foram considerados os nucleotídeos somente da região codante do RNAm de Eag1, neste caso dos exons 1 a 10.

3.1.3 Síntese química de *short interfering* RNA (siRNAs)

Para obtenção de siRNAs, utilizou-se o método descrito a seguir. A partir da sequência *antisense* (siRNA *guide strand*) obtida no Biopredsi, obteve-se a sequência complementar reversa via *software* disponível em <http://www.vivo.colostate.edu/molkit/>, que corresponde à sequência alvo de RNAi. Para obtenção dos *overhangs*, foram retirados dois nucleotídeos na posição 5' da fita *sense* e acrescentados dois deoxinucleotídeos de timina na extremidade 3' da mesma. Os siRNAs com maiores escores foram quimicamente sintetizados em estrutura de fita dupla, contendo 21 nucleotídeos, pré-anelados, na escala de 20 nmol/ tubo (QiagenTM). Foram denominados e2_hEag1 e e8_hEag1. Também foi adquirido o controle negativo *Scramble AllStar* (Qiagen) e sintetizado o siRNA Kv10.1-3, descrito anteriormente [11]. Para realização do protocolo experimental, siRNAs sintéticos foram diluídos em 1 mL (um mililitro) de água livre de enzima *RNase*.

ETAPA II – Cultivo celular e transfecção

3.2 CULTURA DE GLIOMAS E TRANSFECÇÃO COM siRNAs SINTÉTICOS

Nesta etapa, o intuito foi avaliar o efeito de silenciamento do alvo em questão por meio da interferência de RNA. Assim, as células de glioma foram cultivadas pelo tempo necessário para atingir-se 50% de confluência. Neste estágio, as células foram transfectadas com siRNAs ou vetores de expressão de shRNA. As condições de cultivo e o método de transfecção estão descritos a seguir.

3.2.1 Cultivo celular de gliomas

A linhagem celular de glioma humano utilizada na presente pesquisa foi U138MG, adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro- BCRJ. O meio de cultura utilizado foi *Dulbecco's Modified Medium + F12* (DMEM/F12 GIBCO™, cat. Nº 12400-024, acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de Glutamax™ (cat. Nº 35050, GIBCO™) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (cat. Nº A5955, Sigma-Aldrich™). A contagem de células foi feita em Câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Tripán (cat. Nº 15250, GIBCO™). Alíquotas de gliomas, com densidade de $5,0 \times 10^5$ células foram cultivadas em frascos de cultura (capacidade 60 mL), em estufa umidificada (*Thermo Scientific REVCO™*), a 37°C e 5% de CO₂. Os cultivos foram realizados em triplicata. As células foram suspensas utilizando-se tripsina/EDTA 0,25% (cat. Nº 25300- Gibco™), seguida por lavagens com *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS- GIBCO™, cat. Nº 21600-010).

3.2.2 Transfecção de gliomas em cultura com siRNAs sintéticos direcionados a hEag1

Para realização dos ensaios e comparação dos efeitos de silenciamento, foram estabelecidos três grupos experimentais: controle positivo, controle negativo e grupo teste. O primeiro grupo celular foi transfectado com siRNA Kv10.1-3 direcionado ao alvo 5'-GTCCACTTGGTCCATGTCCAG- 3' de hEag1 [11]. O segundo grupo experimental recebeu a sequência controle *scramble* (*AllStars negative control* Qiagen™). E, finalmente, os gliomas do grupo teste foram transfectados com os siRNAs e2_hEag1 ou e8_hEag1, direcionados a sequências codificadas nos exons 2 e 8 de hEag1.

No método de transfecção utilizado, os siRNAs (18,75 nM) foram estruturados em lipossomas catiônicos, de acordo com as orientações do fabricante (*Lipofectamine 2000™ Transfection Reagent* Invitrogen™). Os ensaios foram realizados em triplicata. As células foram incubadas por 8h pós-transfecção. O procedimento operacional padrão (POP) seguido neste ensaio foi desenvolvido pela

equipe do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica e está descrito no anexo A (POP 44). Após período de incubação as células foram ressuspendidas por meio de tripsinização, conforme POP 43.1 (anexo B).

A concentração de siRNA utilizada foi estabelecida após a realização de ensaio piloto, em que foram testadas três concentrações (18,75 nM, 37,5 nM e 75 nM), conforme descrito em resultados. Igualmente, o tempo de incubação pós-transfecção foi determinado em estudo prévio, no qual se observou efeito de silenciamento nos tempos 4h, 8h e 48 horas, conforme apresentado em resultados.

ETAPA III – Silenciamento gênico

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE hEAG1

Para fins de quantificação do efeito de silenciamento causado pelos siRNAs, foi feita extração de RNA, seguida de transcrição reversa. As amostras de cDNA foram então utilizadas na análise de PCR em tempo real. Estes procedimentos estão descritos a seguir.

3.3.1 Extração de RNA total e análise de sua integridade

O RNA total das células foi extraído e purificado utilizando-se o kit comercial RNeasyTM Plus mini Kit (cat N^o 74134 QiagenTM), de acordo com as recomendações do fabricante (POP 46, anexo C). A integridade das amostras de RNA total foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Esta técnica permitiu ainda estimar visualmente o rendimento da extração de RNA, que foi determinado precisamente por fluorimetria (QubitTM InvitrogenTM). A qualidade da extração em termos de pureza foi definida pela razão entre as concentrações de RNA e de proteína, que deve ser de 1,8 a 2,0 [37].

3.3.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada por meio de transcrição reversa do RNA. Para tal utilizou-se o kit comercial *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (cat. Nº 18080-051 Invitrogen™). Na reação, utilizou-se 1500 ng de RNA e oligodeoxiribonucleotídeos *Random Hexamer* a 50 µM (cat. Nº 48190-011), seguindo o POP 48 do anexo D. Foi feita uma reação controle, sem transcriptase reversa, para detectar eventual contaminação da amostra com DNA genômico, o que acarretaria consequências na etapa seguinte.

3.3.3 PCR em tempo real ou RT-qPCR

A técnica de PCR em tempo real foi realizada com o objetivo de quantificar o conteúdo relativo de RNAm de hEag1 nos gliomas, permitindo avaliar os efeitos de silenciamento gênico causados pelos siRNAs. Para a realização desta técnica, foram seguidos os seguintes passos:

3.3.3.1 Seleção de *primers* para amplificação de hEag1 por RT-qPCR

O *primer* utilizado na técnica de RT-qPCR foi obtido com base em consulta no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, de *National Center for Biotechnology Information*– NCBI. A análise foi feita pelo algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) a fim de confirmar a identidade e especificidade dos *primers* quanto ao alvo hEag1. Informações complementares sobre características dos *primers* foram obtidas em *Integrated DNA Technologies*-IDT (<http://www.idtdna.com>), via *software OligoAnalyser 3.1* (<http://www.idtdna.com/analyser/Applications/OligoAnalyser/>). Foram considerados o percentual de guanina (G) e citosina (C), *melting temperature* (T_m), *hairpins*, *self-dimers*, heterodímeros, entre outras informações. Assim sendo, as características do *primer* adequadas para esta pesquisa foram: (i) tamanho do

amplicon 100 pares de base (bp); (ii) percentuais de G e C próximo a 50%; (iii) reduzida complementariedade intramolecular e intermolecular, evitando-se assim *hairpins*, *self-dimers* e heterodímeros; (iv) reduzida variação nas temperaturas de anelamento (ΔT_m) entre os *primers forward* e *reverse*, preferencialmente próxima de 1°C. As sequências dos *primers* selecionados aparecem descritas na tabela 1.

3.3.3.2 Seleção de genes endógenos ou genes de referência

A metodologia de RNAi atua sobre vias endógenas do metabolismo celular do RNA, portanto é fundamental a inclusão de genes controle endógenos para normalizar o nível de RNAm na quantificação relativa e permitir comparação mais acurada da expressão gênica. A literatura descreve alguns genes de referência convencionalmente utilizados na análise quantitativa de expressão gênica. Porém, a expressão destes genes pode variar conforme a linhagem celular, o estado patológico e os tratamentos experimentais [38]. Portanto, foi feito um estudo comparativo para seleção do gene endógeno mais apropriado para fins da presente pesquisa, no qual foram testados experimentalmente sete genes de referência (Tabela 2).

Os critérios de seleção para os genes candidatos foram: (i) similaridade nas sequências nucleotídicas das amostras; (ii) resistência às condições experimentais, ou seja, estabilidade na expressão e; (iii) possibilidade de utilização em RT-qPCR nas mesmas condições admitidas para o gene alvo [39]. Após realização de ensaios de RT-qPCR, selecionou-se aquele mais adequado aos critérios citados. Neste sentido, optou-se por utilizar o gene controle endógeno denominado *Poly(A) polymerase alpha* (PAPOLA), cuja função biológica é a poliadenilação de RNAm. As sequências do *primer* são descritas a seguir (Tabela 1).

Tabela 1- *Primers* utilizados na quantificação relativa da expressão de hEag1

Sigla	Sequência	Referência
hEag1hum	<i>Forward</i> :5'-TGTGTCCTGTTGCCATATGATGT-3' <i>Reverse</i> :5'-CGGAGCAGCCGGACAA-3'	Weber et al., 2006
PAPOLA	<i>Forward</i> : 5'- GCTACGAAGACCAGTCCATTG-3' <i>Reverse</i> : 5'-TGTTGGTCACAGATGCTGCT-3'	Kwon et al., 2009

Tabela 2- Genes endógenos testados na quantificação relativa da expressão gênica de hEag1

Sigla	Nomenclatura
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
ACTB	Beta-actina
hTfR	Tranferrina humano
TBP	Proteína de ligação ao TATA Box
CUL1	Proteína culina 1
GPBP1	Proteína de ligação de promotor rico em GC 1
PAPOLA	Polimerase Poly(A) alfa

3.3.3.3 Quantificação do Conteúdo Relativo de RNAm de hEag1 por RT-qPCR

O conteúdo relativo de RNAm de hEag1 foi quantificado por RT-qPCR, levando-se em consideração a padronização inicial do método. Foi utilizado termociclador *7500 Fast Real-Time PCR (Applied BiosystemsTM)*, com ensaios realizados em triplicata.

A solução de amplificação para cada triplicata continha: 15,0 µL de SYBR™ *Green master mix* (*Applied Systems*™); 6,0 µL de cDNA sintetizados na transcrição reversa; 2,4 µL de *primer* na concentração 10 pmol/ µL; água mili-Q q.s.p 30 µL. Em cada poço da placa foram introduzidos 10,0 µL da solução descrita. A amplificação ocorreu sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto). O *primer* testado para quantificação do RNAm de hEag1 foi hEag1hum. Para amplificação do gene controle endógeno utilizou-se o *primer* PAPOLA (Tabela 1).

PARTE II — Viabilidade Celular

Nesta etapa, o presente estudo buscou determinar o efeito da RNAi sobre a viabilidade celular de gliomas. O mecanismo de interferência foi induzido por vetores de expressão de shRNA. O uso de vetores de shRNA permite estudos de interferência por tempo mais prolongado, já que siRNAs sintéticos são alvos de degradação por enzimas no citoplasma. Além disso, grupos de células transfectadas com vetores de shRNA foram tratadas, simultaneamente, com agente imunomodulador IFN-γ, utilizado em alguns protocolos de quimioterapia do câncer e com forte potencial de uso no tratamento do glioma e de outros tumores cerebrais malignos [56,57].

3.4 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE GLIOMAS POR ENSAIO COM MTT

3.4.1 Grupos experimentais

Os efeitos da interferência de RNA sobre a viabilidade celular de gliomas foram estudados utilizando-se vetores de expressão de *short hairpin* RNA (shRNA), descritos a seguir. Assim, insertos foram clonados em DNA plasmidial, gerando dois construtos, devidamente denominados pKv10.1-3hum_LI e p*Scramble*, de acordo com a sequência. A primeira direcionada ao alvo 5'–GTCCACTTGGTCCATGTCCAG– 3' de hEag1 e, a segunda, refere-se ao controle negativo. Além dos vetores plasmidiais, um grupo de gliomas foi tratado com interferon gama (IFN- γ). Assim, para a análise da viabilidade celular por ensaios colorimétricos de MTT, os gliomas foram divididos em duas categorias e organizados em seis grupos experimentais.

- 1) Gliomas somente transfectados com vetores de shRNA (0,2 μ g) estruturados em lipofectamina
 - I. células não-transfectadas
 - II. células transfectadas com p*Scramble*
 - III. células transfectadas com pKv10.1-3hum_LI

- 2) Gliomas tratados com interferon gama – IFN- γ (25 ng/mL) e transfectados com vetores de expressão de shRNA (0,2 μ g) simultaneamente
 - IV. células tratadas com IFN- γ
 - V. células tratadas com IFN- γ e transfectadas com p*Scramble*
 - VI. células tratadas com IFN- γ e transfectadas com pKv10.1-3hum_LI

O processo de obtenção dos vetores de expressão (pKv10.1hum_LI e p*Scramble*) e o ensaio de MTT aparecem descritos a seguir

3.4.2 Obtenção de vetores de expressão de *short hairpin* (shRNA)

Para obtenção de vetores de expressão de shRNAs, foram desenhados e sintetizados insertos para clonagem no vetor pSilencer 3.1 H1 neo, na forma de fitas simples de desoxiribonucleotídeos denominadas de *top* e *bottom*. As sequências estão sendo patenteadas junto ao INPI, por isso não são descritas neste texto.

Quando tranfectados em células de mamíferos, estes vetores são capazes de expressar grampos de RNAs interferentes (*short hairpins* RNAs, shRNAs) direcionados à mesma sequência alvo da estrutura siRNA Kv10.1-3, previamente testada. O inserto para clonagem contém os seguintes componentes: (i) sítios de restrição BamHI e HindIII nas extremidades das sequências gênicas *top* e *bottom*, para fins de clonagem em vetor de expressão; (ii) sequência para expressão de *hairpins* de RNA, composta de até 65 nucleotídeos, assim distribuídos: uma fita *sense* com 19 nucleotídeos, seguida de alça de 2 ou de 9 nucleotídeos não-pareados, seguida de fita *antisense* ou *guide*, seguida de dois nucleotídeos de timina não-pareados para o *overhang*, seguida de 4 nucleotídeos de timina para terminação da transcrição, com a presença ou com a ausência de dois nucleotídeos de guanina e dois de adenina, para melhorar a eficácia de interferência de RNA. A clonagem foi realizada de acordo com recomendações do fabricante, que incluiu pré-anelamento das fitas *top* e *bottom* e ligação no vetor pSilencer 3.1-H1 neo pré-digerido. Os construtos foram devidamente designados pKv10.1-3hum_LI e pScramble, de acordo com a sequência.

O isolamento e purificação dos plasmídeos foram realizados, utilizando-se kit comercial *EndoFree® Plasmid Mega kit* (cat. N° 12381), seguindo as recomendações do fabricante (anexo E).

3.4.3 Estudo do efeito do vetor de expressão de shRNA sobre a viabilidade de gliomas

Os efeitos dos vetores sobre a viabilidade celular do glioma *in vitro*, testados isoladamente ou combinados com IFN- γ , foram determinados por ensaios de MTT. Este ensaio baseia-se na redução do sal tetrazolato ou MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolato de bromo) ao composto formazan, pela enzima hidrogenase succínica mitocondrial. Esta reação confere ao meio uma coloração violácea, cuja intensidade é medida por espectrofotometria. O cultivo celular foi realizado em placas de 96 poços, contendo $1,0 \times 10^4$ células/poço em 200 μ L de meio de cultura. As células foram tratadas com IFN- γ e/ou vetor de expressão, conforme os seis grupos experimentais descritos anteriormente em 3.4.1. Após tratamento e/ou transfecção, as células foram incubadas por um período de 24 horas. Então, foram adicionados 15 μ L de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço e a placa foi mantida em estufa 37°C e 5% de CO₂ durante três horas. Após este período, adicionou-se aos poços 150 μ L de solução de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, a redução do MTT foi mensurada em espectrofotômetro (595 nm) – *Molecular Devices Spectra Max M2*. Os ensaios foram realizados em triplicata e calculou-se a média dos valores de absorbâncias, seguido de análise estatística.

4 RESULTADOS

O presente estudo desenvolveu uma metodologia para regulação da expressão gênica do canal de potássio dependente de voltagem hEag1, baseada na biotecnologia da interferência de RNA. Foram identificados e testados dois alvos direcionados à sequência de RNAm codificada pelo gene hEag1. Os resultados experimentais de cada etapa desenvolvida no estudo estão descritas a seguir.

4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS ALVO

O estudo de bioinformática permitiu a identificação de 25 sequências direcionadas ao alvo hEag1, cujos escores variaram de 0,82 a 0,87. Estas sequências foram utilizadas para a síntese das estruturas de siRNAs, dentre as quais duas tiveram sua eficácia de silenciamento gênico testadas no presente trabalho. Estas sequências estão sendo patenteadas no momento, razão pela qual não são descritas explicitamente nesta dissertação.

4.2 EFICIÊNCIA NA EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

As etapas de cultivo celular e transfecção foram devidamente realizadas conforme procedimento operacional padrão desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório Tecnologias para Terapia Gênica, possibilitando condições necessárias para realização dos testes de silenciamento da expressão gênica do hEag1 em gliomas.

A extração de RNA total por meio de kit comercial (RNeasyTM Plus mini Kit QiagenTM) gerou rendimentos de até 1 µg/µL o que permitiu iniciar a transcrição reversa com 1500 ng de RNA em cada reação.

A integridade da molécula e a estimativa da concentração das amostras de RNA foram consideradas satisfatórias, de acordo com a visualização das bandas de RNA ribossomal 18S e 28S, bem como a ausência de rastro de degradação.

Na transcrição reversa, foi utilizado primer *Random Hexamer* (Invitrogen™) e houve amplificação de hEag1 por qPCR. Além disso, os controles negativos (reações realizadas na ausência da enzima transcriptase reversa) mostraram ampliações tardias, o que indica baixa ou nenhuma contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA amplificadas.

4.3 SILENCIAMENTO DE hEAG1 VIA siRNAs SINTÉTICOS

Um ensaio piloto (n=1) foi realizado no Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica para determinar dose e o tempo de transfecção ideais para o silenciamento de hEag1.

Assim, células de glioma (U251MG) foram incubadas com siRNA Kv10.1-3, em três dosagens distintas: 18,75 nM, 37 nM ou 75 nM, por um período de 4h, 8h ou 48h. A redução relativa do conteúdo de RNAm induzida pela estrutura foi, então, mensurada por PCR em tempo real. Após 4h de transfecção já foi possível identificar redução no conteúdo relativo de RNAm do hEag1. Contudo, este efeito foi mais acentuado no tempo de 8h, seguido por início da recuperação dos níveis de RNAm no tempo de 48h (Figura 3A). O resultado observado corrobora uma pesquisa realizada por Weber e colaboradores (2006), na qual diferentes linhagens tumorais tiveram os níveis de RNAm do hEag1 diminuídos por siRNA Kv10.1-3 mais efetivamente no tempo de 8h pós-transfecção. Portanto, o período de 8h foi o tempo de transfecção adotado para os ensaios realizados na presente pesquisa.

Em relação ao efeito da concentração de siRNA, observou-se que a dose mais baixa de siRNA (18,75 nM) mostrou o maior grau de redução no conteúdo relativo de RNAm de Eag1, após 8h de transfecção, conforme figura 3B. Portanto, nos ensaios realizados na presente pesquisa foram utilizadas concentrações de siRNA de 18,75 nM.

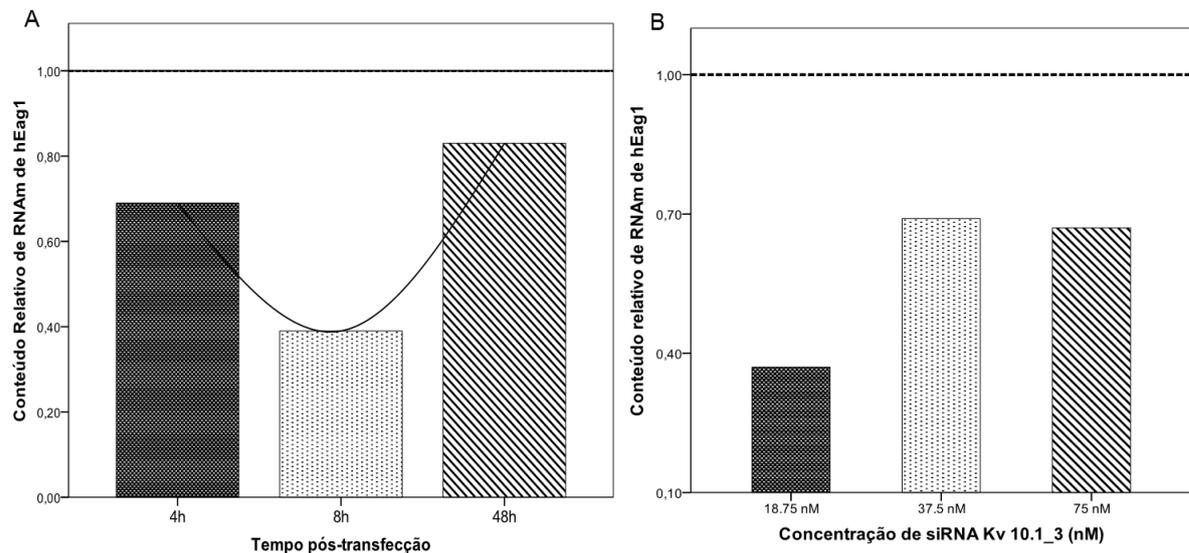


Figura 3- Efeito do siRNA Kv10.1-3 sobre o conteúdo de hEag1 (n=1). A) Variação temporal do efeito da estrutura siRNA Kv 10.1-3 sobre o conteúdo de RNAm de hEag1 em gliomas *in vitro* nos tempos 4h, 8h ou 48h pós-transfecção. Culturas de glioma humano (U251MG) foram transfectadas com siRNA (37,5 nM) estruturado em lipossomas catiônicos e incubadas por 4h, 8h ou 48h. B) Efeito da dose do siRNA Kv 10.1-3 sobre o conteúdo de RNAm de hEag1 em gliomas *in vitro*. Culturas de glioma humano foram transfectadas com siRNA nas concentrações: 18,75 nM, 37,5 nM ou 75 nM, estruturados em lipossomas catiônicos e incubadas por 8h. Os níveis de RNAm de hEag1 foram determinados por RT-qPCR, em triplicata, e expressos pelo método de quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Assim sendo, as novas estruturas e8_hEag1 e e2_hEag1, foram testadas nas seguintes condições experimentais (n=3): tempo de transfecção de 8h e 18,75 nM de siRNA.

A análise por RT-qPCR mostrou que o siRNA Kv10.1-3, citado na literatura [11], reduziu o conteúdo de RNAm do referido alvo em linhagem de gliomas, indicando um efeito de silenciamento gênico ainda não descrito para esta linhagem celular. O conteúdo de RNAm de Eag1 foi reduzido de 1,00 (controle negativo) para 0,75 (Figura 4).

As duas estruturas em teste na atual pesquisa, e8_hEag1 e e2_hEag1, também foram capazes de produzir efeito de silenciamento gênico de hEag1 em células de gliomas. A análise quantitativa mostrou que as estruturas e8_hEag1 e e2_hEag1 reduziram o conteúdo relativo de RNAm do alvo para 0,52 e 0,46, respectivamente.

A análise estatística (n=3) mostrou diferença significativa entre os resultados obtidos para ambos os testes e o siRNA Kv10.1-3, utilizado neste trabalho como controle positivo. Este dado mostra que as sequências alvo propostas produzem efeito de interferência sobre a expressão do gene hEag1 mais acentuado do que a sequência referência Kv10.1-3, conforme apresentado na figura 4.

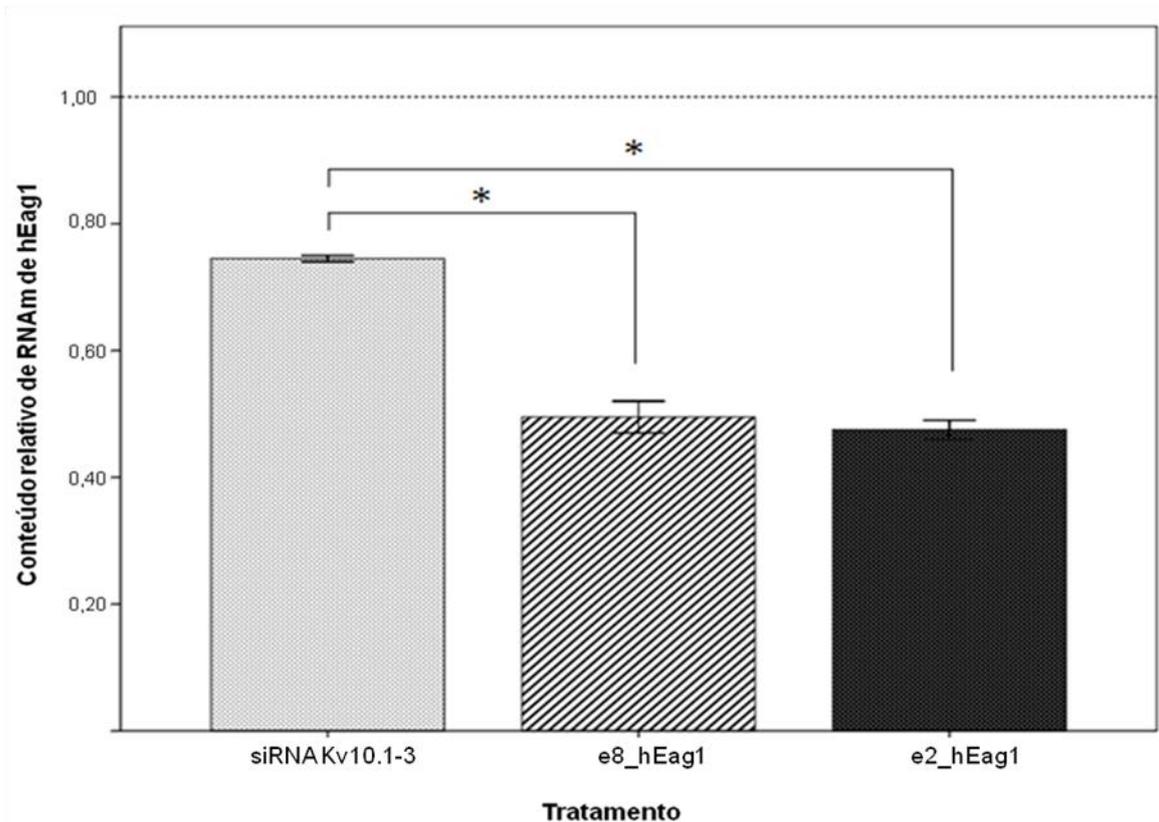


Figura 4- Redução do conteúdo relativo de RNAm de Eag1 em glioma, via siRNAs Kv10.1-3, e8_hEag1 ou e2_hEag1 (n=3). Efeitos das estruturas sobre o conteúdo de RNAm de Eag1 no tempo de 8h. Culturas de glioma humano da linhagem U138MG foram transfectadas com os siRNAs estruturados em lipossomas catiônicos (18,75 nM). Os níveis de Eag1 foram determinados por RT-qPCR, em triplicata, e expressos pelo método da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). A estrutura siRNA Kv10.1-3, utilizada como controle positivo de silenciamento gênico, foi direcionada ao alvo 5'-GTCCACTTGGTCCATGTCCAG-3' (Weber et al. J. Biol. Chem. 281:13033-37, 2006). * - diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA oneway seguido do teste de Tukey).

4.4 REDUÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE GLIOMAS POR VETOR DE EXPRESSÃO DE *SHORT HAIRPIN* DE RNA (shRNA)

Os constructos pKv10.1-3hum_LI e p*Scramble*, contendo as respectivas sequências alvo e controle, foram capazes de produzir alterações fenotípicas sobre a viabilidade celular de gliomas (U138MG) em cultura. Estes vetores de expressão ainda potencializaram o efeito do imunomodulador IFN- γ .

Na categoria 1, em que gliomas foram tratados somente com vetores plasmidiais, observou-se que o vetor pKv10.1-3hum_LI (grupo III) reduziu a viabilidade celular em 16%, enquanto o controle p*Scramble* (grupo II) mostrou efeito de redução de apenas 10,4%. Este dado sugere efeito sobre o fenótipo celular causado por shRNA direcionado ao alvo de hEag1 (Figura 5).

Na categoria 2, o grupo de gliomas tratado apenas com IFN- γ (grupo IV) teve redução na viabilidade celular de 11,4%, enquanto as células tratadas com IFN- γ e vetor pKv10.1-3hum_LI (grupo VI) tiveram sua viabilidade reduzida em 40,4% ($p < 0,05$). Este dado sugere que a ação da citocina IFN- γ foi potencializada pelo vetor de expressão pKv10.1-3hum_LI. Este efeito sinérgico não foi observado no grupo V (17%) – tratado com IFN- γ e vetor p*Scramble* – sugerindo que o efeito é sequência-específico (Figura 5).

Comparando-se as duas categorias, o uso isolado do vetor pKv10.1-3hum_LI (grupo III) produziu 16% de redução na viabilidade dos gliomas, enquanto, associado com IFN- γ (grupo VI), reduziu em 40,4% ($p < 0,05$) (Figura 5). Igualmente, o tratamento dos gliomas com IFN- γ isoladamente (grupo IV) teve menor efeito sobre a viabilidade celular (11,4%) em comparação ao tratamento combinado com pKv10.1-3hum_LI – grupo VI ($p < 0,05$) (Figura 5).

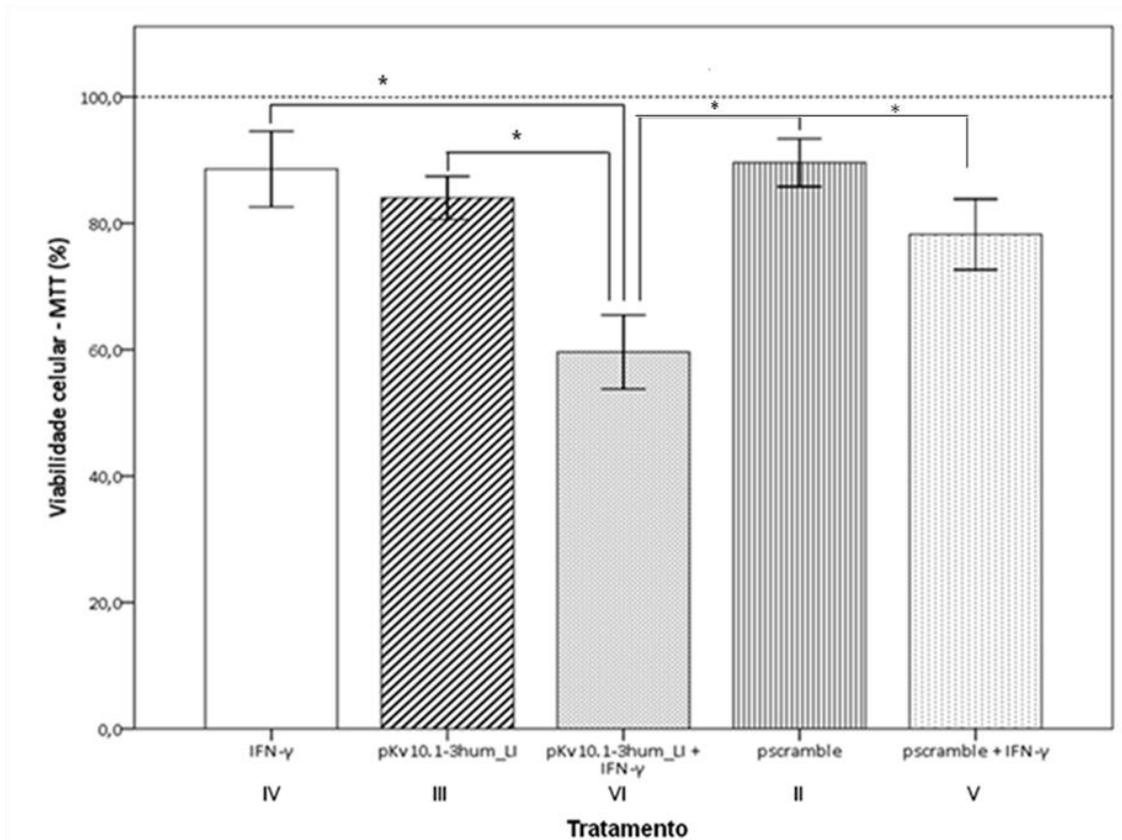


Figura 5- Efeitos de tratamentos com pKv10.1-3hum_LI (0,2 µg) e/ou interferon gama (IFN-γ, 25 ng/mL) sobre a viabilidade de gliomas em cultura (n=7). O vetor foi estruturado em lipossomas catiônicos (Lipofectamine 2000™), sendo a viabilidade celular determinada pelo método de MTT em três ensaios independentes, no tempo de 24h. A viabilidade está expressa como percentual em relação aos valores de absorbância observados no grupo controle não tratado. * - diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey).

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos relacionam os canais de potássio com a proliferação de células tumorais [1,10,40,41]. Entre eles, destaca-se o canal de potássio dependente de voltagem Eag1. A participação do canal hEag1 na formação e proliferação de tumores foi proposta com base em resultados experimentais *in vitro* e *in vivo*, em que se observou ampla distribuição e expressão do referido canal em diferentes linhagens de células tumorais [11]. Contudo, neste trabalho não foram incluídas linhagens de glioma, modelo de estudo da presente pesquisa, apesar de hEag1 ser expresso neste tipo de célula tumoral [45].

Glioma é o tipo de tumor maligno mais frequente e mais resistente ao tratamento antineoplásico convencional [17,30]. A busca por opções terapêuticas, evidências de relação entre hEag1 e neoplasias e a escassez de estudos sobre seu papel no desenvolvimento de gliomas motivaram o desenvolvimento da atual pesquisa. Os resultados deste trabalho mostram que a RNAi sobre hEag1 é uma estratégia terapêutica potencial.

A principal característica de hEag1 é sua restrita distribuição e expressão em células normais não neurais, o que sugere este canal como um marcador tumoral e um potencial alvo terapêutico para câncer [11,44,46]. A superexpressão do hEag1 geralmente não é o evento desencadeador da tumorigênese, mas sim um processo que ocorre durante o desenvolvimento do tumor [1,47]. Nossos resultados corroboram esta proposta, pois o silenciamento de hEag1 reduziu a viabilidade celular de gliomas.

Muitos estudos acerca da função oncogênica de hEag1 têm sido realizados para elucidar a sua participação na proliferação celular. Sendo o hEag1 um canal iônico, seria plausível pensar que a permeabilidade celular ao íon potássio (K^+) fosse fator determinante para a progressão de um tumor. Entretanto, tal evidência não foi observada, sugerindo que o potencial carcinogênico do Eag1 se processa por mecanismos complementares [1,3,4,7]. Pesquisas sugerem alguma interação entre Eag1 e vias de sinalização, que conhecidamente estão relacionadas ao crescimento de tumores. A atividade do canal Eag1 pode ser estimulada por fatores etiológicos

associados ao câncer, como estradiol e o papilomavírus humano (HPV) [9]. Evidências mostram que, no estado de hipóxia celular, a expressão de hEag1 induz a transcrição de fatores induzidos por hipóxia. Tais fatores, por sua vez, induzem a expressão de oncogenes relacionados com crescimento celular e angiogênese, processos presentes em células neoplásicas [7,46]. Outra evidência é a alteração da atividade eletrofisiológica do canal hEag1 mediada por íons cálcio intracelular, sugerindo uma possível modulação do canal e sua relação com vias de sinalização dependentes de cálcio, íon que tem função regulatória no ciclo celular [2,4,5].

Considerando que hEag1 tem papel no crescimento tumoral, uma alternativa terapêutica poderia ser o desenvolvimento de compostos quimioterápicos que pudessem bloquear o referido canal, já que sua expressão é pouco evidenciada em tecidos normais fora do sistema nervoso central. Entretanto, não há fármacos inibidores específicos para Eag1 disponíveis [3,11]. Alguns trabalhos testando moléculas inespecíficas e não seletivas que modulam canais de potássio, como a imipramina e o astemizol, mostraram eficácia na inibição da atividade do hEag1, diminuindo o potencial proliferativo de células em melanomas e em carcinoma colorretal [5,9]. O calcitriol, importante metabólito da vitamina D, também foi sugerido como um agente inibidor da expressão de hEag1 em células de tumor mamário [12]. No entanto, a semelhança estrutural entre os membros do grupo de canais de potássio dependentes de voltagem, especialmente entre os membros da família Eag, não viabiliza o uso destas drogas na terapia anti-Eag1 devido à inespecificidade da ação bloqueadora [3]. No trabalho de Weber et al.(2006), siRNAs direcionados a hEag1 não provocaram efeito de silenciamento sobre hEag2, o que sugere especificidade da terapia via RNAi.

Anticorpos monoclonais também representam uma estratégia para gerar inibidores mais seletivos contra canais de membrana, permitindo a distinção específica de um antígeno do seu homólogo. O primeiro anticorpo funcional anti-Eag1 desenhado e testado por Pardo e colaboradores (2008) reduziu eficiente e seletivamente o fluxo de íon K^+ através do canal. Embora o anticorpo administrado via parental tenha diminuído o crescimento tumoral em dois modelos diferentes, o efeito foi moderado e também não se observou inibição em todas as linhagens celulares testadas [1].

Portanto, a seletividade é um requisito crucial para terapia anti-Eag1 e a falta de bloqueadores específicos dificulta a análise funcional desta proteína, em células neuronais e neoplásicas. Neste contexto, a tecnologia do RNA interferente permite não apenas o estudo da função fisiológica do canal Eag1, mas também a caracterização do seu potencial uso na terapia do câncer, incluindo-se os gliomas [11]. Atualmente, é possível encontrar na literatura diversos trabalhos sobre terapia gênica via RNAi para neoplasias [17,19,32] porém nenhum menciona o uso de siRNAs sintéticos direcionados ao canal hEag1, visando a terapia de gliomas, objetivo do atual estudo.

A atual pesquisa mostrou que siRNAs sintetizados e especificamente direcionados para hEag1 foram eficientes no silenciamento pós-transcricional do respectivo gene, em linhagem de glioma. Porém, a eficiência de ação, ou seja, a intensidade e a duração do efeito de interferência induzido pelo siRNA depende de alguns fatores [49,50]. Existe relação entre o efeito de silenciamento e a concentração de siRNA. Elevadas concentrações de siRNA podem interferir na atividade específica do complexo enzimático RISC, que leva à degradação do RNAm. Portanto, recomenda-se o uso de concentrações mínimas de siRNA para produzir o máximo de efeito de silenciamento, evitar respostas inespecíficas e eliminar possíveis efeitos tóxicos causados por excesso de siRNA no citoplasma [50,51,52,53]. Baseado neste conceito e na análise da curva dose-resposta, gerada experimentalmente na presente pesquisa, foi escolhida a concentração de siRNA equivalente a 18,75 nM para a execução dos ensaios. Doses superiores (37,5 nM e 75 nM) também mostraram silenciamento gênico, mas em menor escala, possivelmente em função da saturação da maquinaria de interferência. A dosagem de siRNA utilizada no presente estudo foi ligeiramente inferior aos valores de concentração usados em outras investigações [11,51]. Deve-se considerar que cada linhagem celular possui limitação própria da maquinaria de interferência de RNA e as sequências de siRNA têm capacidade de silenciamento variável [49,50].

Alguns fatores que interferem na intensidade do silenciamento induzido pelo siRNA podem ser controladas otimizando-se certas condições no método de transfecção. O tempo da transfecção é o período em que a célula é exposta à estrutura de interferência, sendo este tempo, portanto, um fator diretamente determinante no grau de silenciamento esperado. A atual pesquisa acompanhou a

variação temporal do efeito de siRNAs e constatou que, após um curto período de exposição (4h), já é possível observar diminuição no conteúdo de RNAm de hEag1. Esta redução é mais acentuada no tempo de 8h pós-transfecção e, após um período de 48h, observou-se recuperação gradativa dos níveis de RNAm, possivelmente devido à perda de funcionalidade do siRNA por ação das enzimas de degradação. [47]. Estudo anterior também mostra pico de silenciamento após 8h de transfecção, seguida de recuperação gradativa dos níveis de RNAm [11].

A sequência de siRNA Kv10.1-3 foi escolhida como controle positivo, pois esta estrutura mostrou-se eficaz na regulação pós-transcricional do gene hEag1 em diversas linhagens tumorais [11]. O presente trabalho demonstrou a capacidade desta estrutura de interferir na síntese do hEag1 também em células de glioma e, ainda, sugere outras duas novas sequências alvo (e2_hEag1 e e8_hEag). As estruturas propostas mostraram maior eficácia na redução do conteúdo relativo de RNAm hEag1 comparado ao controle positivo. Este dado sugere, portanto, que os siRNAs sintéticos testados, direcionados para hEag1, provocam efeitos sobre a expressão do respectivo gene. O uso de múltiplos siRNAs funcionais, direcionados ao mesmo gene, é uma estratégia para confirmar o efeito de silenciamento que ocorre, porém, em graus de intensidade diferentes de acordo com o alvo [53,54]. A variação nos níveis de intensidade dos efeitos observados pode ser devido à diferença nas sequências das estruturas, que lhes conferem propriedades termodinâmicas e estabilidade distintas [11,52]. Assim, dentre as estruturas testadas experimentalmente, os siRNAs e2_hEag e e8_hEag1 podem ser propostos como potenciais sequências alvo para o silenciamento do gene hEag1, tendo apresentado resultados superiores em relação ao siRNA Kv10.1-3, em linhagem de glioma. Destaca-se que, como as duas sequências ainda não foram publicadas, são objetos de patente e exploração comercial.

A proliferação celular e a apoptose são dois processos celulares paralelamente regulados por canais iônicos. A variação no volume da célula durante a divisão celular requer o transporte de íons através dos canais de membrana, incluindo os canais de K^+ [53]. Considerando que a participação do canal hEag1 no crescimento e proliferação de diversos tipos celulares já está bem documentada [40,41,43,44,45], avaliou-se na presente pesquisa o efeito da interferência de RNA,

mediada por vetores de expressão de shRNA, sobre o fenótipo celular, ou seja, se a RNAi reduziria a viabilidade das células de glioma.

Nos estudos sobre a viabilidade celular, foram utilizados vetores de expressão de shRNA, pois o controle da expressão gênica mediada por estruturas de siRNA é temporariamente limitada em células de cultura [54], dado inclusive observado em estudos anteriores do próprio grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica. Assim, o construto pKv10.1-3hum_LI foi testado em combinação com o agente pró-apoptótico IFN- γ , fármaco utilizado em alguns protocolos de quimioterapia do câncer e com forte potencial de uso no tratamento do glioma e de outros tumores cerebrais malignos [56,57]. O efeito combinado de pKv10.1-3hum_LI e IFN- γ reduziu em 40% a viabilidade celular do glioma. A ação sinérgica dos dois fatores pode ser devido à atuação do IFN- γ no ciclo e crescimento celulares, mediante controle da transcrição gênica, regulando mais de 200 genes alvo [58]. No sentido terapêutico, os interferons, incluindo IFN- γ , possuem propriedades antitumorais que permitem o seu emprego no tratamento de diferentes tipos de tumores malignos, frequentemente combinados a agentes quimioterápicos [59,60,61]. Um estudo mostrou que a utilização combinada de IFN- γ e da interferência de RNA sobre o gene da transcriptase reversa da telomerase – relacionada com a invasão celular e proliferação de tumores – foi capaz de reduzir em até 80% a proliferação tumoral de gliomas [62]. Portanto, IFN- γ coloca-se como alternativa promissora para a imunoterapia de tumores cerebrais [56,57], objeto do atual estudo. Dentre os efeitos observados, os IFNs apresentam papel relevante nos eventos apoptóticos tumorais [63,64], havendo evidências de que o IFN- γ aumente a suscetibilidade das células cancerosas à apoptose [65,66].

Em síntese, a atual pesquisa fornece importante contribuição para o potencial uso da RNAi sobre hEag1 no tratamento do câncer, particularmente de gliomas, podendo contribuir para estudos futuros acerca da função específica deste canal no sistema nervoso central, que ainda permanece indefinida, e no desenvolvimento de tumores.

Novas investigações poderão avaliar, por meio de estudos de imunocitoquímica, os possíveis efeitos das duas sequências propostas nesta pesquisa sobre os níveis da proteína hEag1. A confecção de vetores de expressão de shRNA com as referidas sequências alvo também permitirão estudos

complementares acerca da regulação da expressão do gene hEag1 *in vitro*, e sobre efeitos terapêuticos em modelos animais. Poderão ser desenvolvidas nanoestruturas para carrear efetivamente siRNAs ou vetores de expressão através da barreira hematoencefálica e para o interior da célula neoplásica, particularmente o glioma.

6 Conclusões

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- O canal de potássio hEag1 tem participação na manutenção da viabilidade celular, tendo em vista que o silenciamento gênico afetou o fenótipo das células de glioma.
- O siRNA Kv10.1-3 é capaz de causar efeito de interferência de RNA sobre hEag1 também na linhagem celular de glioma.
- As estruturas de siRNAs sintéticos (e8_hEag1 e e2_hEag1) são capazes de causar interferência de RNA sobre hEag1
- Os efeitos de silenciamento causados pelos siRNAs e8_hEag1 e e2_hEag1 são maiores do que aquele produzido pelo siRNA Kv.10.1-3, mostrando o valor preditivo do algoritmo utilizado no presente estudo para identificação de alvos de RNAi.
- O vetor de expressão pKv10.1-3hum_LI proposto nesta pesquisa reduz a viabilidade celular do glioma, podendo ser associado ao agente imunomodulador IFN- γ para obtenção de efeitos mais pronunciados.

Referências

1. Pardo LA, Stühmer W. Eag1: An Emerging Oncological Target. *Cancer Res* 2008 Mar; 68(6):1611-13.
2. Schrönherr R, Löber K, Heinemann S. Inhibition of human *ether à go-go* potassium channels by Ca^{2+} /calmodulin. *EMBO J* 2000 May;19(13):3262-71.
3. Gómez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Knötgen H, Sánchez A, Hettmann T, Ossipov D et al. Monoclonal Antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Res* 2007 Aug; 67(15):7343-49.
4. Ousingsawat J, Spitzner M, Puntheeranurak S, Terracciano L, Tornillo L, Bubendorf L et al. Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007 Feb; 13:824-31.
5. Spitzner M, Martins JR, Soria RB, Ousingsawat J, Scheidt K, Scheiber R et al. Eag1 and Bestrophin 1 are up-regulated in fast-growing colonic cancer cells. *The Journal of Biological Chem* 2008 Mar; 283(12):7421-28.
6. Schwars JR, Bauer CK. The *ether-à-go-go*-related gene K^+ current: functions of a strange inward rectifier. *News Physiol Sci* 1999 Aug; 14:135-42.
7. Downie BR, Sánchez A, Knötgen H, Contreras-Jurado C, Gymnopoulos M, Weber C et al. Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *The Journal of Biological Chem* 2008 Dec; 283(52):36234-40.
8. Hemmerlein B, Weseloh RM, Queiroz FM, Knötgen H, Sánchez A, Rubio ME et al. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular Cancer* 2006 Oct; 5(41):1-13.
9. Díaz L, Ceja-Ochoa I, Restrepo-Ângulo I, Larrea F, Avila-Chávez E, García-Becerra R et al. Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human *ether-à-go-go* 1 potassium channel expression. *Cancer Res* 2009 Apr; 69(8):3300-07.
10. Schönherr R, Gessner G, Löber K, Heinemann SH. Functional distinction of human Eag1 and Eag2 potassium channel. *FEBS Letters* 2002 Feb; 514:204-8.

11. Weber C, Queiroz FM, Downie BR, Suckow A, Stühmer W, Pardo LA. Silencing the activity and proliferative properties of the human Eag1 potassium channel by RNA interference. *Journal of Biological Chem* 2006 May; 281(19):13030-37.
12. Garcia-Becerra R, Díaz L, Camacho J, Barrera D, Ordaz-Rosado D, Morales A et al. Calcitriol inhibits Ether-à go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Experimental Cell Res* 2010 Nov; 316:433-42.
13. Meyer R, Heinemann SH: Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J Physiol* 1998 Apr; 508:49-56.
14. Menk CFM, Ventura AM. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. *Rev USP* 2007 Nov; 75:50-61.
15. Chao Z., Quing-Tao W., He L, Zhen-Zhu Z, Wen-Li H. Advancement and prospects of tumor gene therapy. *Chin J Can* 2011 Apr; 30(3):182-88
16. Angaji SA, Hedayati SS, Poor RH, Madani S, Poor SS, Panahi S. Application of RNA interference in treating human disease. *J Genet* 2010 Dec; 89(4):527-37.
17. Lin Z, Ram IM. Lipid and Polimeric carrier-mediated nucleic acid delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2010 Oct; 7(10):1209-26.
18. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 Feb; 391:806–11.
19. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA RNA interference in adult mice. *Nature* 2002 Jul 4; 418(6893):38-9.
20. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 2009 Jan; 457:426–33.
21. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004 Sep; 431:343–49.
22. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature* 2007 Jan; 8:23-36.
23. Sashital D, Doudna JA. Structural insights into RNA interference. *Curr Opin Struct Biol* 2010 Feb; 20(1):90-7.
24. Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and importance factors to achieve RNAi-based gene therap. *Elsevier Adv Drug Deliv Rev* 2009 Jul; 61(9):760-66.

25. Silva K, Schnierle BS. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology J* 2010; 7:1-11.
26. Cancer Council Australia; Australia Cancer Network; Clinical Oncological Society of Australia. *Clinical Practice Guidelines for the management of adult gliomas: astrocytomas and oligodendrogliomas*. Sidney: 2009.
27. Weller M. Novel diagnostic and therapeutical approaches to malignant glioma. *Swiss Med wkly* 2011 May; 141:1-7.
28. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO. *Neurociências*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
29. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvett A et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007 May; 114:97-109.
30. Zhang Y, Dutta A, Abounader R. The role of miRNAs in glioma initiation and progression. *PMC* 2012 Feb; 17:700-12.
31. Instituto Nacional do Câncer (Brasil). *Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade*. Rio de Janeiro: INCA, 2008.
32. Castro MG, Candolfi M, Kroeger K, King GD, Curtin JF, Yagiz K et al. Gene Therapy and Targeted Toxins for glioma. *Curr Gene Ther* 2011 Jun; 11(3):155-80.
33. Chamberlain MC, Kormanik PA. *Practical Guidelines for the treatment of Malignant Gliomas*. *West J Med* 1998 Feb; 168(2):114-20.
34. Mathupala S.P. RNAi based approaches to the treatment of malignant glioma *Technol Cancer Res Treat* 2006 Jun; 5(3):261-9.
35. Wu A, Wiesner S, Xiao J, et al. Expression of MHC I and NK ligands on human CD133+ gliomas cells: possible targets of immunotherapy. *J Neurooncol*. 2007; 83:121-131.
36. Ehtesham M, Samoto K, Kabos P, et al. Treatment of intracranial glioma with in situ interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha gene transfer. *Cancer Gene Ther*. 2002; 9:925-934.
37. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3th.ed. New York: CSHL Press; 2001.
38. Mi Jeon Kwon, Ensel Oh, Seugmook Lee, Si Eun Kim, Yangsoon Lee, Yoon-La Choi et al. Identification of novel reference genes using multiplatform expression data

- and their validation for quantitative gene expression analysis. *PlosOne* 2009 Jul; 4(7):1-15.
39. Tuzmen S, Kiefer J, Mousses S. Validation of short interfering RNA knockdowns by quantitative real-time PCR. In: *Methods in Molecular Biology: Protocol for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive probes*. 2.ed. New Jersey: Humana Press Inc.; 2007.p.177-203.
40. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Mais A, Pillozzi S, Becchetti A. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Current Medicinal Chem* 2009 Jan; 16(1):66-93.
41. Fraser SP, Pardo LA. Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. *EMBO J* 2008 May; 9(6):512-15.
42. Schönherr R. Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *J Membr Biol*. 2005 Jun; 205(3):175-84
43. Sontheimer, H. An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2008 Jul; 233(7):779-91.
44. Pardo LA, del Camino D, Sánchez A, Alves F, Brüggemann A, Beckh S, Stühmer W. Oncogenic potential of Eag K⁺ channels. *EMBO J* 1999 Aug; 18(20):5540-47.
45. Patt, S, Preussat K, Beetz C, Kraft R, Schrey M, Kalff, R, Schönherr K, Heinemann, S.H. Expression of ether à go-go potassium channels in human gliomas. *Neurosci. Lett.*, 2004 May; 368:249-53.
46. Camacho J. Ether-à-go-go potassium channel and cancer. *Cancer Letter* 2006 Feb; 233:1-9.
47. Pardo LA. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Am Physiology J* 2004 Oct; 19:285-92.
48. Tulac S, Dosiou C, Suchanek E, Giudice LC. Silencing lamin A/C in human endometrial stromal cells: a model to investigate endometrial gene function and regulation. *Molecular Human Reproduction* 2004 Sep; 10(10):705–11.
49. Choi I, Cho BR, Kim D, Miyagawa S, Kubo T, Kim JY et al. Choice of the adequate detection time for the accurate evaluation of the efficiency of siRNA-induced gene silencing. *J Biotechnol*. 2005 Nov; 120(3):251-61.

50. Bantounas I, Phylactou LA, Unev JB. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian system. *J Mol Endocrinol* 2004 Dec; 33(3):545-57.
51. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001 May; 411(24):494-98.
52. Hannon GJ and Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004 Sep; 431(16):371-78.
53. Huppi K, Martin SE, Caplen NJ. Defining and assaying RNAi in mammalian cells. *Molecular Cell* 2005 Jan; 17:1-10.
54. Amarzguioui M, Rossi JJ, Kim D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Letters* 2005 Sep; 579:5974–81.
55. Lang F, Föllner M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol.* 2005 Jun; 205(3):147-57.
56. Miller, C.H., Maher, S.G., Young, H.A. Clinical Use of Interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sc* 2009 Dec; 1182:69-79.
57. Kane, A., Yang, I. Interferon-gamma in brain tumor immunotherapy. *Neurosurg Clin N Am.* 2010 Jan; 21(1):77-86.
58. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:749-95.
59. Wang SH, Mezosi E, Wolf JM, Cao Z, Utsugi S, Gauger PG et al. IFN gamma sensitization to TRAIL-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells by upregulating Bak expression. *Oncogene* 2004 Jan; 23(4):928-35.
60. Wang Y, Liu D, Chen P, Koeffler HP, Tong X, Xie D. Negative feedback regulation of IFN- γ pathway by IFN regulatory factor 2 in esophageal cancers. *Cancer Res* 2008 Feb; 68(4):1136-43.
61. Das A, Banik NL and Ray SK. Molecular mechanisms of the combination of retinoid and interferongamma for inducing differentiation and increasing apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Neurochem Res* 2009 Jan; 34(1):87-101.

62. George J, Banik NL, Ray SK. Knockdown of hTERT and concurrent treatment with interferon-gamma inhibited proliferation and invasion of human glioblastoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Jul; 42(7):1164-73.
63. Thyrell L, Erickson S, Zhivotovsky B, Pokrovskaja K, Sangfelt O, Castro J et al. Mechanisms of interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* 2002 Feb; 21(8):1251-62.
64. Park SY, Seol JW, Lee YJ, Cho JH, Kang HS, Kim IS et al. IFN gamma enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1. *Eur J Biochem* 2004 Nov; 271(21):4222-28.
65. Ossina NK, Cannas A, Powers VC, Fitzpatrick PA, Knight JD, Gilbert JR et al. Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. *J Biol Chem* 1997 Jun; 272(26):16351-57.
66. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002 Apr; 13(2):95-109.

ANEXO A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO 44

Transfecção celular	POP
Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	44

1/2

Usuário: _____ Data: ____ / ____ / ____

MATERIAIS

- Microtubos 1,5 µL
- Garrafas para cultivo
- siRNA
- Lipofectamina 2000
- Optimem + 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 Optimem
 - b. Para 3 reações (controle, scramble, amostra a ser testada)
 - 45 µL de Lipofectamina 2000
 - 555 µL de Optimem
 - c. Incubar os reagentes da transfecção diluídos em Optimem 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 Optimem
 - 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 Optimem
 - c. Tubo 2.3 (para amostra Control Pure Cell – Transfectado apenas com Lipossoma)
 - 200 µL Optimem

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:

Tabela com cálculos para preparação do microtubo 1:

	1x	3x	4x	5x
Lipofectamina	15 µL	45 µL	60 µL	75 µL
Optimem	185 µL	555 µL	740 µL	925 µL

Transfecção celular Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	44

4. Preparação dos meios celulares e transfecções
Para transfecção com Lipofectamina, primeiro lave as células com 3 mL de DPBS.
- Remover o meio de crescimento.
 - Lavar com 3 mL de DPBS.
 - Adicionar 5 mL de OptiMem+Glutamax (Gibco 51985).
 - Transfectar os 400 μ L resultantes Tubo 1 + Tubo 2.
 - Incubar por 6 hs após a transfecção.
 - Retirar o meio.
 - Adicionar DMEM F12 + 1% glutamax + 10% de FBS (Soro Fetal Bovino).
 - Incubar as células por 24 hs.

FIM.

ANEXO B – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO 43.1

Procedures to Cell Maintenance - Plating Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	43.1

1/2

Usuário: _____ . Data: ____ / ____ / ____

MATERIALS

- Falcon 50 mL
- Medium (specific for each cell type)
- DPBS
- Trypsin/EDTA 0,05% or 0,25%
- Alcohol 70%
- Bottles for cell cultivation
- Gloves
- Pipettes
- Pipettes tips: p200 e p1000
- Eppendorfs
- Tripan blue
- Neubauer chamber

PROCEDURES

- **General disinfection**
 - Use alcohol 70% for cleaning plastics, bottles, laminar flow, gloves, benches
- **Shed the old medium**
 - Move to Falcon and reserve
- **Wash**
 - add 3,0 mL (40 cm³) or 10 mL (70cm³) DPBS and mix
 - shed the DPBS to Falcon
- **Trypsinization**
 - add X mL Trypsin in a bottle and mix
 - incubate at 37°C for 3 min.
 - observe in microscope the cell release, tap with need.
 - Shed the falcon content to bottle and mix
 - Return the content to a falcon for centrifugation – use 1200 RPM for 3 min.
 - Despise the supernatant
 - Dilute the pallet in 1,0mL DPBS and mix, use a vortex with need
- **Cell count**
 - mix 30 µL of DPBS containing the cells with 90 µL Tripan Blue, use vortex.
 - Fill the neubauer chamber with 10 µL

Coments:

Trypsinization: 2,0 mL Trypsin (0,05%) to glyoma and neuroblastomas cells, 1,0 mL to HEK cells.
1,0 mL Trypsin (0,25%) to glyoma and neuroblastomas cells, 0,5 mL to HEK cells.

Procedures to Cell Maintenance - Plating Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	43.1

1/2

- Count the total of cells at the 4 quadrants and use formula: $\frac{\text{Total of cells } X_{\mu}}{4} \cdot 10^4$
- The results indicate the amount of cells in 1mL
- **Plating**
 - in a new bottle add 5,0mL of fresh medium for 25 cm³ or 20 mL for 75 cm³
 - add 50 – 100 μL of DPBS containing cells and mix
 - observe in a microscope
 - incubate at 37°C and 5% of CO₂
- **Storage**
 - centrifuge the rest of DPBS solution containing the cells
 - shed the supernatant
 - freeze the pellet at -20° C.

END.**Coments:**

Trypsinization: 2,0 mL Trypsin (0,05%) to glyoma and neuroblastomas cells, 1,0 mL to HEK cells.
1,0 mL Trypsin (0,25%) to glyoma and neuroblastomas cells, 0,5 mL to HEK cells.

ANEXO C – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO 46

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 *eppendorf* 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 *eppendorf*;
- Acrescentar 700 μ L de *Buffer RW1* à coluna e centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm ou 8.000xg;

Extração de RNA com Kit comercial RNeasy Plus QIAGEN	POP
	46

Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica

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 µL 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 µL 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 *ependorff* 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 µL 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 µL de água destilada *RNAse Free*;
- Descartar a coluna e armazenar o filtrado (RNA) em freezer, ideal que seja a -70°C.

FIM.

Comentários:

ANEXO D – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO 48

Transcrição Reversa – Max Planck Lab. de Tecnologias para Terapia Genica	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;
- Ponteiras 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; **ou random primer**
 - Água RNase free para completar 12μL.
 - *Mix*;
 - *Spin* em centrífuga;
 - Incubar 10 minutos a 70°C;
 - Descansar no gelo ou 4 °C por 1 minuto.
- Passo 2 – Buffer RT
 - **Recomendo 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:

ANEXO E – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO 25.3

Preparação de DNA plasmidial-Megaprep Kit Qiagen	POP
Lab de Tecnologias para Terapia Gênica	25.3

- Cultivar bactérias em meio LB durante a noite (37°C)
- Centrifugar a cultura de bactérias em frascos apropriados (6000g/ 15 minutos/ 4°C).
- Descartar o sobrenadante
- Ressuspender o *pellet* em 50mL de buffer P1
- Acrescentar 50mL de buffer P2, misturar vigorosamente e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
- Dicionar 50mL de buffer P3 pré-resfriado e agitar vigorosamente
- Filtrar o homogeneizado à vácuo
- Adicionar ao filtro 50mL de buffer FWB2 e filtrar novamente
- Adicionar 125mL de buffer ER ao lisado filtrado. Misturar e incubar no gelo por 30 minutos
- Filtrar, por ação da gravidade, o homogeneizado na coluna QIAGEN-TIP 2500
- Após filtração, lavar a coluna com 200mL de buffer QC
- Eluir o DNA plasmidial com 35mL de buffer QN
- Adicionar 24,5mL de isopropanol ao filtrado e homogeneizar.
- Centrifugar a 15000 g por 30 minutos
- Descartar o sobrenadante
- Lavar o *pellet* com etanol 70% preparado com água do próprio kit. Não homogeneizar ou ressuspender!
- Centrifugar (15000g / 10 minutos)
- Descartar o sobrenadante
- Deixar o *pellet* secar por 10-20 minutos
- Ressuspender em 1mL de água MilliQ autoclavada.