

THAIS TORQUATO SALES

**Silenciamento do canal de potássio Eag1 potencializa efeitos da temozolomida
em células U-87 MG de glioblastoma multiforme**

Brasília

2015

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

THAIS TORQUATO SALES

Silenciamento do canal de potássio Eag1 potencializa efeitos da temozolomida em células U-87 MG de glioblastoma multiforme

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestra 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

2015

THAIS TORQUATO SALES

**SILENCIAMENTO DO CANAL DE POTÁSSIO EAG1 POTENCIALIZA EFEITOS DA
TEMOZOLOMIDA EM CÉLULAS U-87 MG DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

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

Aprovada em _____ de _____ de 2015.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Ricardo Titze-de-Almeida
Universidade de Brasília**

**Prof. Dra. Márcia Renata Mortari
Universidade de Brasília**

**Prof. Dra. Ana Carolina Mortari
Universidade de Brasília**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao nosso Senhor DEUS pelas bênçãos, saúde e força para superar todas as dificuldades enfrentadas durante essa jornada.

Ao Professor Dr. Ricardo Titze-de-Almeida, pela oportunidade de crescimento profissional, orientação e pelas contribuições dadas a este trabalho.

Meus sinceros agradecimentos aos amigos do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica: Fernando Resende, Natália Montenegro, Camila Horst, Wesley Rocha, Franciele Schlemmer e Simoneide Souza Titze de Almeida. Todos vocês foram meus companheiros de pesquisas e dedicaram parte do seu tempo para este trabalho.

À Profa. Marcella Lemos Bretas e Natália Lemos Chaves, por não pouparem esforços para me acompanhar nos experimentos de citometria de fluxo.

Agradeço aos meus pais e minha irmã, pela torcida, apoio e motivação. Amo vocês! Obrigada por tudo.

Ao meu grande amigo e eterno companheiro Martin Ruiz Saman, por estar sempre ao meu lado, por compreensão nos momentos de ausência e incentivo nos momentos de desânimos e cansaço. Obrigada por você existir na minha vida!

Agradecimentos aos amigos, Milton Luiz da Paz Lima e Arailde Fontes, vocês foram muito importantes para a minha formação científica.

Aos amigos do grupo *Amanita* (Eriquita, Vanessinha e Dudu), pela amizade e momentos de descontração.

À querida Socorrinha, pelas palavras de apoio, incentivo e também por preparar aquele cafezinho!

Agradeço também à Profa. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

“Nós crescemos pensando que o nosso destino estava nas estrelas, agora sabemos que, em boa parte, nosso destino está nos genes.”

(James Dewey Watson)

RESUMO

Glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais comum de tumor cerebral primário em seres humanos adultos, representando aproximadamente 55% dos casos. O processo tumoral desenvolve-se de maneira agressiva e as opções terapêuticas são limitadas. O protocolo de tratamento padrão inclui radioterapia em combinação com temozolomida (TMZ), combinado com excisão cirúrgica quando possível. Apesar de alguns avanços no tratamento de GBM, o tempo de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com esse tipo de glioma é de aproximadamente 14,5 meses. A interferência de RNA (RNAi) é um mecanismo de silenciamento de genes e está entre as abordagens promissoras para a terapia do câncer. Assim, utilizou-se a metodologia de RNAi para supressão do canal de potássio Ether à go-go 1 (Eag1) em células de glioblastoma da linhagem U-87 MG. Este alvo molecular tem papel relevante na tumorigênese de vários tipos de câncer, auxiliando na proliferação celular e metástases. O estudo realizado na presente dissertação examinou o papel de Eag1 na viabilidade das células de glioma tratadas com TMZ. Inicialmente, realizaram-se ensaios experimentais com concentrações de TMZ (125, 250 ou 500 μM) e pontos temporais (24h, 48h, ou 72h). A viabilidade celular do glioma foi determinada via ensaio de 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). No ponto temporal de 72h e concentração de 250 μM , o fármaco TMZ diminuiu a viabilidade das células em aproximadamente 50%. Com base nesse resultado da curva dose-resposta, estabeleceu-se a concentração do quimioterápico para a execução dos ensaios seguintes. Testaram-se, também, os efeitos do bloqueador de canal de potássio astemizol (ATZ 2,5 μM , 5 μM e 10 μM) ou vetor de expressão de shRNA denominado pKv10.1-3 (0,2 μg) sobre a viabilidade do glioma nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Este vetor expressa grampos curtos de RNA (shRNA) direcionados à sequência de RNAm de Eag1 5'-GTCCACTTGGTCCATGTCCAG-3'. Além disto, avaliou-se os efeitos causados por ATZ 5 μM ou por pKv10.1-3 (0,2 μg) em combinação com TMZ 250 μM , no tempo de 72 horas. O tratamento com pKv10.1-3 potencializou, de maneira significativa, a redução na viabilidade celular causada por TMZ sobre células de glioma (77,2% versus 47,9%). Verificou-se, ainda, que a inibição de Eag1 por astemizol (5 μM) ou pKv10.1-3 aumenta a taxa de apoptose causada por TMZ, conforme ensaio de citometria de fluxo. pKv10.1-3 (0,2 μg) reduziu significativamente o conteúdo de RNAm de Eag1, para 0,57 vezes em relação ao valor observado no grupo controle negativo pScramble (0,2 μg), conforme resultado de RT-qPCR. Quanto à proteína Eag1, esta mostrou-se elevada nas células de glioblastoma humano da linhagem U-87 MG. Os tratamentos experimentais causaram redução do conteúdo desta proteína, detectada por imunocitoquímica. Portanto, os dados do presente estudo revelam que Eag1 desempenha papel na viabilidade das células de glioma, além disso, mostraram que a supressão desse canal potencializa a ação da TMZ em células U-87 MG de glioblastoma multiforme.

Palavras-chave: *Ether à go-go 1*; Eag1; Kv10.1; linhagem celular de glioblastoma U-87 MG; RNAi; temozolomida; astemizol; shRNA; terapia gênica.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary brain tumor in human adults, accounting for about 55% of cases. Tumorigenesis develops aggressively and the therapeutic alternatives remain limited. The standard treatment includes radiotherapy in association with chemotherapy with temozolomide (TMZ) and the surgical excision of tumor tissues. Despite some advances in GBM treatment, the survival time of patients diagnosed with GBM is nearly 14.5 months. RNA interference (RNAi) is a strategy for gene silencing considered a promising approach for cancer treatment. The present study used RNAi to suppress the Ether à go-go 1 (Eag1) potassium channel in U-87 MG glioblastoma cells. Eag1 is an oncological target which plays an important role in tumorigenesis of various cancers, improving cell growth and metastasis. The aim of this study was to examine the role of Eag1 in glioma cells treated with TMZ. First, we tested the effects of TMZ on glioma cell viability, examining drug concentrations (125, 250 and 500 μ M) at three time points (24h, 48h and 72h). Cell viability was determined by the 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. At 72h and concentration of 250 μ M, TMZ decreased the cell viability in about 50%. Based on this dose-response curve, the drug concentration for the following tests was set up. We also evaluated the effects of astemizole (ATZ, an Eag1 channel blocker) at 2.5 μ M, 5 μ M and 10 μ M or a shRNA expression vector named pKv10.1-3 (0.2 μ g). This vector expresses short-hairpin RNA (shRNA) targeting the Eag1 mRNA sequence 5'-GTCCACTTGGTCCATGTCCAG-3'. Cell viability was determined at 24, 48 and 72 hours. In addition, we evaluated the effects caused by ATZ 5 μ M or by pKv10.1-3 (0.2 μ g) in association with TMZ 250 μ M, at 72 hours. The vector pKv10.1-3 increased the effect of TMZ on glioma cells (77.2% vs. 47.9%). Also, the Eag1 inhibition by astemizole (5 μ M) or pKv10.1-3 increased the apoptosis rate caused by TMZ, as determined by flow cytometry. pKv10.1-3 (0.2 μ g) significantly decrease Eag1 mRNA content to 0.57 times in comparison with the value found in pScramble (0,2 μ g) control group, as determined by RT-qPCR. Indeed, GBM cells present a high expression of Eag1 protein. The experimental treatments reduced this protein content, as revealed by immunocytochemistry results. In conclusion, the results of this study reinforce that Eag1 plays a role in glioma cell viability. In addition, they show the channel suppression improves TMZ effects on U-87 MG GBM cells.

Key Words: *Ether à go-go 1*; Eag1; Kv10.1; U-87 MG glioblastoma cell line; RNAi; temozolomide; astemizole; shRNA; gene therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição por histologia e tipos de gliomas na população americana nos períodos de 2007-2011.....	14
Figura 2. Imagem de ressonância magnética de um paciente com GBM, demonstrando formato em “asas de borboleta”.....	16
Figura 3. Desenho esquemático da estrutura do canal K _v 10.1.....	19
Figura 4. Mecanismos de silenciamento gênico por vetor de expressão de shRNA.....	22
Figura 5. Morfologia da linhagem celular U-87 MG.....	24
Figura 6. Efeitos da TMZ sobre a viabilidade de células U-87 MG.....	31
Figura 7. Efeitos de astemizol (ATZ 2,5 µM, 5 µM e 10 µM) e pKv10.1-3 (0,2 µg) sobre a viabilidade de células U-87 MG.....	32
Figura 8. Efeitos causados por ATZ ou por pKv10.1-3, isolados ou em combinação com TMZ, sobre a viabilidade das células U-87 MG.....	34
Figura 9. Micrografias de células de glioma (U-87 MG) expostas aos tratamentos com temozolomida, astemizol ou vetor pKv10.1-3, isolados ou em combinação.....	35
Figura 10. Determinação de apoptose em células da linhagem U-87 MG de glioblastoma.....	37
Figura 11. Análise de RNA total por eletroforese em gel de agarose.....	38
Figura 12. Redução do conteúdo relativo do RNAm de Eag1 em células U-87 MG tratadas por TMZ, pKv10.1-3, ou ambos, durante 72 horas.....	39
Figura 13. Imunocitoquímica para Eag1 em células da linhagem de glioma humano U-87 MG.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da OMS para os tumores astrocíticos	15
Tabela 2 – Nomenclatura do Eag1 de acordo com a União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

ATZ – Astemizol

BCRJ – banco de células do Rio de Janeiro

BHE – barreira hematoencefálica

CBTRUS – Central de Registros de Tumor Cerebral dos Estados Unidos

cDNA – DNA complementar

Ct – Ciclo limiar (*threshold cycle*)

D-MEM/F12 – *Dulbecco's Modified Medium*

DMSO – Dimetilssulfóxido

DNA – deoxyribonucleic acid (ADN, sigla em português: ácido desoxirribonucleico)

DPBS – *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

dsRNA – *Double stranded RNA*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM – erro padrão da média

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GBM – Glioblastoma Multiforme

hEag1 – *ether-à-go-go 1* humano

INCA – Instituto Nacional do Câncer

KCNH1 – Eag1 (nome do gene humano)

MGMT – O(6)-metilguanina-DNA-metiltransferase

MTT – brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAPOLA – *Poly(A) polymerase alpha*

PI – Propidium iodide (IP, sigla em português: Iodeto de propídio)

POP – Procedimento operacional padrão

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RT-qPCR – PCR quantitativa após transcrição reversa de RNA

RISC – *RNA-induced silencing complex*

RNA – ribonucleic acid (ARN, sigla em português: ácido ribonucleico)

RNAi – RNA de interferência

RNAr – RNA ribossomal

RNA_m – RNA mensageiro

shRNA – *short hairpin* RNA

siRNA – *short interfering* RNA

SNC – Sistema Nervoso Central

SFB – Soro Fetal Bovino

SPSS – Programa estatístico para as Ciências Sociais

TMZ – Temozolomida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Gliomas como tumores do Sistema Nervoso Central	14
1.2 Glioblastoma Multiforme	15
1.3 Tratamento	17
1.4 Canais de potássio e câncer	17
1.5 Canal Eag1 (Kv10.1)	18
1.6 Abordagens para inibir o canal Eag1 no câncer	19
1.7 Silenciamento gênico via vetor de expressão de <i>short hairpin</i> RNA (shRNA).....	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Linhagem celular e condições de cultura	24
3.2 Preparo dos fármacos	25
3.3 Vetor de expressão de shRNA e transfecção celular	25
3.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT	26
3.5 Determinação da apoptose celular por citometria de fluxo	26
3.6 Quantificação de RNAm de Eag1 por RT-qPCR	27
3.7 Extração de RNA total	27
3.8 Análise de RNA por eletroforese em gel de agarose	28
3.9 Quantificação do RNA total	28
3.10 Transcrição reversa (RT) para síntese do DNA complementar	28
3.11 Amplificação e quantificação de alvos por qPCR	28
3.12 Análise da expressão de Eag1 por imunofluorescência	29
3.13 Análise estatística	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Efeitos da TMZ sobre a viabilidade de células da linhagem U-87 MG	30
4.2 Redução da viabilidade de células de glioma causada por astemizol ou pKv10.1-3	32
4.3 Supressão de Eag1 por astemizol ou pK10.1-3 potencializa os efeitos da TMZ.	33
4.4 Análise morfológica de células de glioma após tratamentos experimentais.....	35
4.5 Apoptose celular determinada por citometria de fluxo.....	36

4.6 Expressão de Eag1 em células de glioma tratadas com TMZ e efeitos da transfecção com pKv10.1-3.....	38
1 Eletroforese em gel de agarose	38
2 Quantificação do conteúdo de RNAm de Eag1 por RT-qPCR	38
3 Imunocitoquímica para Eag1	40
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICE A – ENSAIOS DE MTT: GRUPOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .	54
1. Curva dose-resposta dos efeitos da temozolomida (TMZ)	54
2. Bloqueio farmacológico do Eag1 com astemizol (ATZ)	54
3. Silenciamento gênico de Eag1 via interferência de RNA	54
4. Efeitos do bloqueio farmacológico de Eag1 com astemizol associado à TMZ e do silenciamento gênico de Eag1 após injúria com TMZ	55
APÊNDICE B – CAPÍTULO DE <i>E-BOOK</i>	56
ANEXO A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP 43.1)	60
ANEXO B – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER	63
ANEXO C – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas como tumores do Sistema Nervoso Central

Neoplasias do Sistema Nervoso Central (SNC) são tumores que afetam o encéfalo e a medula espinhal. A incidência mundial de câncer do SNC chega a apenas 1,9% (1). Porém, tumores cerebrais apresentam mau prognóstico e a expectativa de vida dos pacientes é curta, cerca de 12 a 15 meses (2). No Brasil, as estimativas do ano de 2014 foram de 4.960 novos casos de câncer do SNC em homens e 4.130 em mulheres (1). Aproximadamente 80% dos tumores primários do SNC são gliomas malignos. Esses tumores cerebrais apresentam maior frequência em adultos e estão entre os tipos mais agressivos de câncer (3,4). Dados estatísticos da Central de Registros de Tumor Cerebral dos Estados Unidos (CBTRUS) mostram que glioblastomas multiformes (GBMs) são responsáveis por 54,7% dos casos de câncer do SNC (Figura 1).

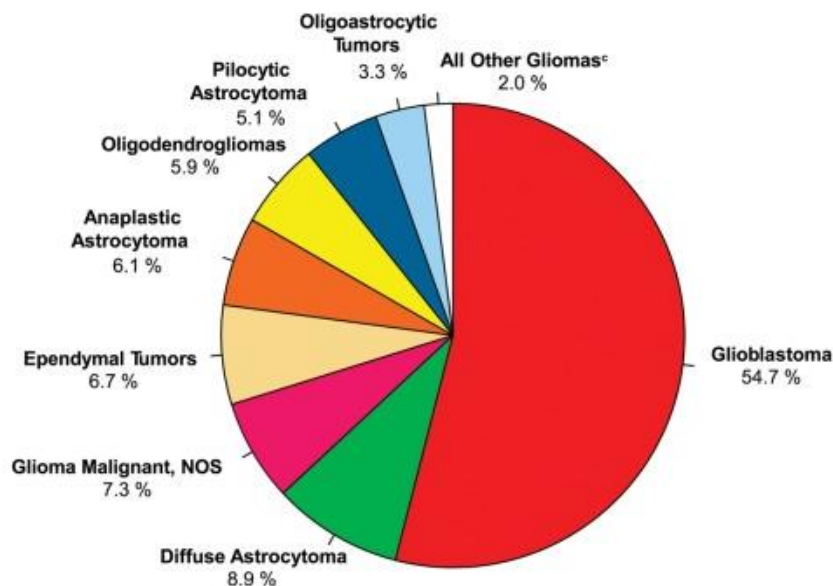


Figura 1. Distribuição por histologia e tipos de gliomas na população americana nos períodos de 2007-2011. Ostrom et al., 2014 (3).

Gliomas são originados a partir das células gliais (astrócitos, oligodendrócitos ou ependimócitos) (5). Os tipos mais comuns de gliomas se desenvolvem a partir de astrócitos, originando astrocitomas, e tem sido classificados de acordo com a sua gravidade, em termos de taxa de crescimento, proliferação e infiltração. Assim, são

divididos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em quatro tipos ou graus, baseados na aparência histológica dos tumores (Tabela 1) (6).

Tabela 1 – classificação da OMS para os tumores astrocíticos

Grau (OMS)	Astrocitoma	Características
I	Astrocitoma pilocítico	Tumores biologicamente benignos de crescimento lento. Maiores chances de cura após a remoção cirúrgica.
II	Astrocitoma difuso	Apresenta crescimento e proliferação relativamente baixos. Entretanto, cresce mais rapidamente do que o astrocitoma pilocítico (Grau I). Há possibilidade de invasão para o tecido cerebral após a remoção cirúrgica, podendo ocorrer recidivas.
III	Astrocitoma anaplásico	Crescimento mais rápido, com tendência de progredir para o grau IV. Demonstra proliferação celular alta, e suas lesões invadem o tecido normal. Há recidivas após o tratamento.
IV	Glioblastoma Multiforme (GBM)	Apresenta o maior grau de malignidade. Trata-se do glioma mais agressivo, com alto potencial proliferativo. As células de GBM, quando observadas em microscópio, possuem várias alterações na sua morfologia. Regiões necrosadas também podem ser observadas no centro de um tumor de GBM.

1.2 Glioblastoma Multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM ou astrocitoma de grau IV) é o mais comum dos tumores malignos cerebrais e caracteriza-se por apresentar capacidade de invasão e infiltração para o tecido cerebral circundante (7).

Os GBMs são classificados em primários (*de novo*) ou secundários. GBMs primários são tumores que se desenvolvem sem evidência clínica, radiológica, ou histopatológica de uma lesão precursora. Seu crescimento é rápido e de forma muito agressiva. Ocorrem em pacientes com idade média de 62 anos. Quanto ao GBM secundário, este se desenvolve mais lentamente pela progressão de astrocitomas preexistentes de baixo grau (astrocitomas difusos ou astrocitomas anaplásicos). Geralmente ocorrem em pacientes mais jovens, com idade média de 45 anos. A sobrevida dos indivíduos com esse tipo de câncer é curta, entre 12 a 15 meses, e apenas 3-5% dos pacientes sobrevivem mais que três anos (8,9,10).

O crescimento tumoral dos GBMs geralmente localiza-se na substância branca dos hemisférios cerebrais. Como característica macroscópica, apresentam massa expansiva pobremente definida. Frequentemente, o tumor infiltra o corpo caloso, atravessando o hemisfério contralateral, sendo denominado de glioma asas de borboleta (Figura 2) (11,12,13). Microscopicamente, apresentam atipias nucleares, células gigantes e atividade mitótica acelerada (11,12,14).

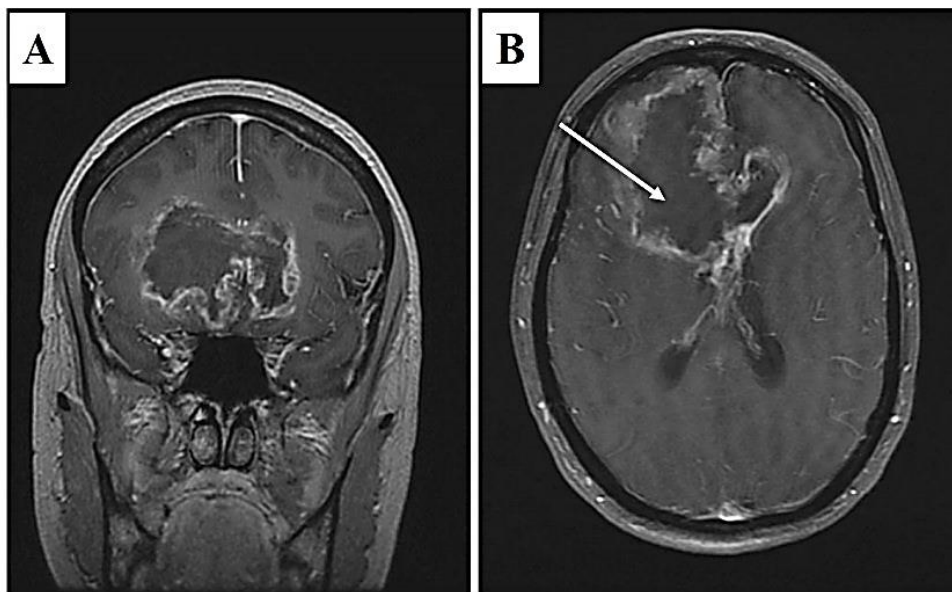


Figura 2. Imagem de ressonância magnética de um paciente com GBM, demonstrando formato em “asas de borboleta”. Porção coronal (A) e corte axial (B). Há o envolvimento adjacente de ambos os hemisférios; o tumor está invadindo a região do joelho do corpo caloso, indicado pela seta. Adaptado de Dziurzynski et al., 2012 (13).

1.3 Tratamento

O padrão atual de tratamento para pacientes recém diagnosticados com glioblastoma inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ). Isso resulta em um tempo maior de sobrevida em média de 14,6 meses, em comparação com 12,2 meses para os pacientes tratados somente com radioterapia (15).

A especialidade farmacêutica contendo o princípio ativo da temozolomida denomina-se Temodal[®] (Schering-Plough, EUA). Trata-se de um agente de metilação do DNA, da classe Triazeno. Seu mecanismo de ação ocorre por meio da alquilação do DNA nas posições O⁶ e N⁷ da guanina e N³ da adenina (16). Reduzem, assim, a proliferação de células tumorais. Esse antineoplásico é uma substância lipofílica de peso molecular baixo (194.15 g/mol), sendo bem absorvido por via oral. Além disso, a TMZ atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), alcançando os tumores cerebrais (17,18).

Embora o tratamento concomitante de TMZ com radioterapia aumente a expectativa de vida do paciente, os efeitos do fármaco são limitados. O processo de metilação do DNA, por exemplo, pode ser um evento sem sucesso, devido aos mecanismos de reparos que as células possuem, surgindo resistência ao tratamento com TMZ (19). Esta limitação terapêutica ressalta a necessidade de identificação de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

1.4 Canais de potássio e câncer

Canais iônicos são proteínas presentes na membrana plasmática celular, com papel importante para o funcionamento e homeostase das células. Participam, assim, de mecanismos específicos de fluxo de íons (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻) através da bicamada lipídica (20).

Ao longo dos últimos anos, pesquisas têm revelado a participação de canais iônicos em vários processos biológicos das células tumorais, tais como ciclo celular, volume citoplasmático, proliferação, migração e sobrevivência em condições de hipóxia (21,22,23). Alterações na regulação do ciclo celular resultam em proliferação descontrolada das células e conferem resistência à apoptose, fatores que contribuem ao desenvolvimento do câncer (24). A atividade de transporte de íons pode contribuir, também, para a invasão e migração celular, pois influencia o formato e volume das

células tumorais, facilitando a tumorigênese de GBM para a área sadia, por meio do espaço extracelular sinuoso do tecido cerebral (25,26). Por essas razões, canais iônicos podem contribuir para a proliferação acentuada das células de glioblastoma. Diferentes canais de K⁺ foram implicados no controle da progressão do ciclo celular e mostraram variações no ciclo, sejam em expressão ou atividade (27,28).

Entre os vários tipos de canais de K⁺ descritos até o momento, o Eag1 apresenta importância peculiar em favorecer a progressão tumoral. Alterações na sua atividade e/ou na expressão podem modificar o transporte de íons potássio na membrana, interferindo na manutenção da homeostase de oxigênio, aumentando a atividade de fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) e também o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) do tumor. Finalmente, sua hiperexpressão atribui às células características de neoplasia (29,30,31). Além disso, é consenso que o canal Eag1 é alvo promissor para o tratamento do câncer.

1.5 Canal Eag1 (Kv10.1)

O primeiro gene de Eag1 humano (hEag1) foi clonado a partir de mioblastos em cultura, sendo localizado no cromossomo 1q32-41. Oficialmente denominado de Kv10.1 (Tabela 2), pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR, sigla do inglês *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*). Eag1 é membro da família de canais de K⁺ dependentes de voltagem (K_v) (32,33).

Tabela 2 – nomenclatura do Eag1 de acordo com a União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica

Nomenclatura IUPHAR	Nome do gene humano	Nome comum
Kv10.1	KCNH1	eag1, ether à go-go

Os canais de K⁺ dependentes de voltagem, são constituídos por estrutura tetramérica. Cada uma destas quatro α -subunidades é composta por seis domínios transmembrana (S1-S6). A região do poro (P) está localizada entre os domínios S5 e S6. Possuem regiões amino (N) e carboxila (C) terminais localizadas no citoplasma. O terminal N consiste de um domínio per-Arnt-Sim (PAS), um sensor de hipóxia. Este sensor contribui para a ativação do fator HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*),

resultando em angiogênese e favorecendo o crescimento de células tumorais em um ambiente hipóxico (30). Já o terminal C contém um domínio de ligação de nucleotídeos cíclicos (cNBD, *cyclic nucleotide-binding domain*), que está envolvido na expressão funcional dos canais de K⁺ dependentes de voltagem (Figura 3) (34,35).

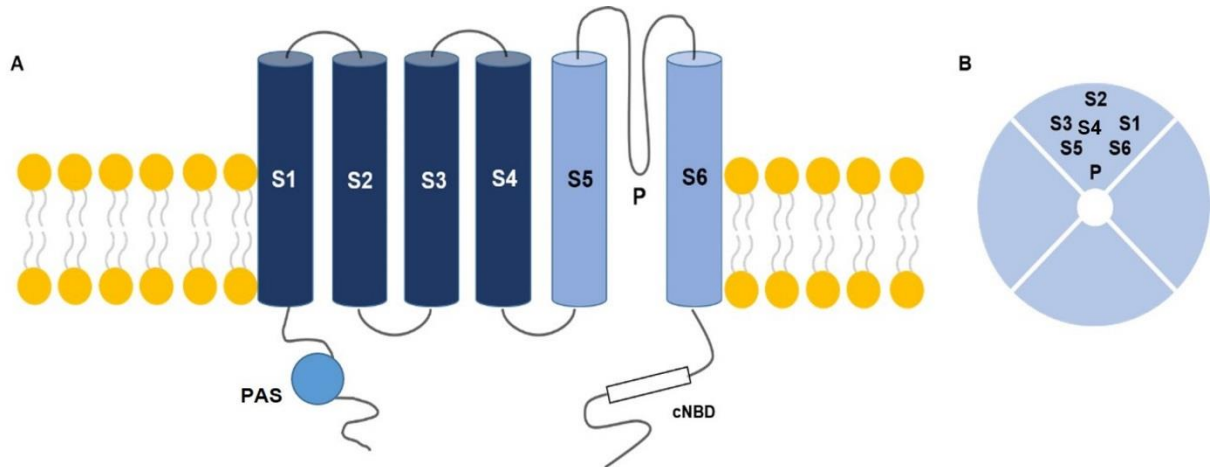


Figura 3. Desenho esquemático da estrutura do canal Kv10.1. (A) α -subunidades compostas por 6 domínios que atravessam a membrana plasmática (S1-S6). (B) estrutura composta por 4 α -subunidades e região do poro (P). Modificado de Schwarz & Bauer, 1999 (34).

O potencial tumorigênico de Eag1 foi descrito pela primeira vez em 1999 por Pardo e colaboradores, com a descoberta de que a inibição da expressão de Kv10.1 reduzia a proliferação em várias linhagens celulares de câncer (36). O canal Eag1 também foi detectado em aproximadamente 70% das biópsias de tumores humanos de diversas origens (37,38).

Quanto ao glioma, objeto do presente trabalho, pesquisas revelam que Eag1 está hiperexpresso em gliomas de pacientes, de diferentes subtipos e graus de malignidade (3939). Nenhum trabalho, entretanto, avaliou o papel de Eag1 na viabilidade de células tumorais de glioma tratadas com temozolomida.

1.6 Abordagens para inibir o canal Eag1 no câncer

Acerca da participação oncogênica do Eag1, vários tratamentos têm sido realizados para reduzir a proliferação celular (*in vitro*) ou o desenvolvimento tumoral (*in vivo*). O canal Eag1 pode ser inibido por imipramina ou astemizol (40), mediante o uso de anticorpos (41) e também por terapia gênica baseada em interferência de RNA (RNAi) (4242).

O antidepressivo tricíclico imipramina e o anti-histamínico astemizol foram usados para bloquear atividades eletrofisiológicas de Eag1, sendo que o tratamento com estes fármacos resultou na redução significativa da taxa de proliferação celular em câncer de mama e melanomas (40,43,44,45). No entanto, ambos os fármacos são inespecíficos e não seletivos para Eag1 (46), podendo ainda causar efeitos colaterais. Além disso, apresentam limitações de acesso ao SNC, o que limita o seu emprego no tratamento do glioma.

O primeiro anticorpo monoclonal contra Eag1 (mAb56) foi projetado e testado por Pardo e colaboradores em 2007 (41). O grupo encontrou redução de corrente de íons K⁺ do canal Eag1 em células isoladas e não observou qualquer redução sobre os canais Eag2 e hERG. Houve inibição do crescimento de células com base em diferentes linhagens tumorais humanas de diversas origens. Porém, o anticorpo anti-Eag1 não foi eficaz em todas as linhagens celulares testadas (41,47,48).

A interferência de RNA (RNAi) é uma estratégia de degradação parcial ou total de um RNA mensageiro (RNAm) alvo, por meio de curtas sequências de nucleotídeos. Como resultado, ocorreu redução do conteúdo da proteína de interesse, tanto *in vitro* como *in vivo*. O tratamento com siRNAs (do inglês *small interfering RNA*), direcionados a Eag1, resultou na redução do nível celular de RNAm e da proliferação em linhagens de células de câncer, tais como glioblastoma multiforme (U-138 MG), rabdomyossarcoma (TE-671, A204), fibrosarcoma (HT1080, Hs633t), câncer de mama (MCF-7, MDA-MB435S), melanoma (IGR39, IPC298), câncer de colo do útero (HeLa), neuroblastoma (SH-SY5Y) e meduloblastoma (Daoy) (49,50). Esses estudos reforçam a noção de que Eag1 é um alvo importante para a terapia do câncer e o silenciamento por RNAi é estratégia viável. Medicamentos à base de RNAi para terapia do câncer já estão em testes clínicos e podem tornar-se tratamentos aprovados nos próximos anos (51).

O silenciamento gênico da expressão do Eag1 pelo uso de shRNAs (do inglês *short hairpin RNA*) inibiu a formação e proliferação de colônias de células de osteossarcoma (MG-63), reduzindo a taxa de crescimento e progressão do ciclo celular. Nos experimentos *in vivo*, mostrou inibição do crescimento do tumor de osteossarcoma no modelo de xenoenxerto em camundongo nude (52). Interferência de RNA por vetor de expressão shRNA é o objeto do atual estudo. Nosso grupo desenvolveu um vetor plasmidial capaz de expressar shRNAs, que tem como alvo o RNAm de Eag1, chamado pKv10.1-3. Em estudo anterior, este vetor de expressão

reduziu a viabilidade das células de glioma e potencializou efeitos do interferon-gama (49). Dessa forma, o silenciamento da expressão dos canais de Eag1 pode ser potencialmente usado em conjunto com agentes quimioterápicos para o tratamento do GBM.

1.7 Silenciamento gênico via vetor de expressão de *short hairpin* RNA (shRNA)

Entre as abordagens para a terapêutica do câncer, encontra-se a terapia gênica baseada em interferência de RNA (RNAi do inglês *RNA interfering*), processo que regula os níveis de determinado RNAm. Essa metodologia já foi utilizada com sucesso para silenciar genes em células neuronais, em tumores neoplásicos intracranianos e modelos de doenças degenerativas (42,53). A RNAi é um mecanismo conservado durante a evolução das espécies para defender os organismos contra vírus, eliminando produtos de transcrições anômalas e *transposons*. A molécula-alvo dessa regulação é o RNA mensageiro (RNAm). Portanto, o silenciamento gênico ocorre em nível pós-transcricional (*post transcription gene silencing*). Recentemente descreveu-se que seu processo é mediado por pequenas fitas duplas de RNAs (dsRNAs, *Double strand* RNA), as quais são capazes de reconhecer sequências-alvo presentes em RNAm, causando silenciamento gênico (54,55). Desde a sua descoberta em 1998, por Fire e Mello, a interferência de RNA (RNAi) tem sido uma metodologia de interesse para pesquisa e desenvolvimento tecnológico (56,57).

O mecanismo de silenciamento gênico pode ser causado por microRNAs endógenos (miRNA) ou mediante moléculas exógenas sintetizadas quimicamente. Neste caso podem ser RNAs curtos de interferência (siRNA, *Small interfering* RNA) ou vetores de expressão de grampos curtos de RNA (shRNA) (58,59).

O termo *short hairpin* (shRNA) refere-se a sequências curtas de RNA que tem a forma de um pequeno grampo de cabelo. O vetor de expressão de shRNA é incorporado na célula e a sequência de interesse é transcrita no núcleo, pela maquinaria da célula, por meio da RNA polimerase III e de promotores próprios, especificamente H1 e U6 (60,61). O shRNA é transportado para o citoplasma por meio da exportina 5 e Ran-GTP. No citoplasma, o shRNA é carregado em um outro complexo de RNase III contendo a Dicer e TRBP/PACT. O *loop* do *hairpin* é clivado e o resultado do processamento forma curtos fragmentos de 19-23 nt de RNA em fita dupla (siRNA) com *overhang* de 2 nt 3' com sequências *sense* (*passenger strand*) e *antisense* (*guide strand*). Os siRNAs associam-se a proteínas citoplasmáticas para

formar o complexo RISC (RNA *Induced Silencing Complex*). Proteínas da família Argonata são o principal componente do complexo RISC. Nessa família, a proteína Argonata 2 é a única que contém atividade endonuclease necessária para abrir a dupla fita dos siRNAs e eliminar a fita *sense*. A fita *antisense* remanescente guiará o complexo RISC até o RNAm para o processo de degradação, resultando no silenciamento do gene, como mostrado esquematicamente na Figura 4 (60,61,62,63,64,65).

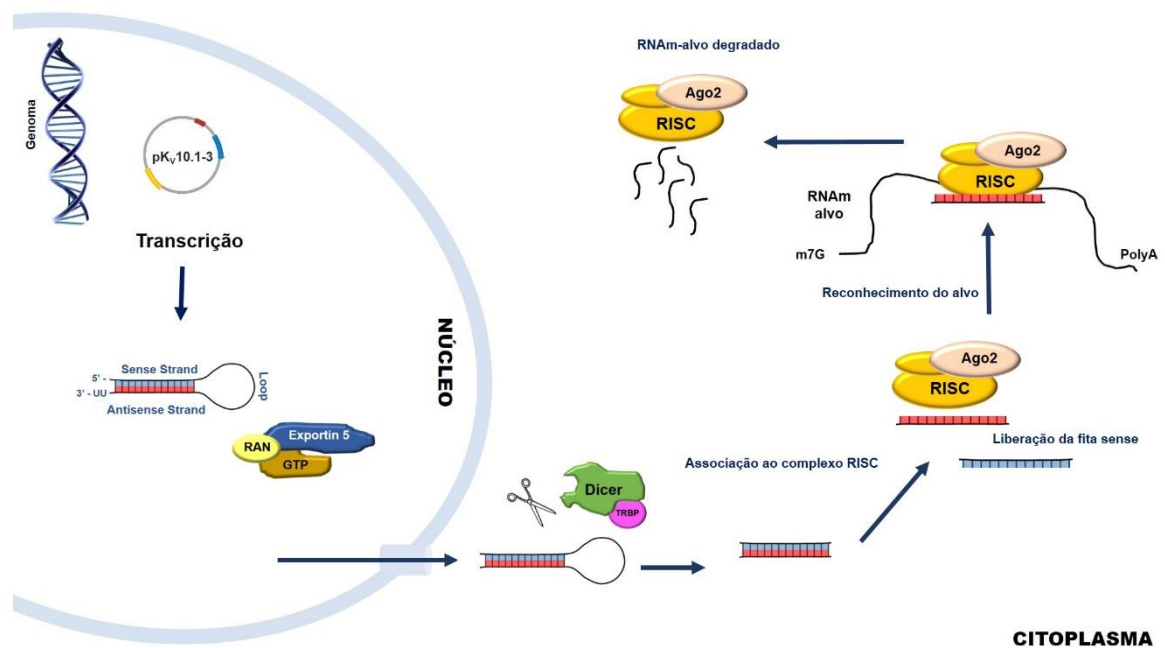


Figura 4. Mecanismos de silenciamento gênico por vetor de expressão de shRNA. O vetor plasmidial é transfectado na célula por meio de lipossoma catiônico. Uma vez no núcleo, os shRNAs são transcritos e exportados para o citoplasma pela proteína exportina-5, onde sofrem clivagem pela enzima Dicer. Os fragmentos gerados na clivagem, os siRNAs, são incorporados no RISC, resultando na degradação do RNAm alvo. Adaptado de Hajeri et al, 2009 (63).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

A presente dissertação objetivou avaliar o papel do canal de potássio Eag1 na biologia de células de glioblastoma multiforme, bem como os efeitos do seu silenciamento durante a injúria por temozolomida.

2.2 Específicos

- i. Avaliar o papel de Eag1 na viabilidade das células U-87 MG de glioma, mediante bloqueio farmacológico com astemizol ou silenciamento gênico pelo vetor pKv10.1-3.
- ii. Avaliar se a supressão de Eag1 sensibiliza as células de glioblastoma aos efeitos da temozolomida.
- iii. Correlacionar alterações do conteúdo de RNAm de Eag1 com efeitos do pKv10.1-3 em células tratadas com TMZ.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular e condições de cultura

A atual pesquisa utilizou a linhagem celular U-87 MG de glioblastoma multiforme, adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ. Trata-se de um tipo celular presente em astrocitomas, classificado como gliomas de grau IV. A morfologia celular está apresentada na Figura 5.

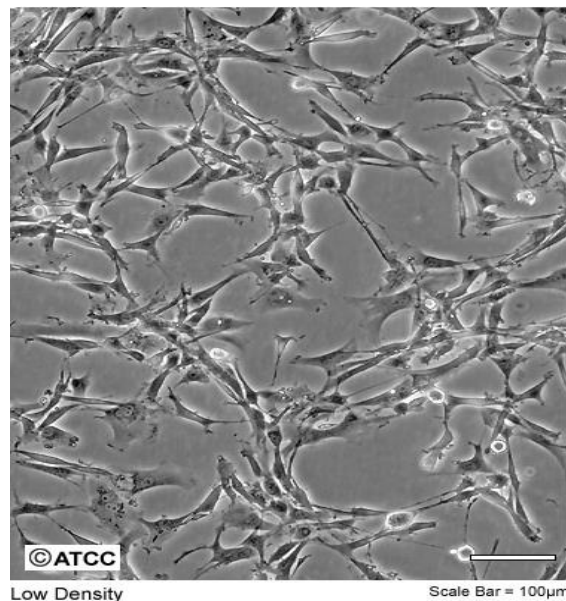


Figura 5. Morfologia da linhagem celular U-87 MG. Imagem obtida do Banco de Células Americano, American Type Culture Collection (ATCC: <http://www.atcc.org/products/all/HTB-14.aspx#characteristics>).

As células foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Medium + F12* (DMEM/F12 GIBCO™), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SBF) e 1% de Glutamax™ (GIBCO™). Além disso, receberam 1% de solução antibiótica/antimicótica (Sigma-Aldrich™), contendo 100 mg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. Os cultivos foram mantidos em estufa (*Thermo Scientific REVCO™*), com atmosfera úmida a 37° C e 5% de CO₂. Para o acompanhamento da taxa de crescimento, usou-se microscópio invertido (*Eclipse TS100-F, Nikon*). Cultivos celulares com 60% a 70% de confluência foram submetidos a passagens (repiques). Assim, foram lavados com *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS – GIBCO™), sendo os repiques realizados por método enzimático, utilizando-se solução de

Tripsina/EDTA 0,25% (Gibco™), durante 3 minutos a 37° C, seguido por lavagens com DPBS. A quantificação do número de células foi realizada com o auxílio de uma Câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Tripán (GIBCO™). O detalhamento dessa metodologia está apresentado no procedimento operacional padrão (POP), desenvolvido pelo Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica (Anexo A – POP 43.1).

3.2 Preparo dos fármacos

O presente trabalho utilizou os fármacos temozolomida (TMZ) (Orion Corporation, Turku, Finlândia, peso molecular 194,15) e astemizol (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha, peso molecular 458,57). Quanto à diluição inicial de TMZ, cinco miligramas do fármaco foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se solução concentrada em estoque de 50 mM. Posteriormente, o fármaco foi dissolvido em DPBS para a solução de trabalho nos ensaios experimentais, sendo armazenado a -20° C. Quanto ao astemizol, este foi dissolvido em DMSO, obtendo-se solução estoque 2 mM. O fármaco foi armazenado a -20° C. A concentração final de DMSO, no meio de cultura, não excedeu 0,01%. Portanto, não influenciou a viabilidade celular, conforme dados de experimentos preliminares.

3.3 Vetor de expressão de shRNA e transfecção celular

Neste trabalho utilizaram-se dois vetores de expressão shRNA. O primeiro, denominado pKv10.1-3, para expressar grampos curtos de RNA (shRNA) direcionados à sequência de RNAm de Eag1 5'-GTCCACTTGGTCCATGTCCAG-3'. O segundo vetor, pScramble, foi utilizado como controle negativo por expressar sequência nonsense (49). Ambos vetores de expressão de shRNAs foram desenhados para clonagem no plasmídeo pSilencer™ 3.1-H1 (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). O isolamento e purificação dos plasmídeos foram realizados utilizando-se kit comercial *EndoFree® Plasmid Mega kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

Para transfecção celular, os plasmídeos de shRNAs (0.2µg) foram estruturados em lipossomas catiônicos (*Lipofectamine 2000*TM, Invitrogen, Carlsbad, EUA) e meio Opti-MEM (Invitrogen, California, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. Os ensaios foram realizados em triplicatas. As condições de densidade celular e tempo pós-transfecção estão descritas a seguir, de acordo com os respectivos ensaios experimentais.

3.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Esse método colorimétrico foi descrito no ano de 1983, por Mosmann e colaboradores (66). A viabilidade celular é quantificada pela atividade enzimática mitocondrial das células viáveis, ou seja, o método baseia-se na habilidade das células metabolicamente ativas de reduzirem os sais de tetrazolium (coloração amarela) ao produto formazan (cor púrpura). Resumidamente, 10.000 células foram cultivadas em placas de 96 poços. Após cada tratamento experimental, as células foram incubadas com 15 µL de MTT (5 mg / mL em DMEM) durante 4h a 37 °C. Em seguida, o meio foi removido e 150 µL de DMSO foram adicionados a cada poço, visando-se dissolver os cristais de formazan. As placas foram examinadas mediante leitor de microplacas (SpectraMax® M2, Molecular Devices, California, EUA), calibrado para ler a absorbância a 595 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo calculadas as médias dos valores de absorbância de cada tratamento. O grupo sem tratamento (Mock) foi arbitrariamente definido como 100% de viabilidade, para fins de comparação. As condições experimentais para o método de MTT estão descritas no apêndice e nas legendas das figuras (Apêndice A).

3.5 Determinação da apoptose celular por citometria de fluxo

A detecção de apoptose celular foi realizada mediante kit comercial com uma combinação de Anexina V conjugada com FITC e Iodeto de Propídeo (PI) (Invitrogen, Califórnia, EUA). Para esse experimento, as células foram cultivadas em placas de 12 poços contendo 1×10^5 células/poço. Os grupos foram então incubados com 5 µL de Annexin V/FITC e 10 µL de iodeto de propídeo, por dez minutos. As células mortas apresentam-se permeáveis ao iodeto de propídeo, que irá ligar-se aos ácidos nucleicos

e marcá-los de vermelho, fato que não ocorrerá com as células viáveis e com as células em apoptose. Já as células apoptóticas ficarão coradas de verde fluorescente, enquanto as células vivas apresentarão pouca ou nenhuma fluorescência.

As condições experimentais para o teste de apoptose foram definidas com base nos resultados obtidos dos ensaios de MTT, conforme descrito anteriormente. Portanto, 72h após tratamentos com temozolomida, astemizol ou transfecção do pKv10.1-3, foi realizada a detecção de apoptose na linhagem U-87 MG. Analisaram-se 10.000 eventos em três experimentos independentes. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSVerse™, BD Biosciences, Nova Jersey, EUA), utilizando-se o software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, EUA).

3.6 Quantificação de RNAm de Eag1 por RT-qPCR

Células da linhagem U-87 MG foram cultivadas em placas de seis poços com densidade de 6×10^5 . Os ensaios foram realizados em triplicata, conduzidos no ponto temporal de 72 horas. Foram organizados cinco grupos experimentais: (i) Mock (células sem tratamento); (ii) TMZ 250 μ M; (iii) pKv10.1-3; (iv) pScramble (controle negativo) e; (v) pKv10.1-3 + TMZ 250 μ M. Após 24 horas de plaqueamento e adesão celular todos os grupos experimentais foram mantidos em meio de cultura Opti-MEM. Os grupos iii, iv e v foram transfectados com o vetor de expressão pKv10.1-3 (0,2 μ g), pScramble (0,2 μ g), ou pKv10.1-3 (0,2 μ g), respectivamente, estruturados em *Lipofectamina 2000*, conforme descrito no item 3.3. Após seis horas de transfecção, realizou-se a troca do meio de cultura Opti-MEM pelo meio DMEM/F12, em todos os grupos experimentais. Posteriormente, os grupos (ii e v) foram tratados com TMZ. Seguiu-se à extração do RNA total, conforme descrito a seguir.

3.7 Extração de RNA total

A extração de RNA dos grupos experimentais foi realizada utilizando-se o kit comercial RNeasy Spin Columns Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), com base nas instruções do fabricante. Após o último procedimento, o RNA foi eluído em 30 a 50 μ l de água livre de RNases. Finalmente, as amostras foram estocadas a -70° C até o momento de uso.

3.8 Análise de RNA por eletroforese em gel de agarose

Após a extração, as amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, preparado a partir de solução estoque de TBE 10X e brometo de etídio 0,5 µg/mL. A eletroforese foi realizada a 80 V em tampão TBE 1X. O padrão de migração do RNA foi visualizado em transiluminador UV e fotografado digitalmente, utilizando-se o Sistema Digimage Compacto (Major Science, Califórnia, EUA).

3.9 Quantificação do RNA total

O RNA foi quantificado por fluorimetria, utilizando-se o equipamento Qubit (Invitrogen, Califórnia, EUA).

3.10 Transcrição reversa (RT) para síntese do DNA complementar

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 2.500 ng de RNA total. Utilizou-se o sistema de *primers* oligo (dT) do kit comercial *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após a transcrição reversa, as amostras de cDNA foram mantidas na temperatura de -20°C, até o momento do ensaio de RT-qPCR.

3.11 Amplificação e quantificação de alvos por qPCR

A reação de PCR em tempo real utilizou *primers* específicos para a seqüência do RNA mensageiro de Eag1 humano e *primers* para o controle endógeno. Os *primers forward* e *reverse* para Eag1 foram 5'-TTGGAGATGTGTTCTGGAAGGAA-3' e 5'-AGGGCATCCCGCTTGATC-3', respectivamente (67). Para o gene endógeno (*housekeep gene*), utilizou-se como alvo o RNAm de poly(A) polimerase alfa (PAPOLA), *forward* e *reverse* 5' GCTACGAAGACCAGTCCATTG-3' e 5'-TGTTGGTCACAGATGCTGCT-3' (48,68).

A reação foi realizada em termociclador *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems™*, Califórnia, EUA). Os produtos de amplificação foram detectados por meio do corante fluorescente intercalante Fast SYBR Green

(Applied Biosystems, California, USA). O volume final para cada reação foi de 10 μL , incluindo 5,0 de Fast SYBR Green de máster mix, 2,0 μL de cDNA, 0,4 μL de cada primer sense e antisense (10 pmol/ μL) e água milli-Q q.s.p. 10 μL . As condições da PCR foram 95 °C por 5 minutos (desnaturação inicial) seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 60 segundos (desnaturação) e 60 °C por 60 segundos (anelamento e extensão). Cada amostra foi realizada em triplicata e o ensaio incluiu um controle negativo (*non-template*) para RT. O método de quantificação relativa ($\Delta\Delta\text{Ct}$) foi utilizado para expressar os efeitos de RNAi no conteúdo do RNAm de Eag1 (69).

3.12 Análise da expressão de Eag1 por imunofluorescência

Para avaliação de expressão de Eag1, células U-87 MG foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas circulares de vidro, contendo 1×10^5 células/poço. Após 72h de tratamento, foram fixadas com 250 μL de paraformaldeído (PFA 4%) por 15 minutos e permeabilizadas com 10% de Triton X-100 em PBS, por 10 minutos. Ligações não específicas foram bloqueadas com 5% de soro equino em PBS, por 1 hora. Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-Eag1.62.mAb (41). Esse anticorpo primário (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi diluído 1:1000 e incubado overnight a 4 °C. Como anticorpo secundário, utilizou-se Alexa Fluor® 488 anti-rato marcado com anticorpo de IgG (1:2000, Molecular Probes, Oregon, USA). Esse anticorpo foi diluído 1:1000 e incubado no escuro por 1 hora, em temperatura ambiente (0,2mL/poço). O núcleo da célula foi marcado com corante Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Madri, Espanha), por cinco minutos. As lâminas foram montadas e observadas em microscópio de fluorescência (Leica DM2000, Wetzlar, Alemanha), equipado com câmera digital (Leica DFC310 FX, Wetzlar, Alemanha). Cada condição experimental foi realizada em triplicata, em três experimentos independentes.

3.13 Análise estatística

Os resultados experimentais foram submetidos à análise estatística mediante o uso do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20. Foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Utilizou-se a análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste Tukey, para testar as diferenças entre

grupos. Diferenças entre pares de grupos foram analisadas pelo teste t de Student. O nível de significância estatístico adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da TMZ sobre a viabilidade de células da linhagem U-87 MG

Primeiramente, foi realizada uma curva de dose-resposta para avaliar o efeito do fármaco TMZ sobre a viabilidade de células de glioblastoma, por meio da técnica de MTT. TMZ causou diminuição dose-dependente na viabilidade celular nos três períodos de tempo examinados de 24, 48 e 72 horas (Figuras 6 A-C). A intensidade da injúria celular variou de acordo com as concentrações de TMZ e o período de tratamento. Na concentração de 125 μM , o fármaco reduziu a viabilidade celular para os valores de 91%, 87% e 89% durante os períodos de tempo de 24h, 48h e 72h, respectivamente (Figura 6 D). Células tratadas com TMZ 250 μM também apresentaram redução na sua viabilidade, e a diferença foi significativa para os tempos de 24h e 72h (84% *versus* 54%) (Figura 6 D; $p < 0,05$). Na maior concentração avaliada, TMZ 500 μM , também houve efeito tempo-dependente. A viabilidade celular variou de 59% a 13% entre os períodos de 24h e 72h (Figura 6 D; $p < 0,05$). Neste sentido, no ponto temporal de 72h as células de glioma apresentaram resposta mais linear às doses crescentes de TMZ (Figuras 6 C *versus* A e B). A concentração de 250 μM do fármaco diminuiu a viabilidade das células para um valor próximo de 50%. Assim, foi escolhida essa condição para os testes seguintes sobre o papel do Eag1 nos efeitos da TMZ.

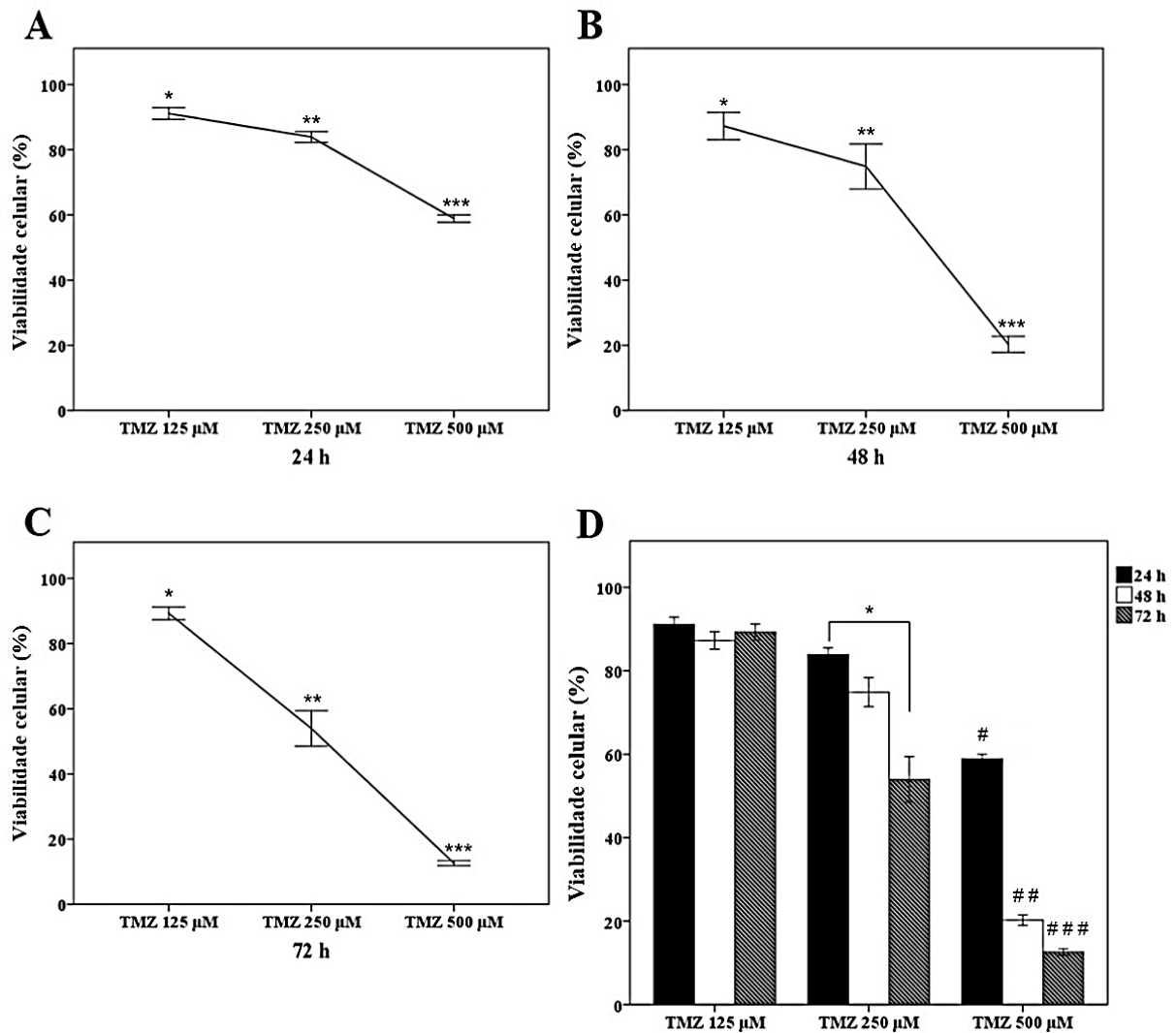


Figura 6. Efeitos da TMZ sobre a viabilidade de células U-87 MG. Os efeitos da TMZ nas concentrações de 125 µM, 250 µM e 500 µM foram medidos nos pontos temporais de 24h (A), 48h (B) e 72h (C). Em (D) estão descritos os efeitos da TMZ em diferentes concentrações (125, 250 e 500 µM), durante os períodos de incubação de 24h, 48h e 72 horas. A viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os grupos experimentais foram analisados em triplicatas, em oito ensaios independentes (n=8). Os resultados da viabilidade foram calculados com base no percentual dos valores de absorbância observados no grupo controle não tratado (Mock). Foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e submetidos à análise de variância one-way (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Em A, B e C, $p < 0,05$, * TMZ 125 µM versus TMZ 250 e 500 µM; ** TMZ 250 µM versus 125 e 500 µM, e *** TMZ 500 µM versus 125 e 250 µM. Em D, $p < 0,05$, * 24 horas versus 72 horas, em relação à concentração de TMZ 250 µM; # 24 horas versus 48 e 72 horas, em relação à concentração de TMZ 500 µM; ## 48 horas versus 24 e 72 horas em relação à concentração de TMZ 500 µM; ### 72 horas versus 24 e 48 horas em relação à concentração de TMZ 500 µM.

4.2 Redução da viabilidade de células de glioma causada por astemizol ou pKv10.1-3

No período de 24h, as células tratadas com astemizol 2,5, 5 ou 10 μM apresentaram redução de viabilidade dose-dependente, de 23%, 57% e 85%, respectivamente (Figura 7 A). Nas mesmas concentrações, o fármaco também provocou efeito dose-dependente no período de 48h de incubação, para valores que variaram entre 42% e 93% em relação aos mesmos tratamentos (Figura 7 B). No ponto temporal de 72 horas, astemizol também reduziu, de maneira dose-dependente, a viabilidade das células de glioma em 41%, 72% e 93%, de acordo com a dose utilizada, 2,5 μM , 5 μM e 10 μM (Figura 7 C).

O silenciamento gênico de Eag1, mediante transfecção com pKv10.1-3 (0,2 μg), também afetou a viabilidade de células de glioma. Células transfectadas com esse vetor apresentaram redução de viabilidade celular nos três tempos de tratamentos examinados. Os valores atingiram 47%, 35% e 40%, após 24, 48 e 72h de transfecção, respectivamente (Figuras 7 D-F). O grupo controle transfectado com lipofectamina também apresentou diminuição na viabilidade celular, sendo mais intenso o efeito em 24h (22%) do que em 72 horas (10%).

Em conjunto, os resultados de astemizol e pKv10.1-3 confirmaram que Eag1 contribuiu para a viabilidade das células de glioma.

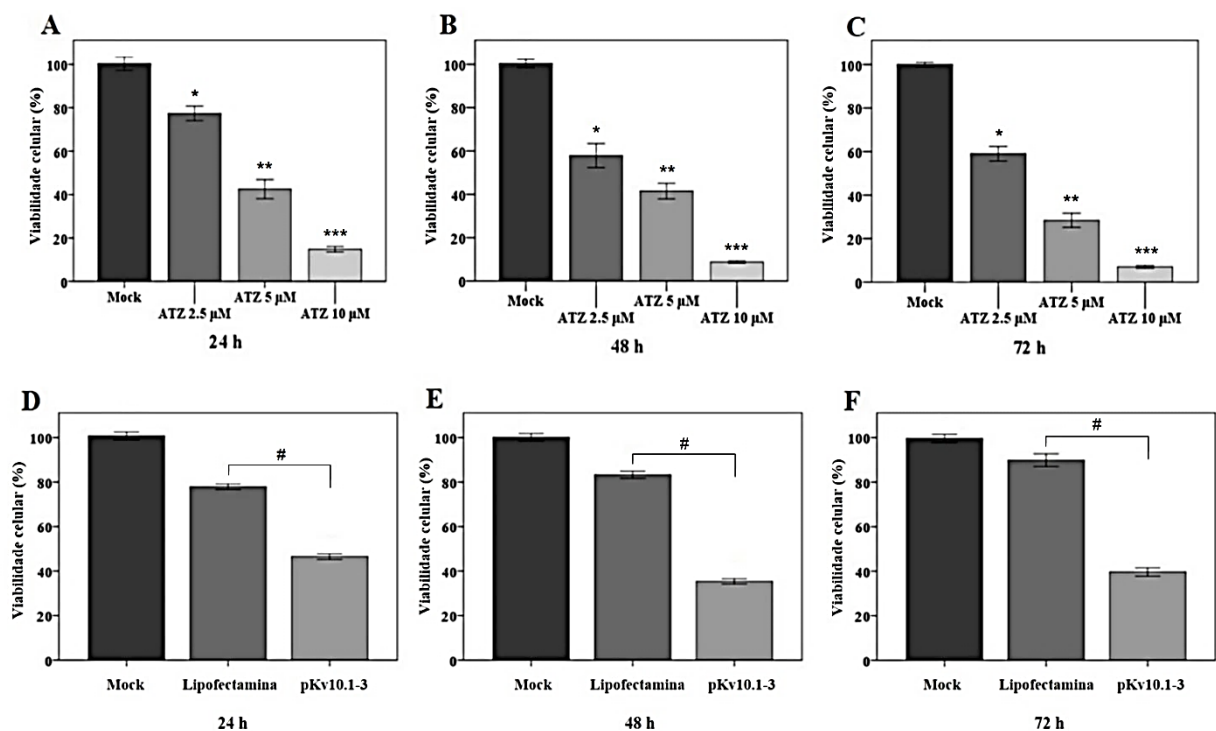


Figura 7. Efeitos de astemizol (ATZ 2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M) e pKv10.1-3 (0,2 μ g) sobre a viabilidade de células U-87 MG. Os efeitos de ATZ (A-C) e de pKv10.1-3 (D-F) sobre a viabilidade celular foram medidos em 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os grupos experimentais foram analisadas em triplicatas em oito ensaios independentes (n=8). Os resultados estão representados por percentagem com base nos valores encontrados no grupo controle (Mock), expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e submetidos à análise de variância one-way (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. Em A, B e C, $p < 0,05$, * ATZ 2,5 μ M versus ATZ 5 e 10 μ M; ** ATZ 5 μ M versus 2, 5 e 10 μ M e *** ATZ 10 μ M versus 2,5 e 5 μ M. Em D, E, F, $p < 0,05$, # pKv10.1-3 versus controle Lipofectamina.

4.3 Supressão de Eag1 por astemizol ou pK10.1-3 potencializa os efeitos da TMZ

Neste ensaio avaliaram-se os efeitos da supressão do canal Eag1 sobre a injúria causada por TMZ na linhagem celular de glioma. Os grupos experimentais pré-tratados com o bloqueador do canal de Eag1 astemizol ou pKv10.1-3 mostraram maior resposta à TMZ, segundo resultados de MTT.

O tratamento com astemizol 5 μ M resultou em 58,2% de redução de viabilidade celular. Já o o grupo tratado com temozolomida 250 μ M apresentou redução de 46% na viabilidade dos gliomas (Figura 8 A). A combinação de astemizol e TMZ provocou redução de 76,8% na viabilidade celular (Figura 8 A; $p < 0,05$).

O silenciamento de Eag1 pelo vetor pKv10.1-3 (0,2 μ g), em células de glioma, potencializou os efeitos da TMZ (Figura 8 B). A associação de pKv10.1-3 e TMZ 250 μ M diminuiu a viabilidade celular em 77,2%, um valor significativamente mais elevado do que os encontrados em grupos tratados com pKv10.1-3 (53,8%) ou TMZ (47,9%), isoladamente.

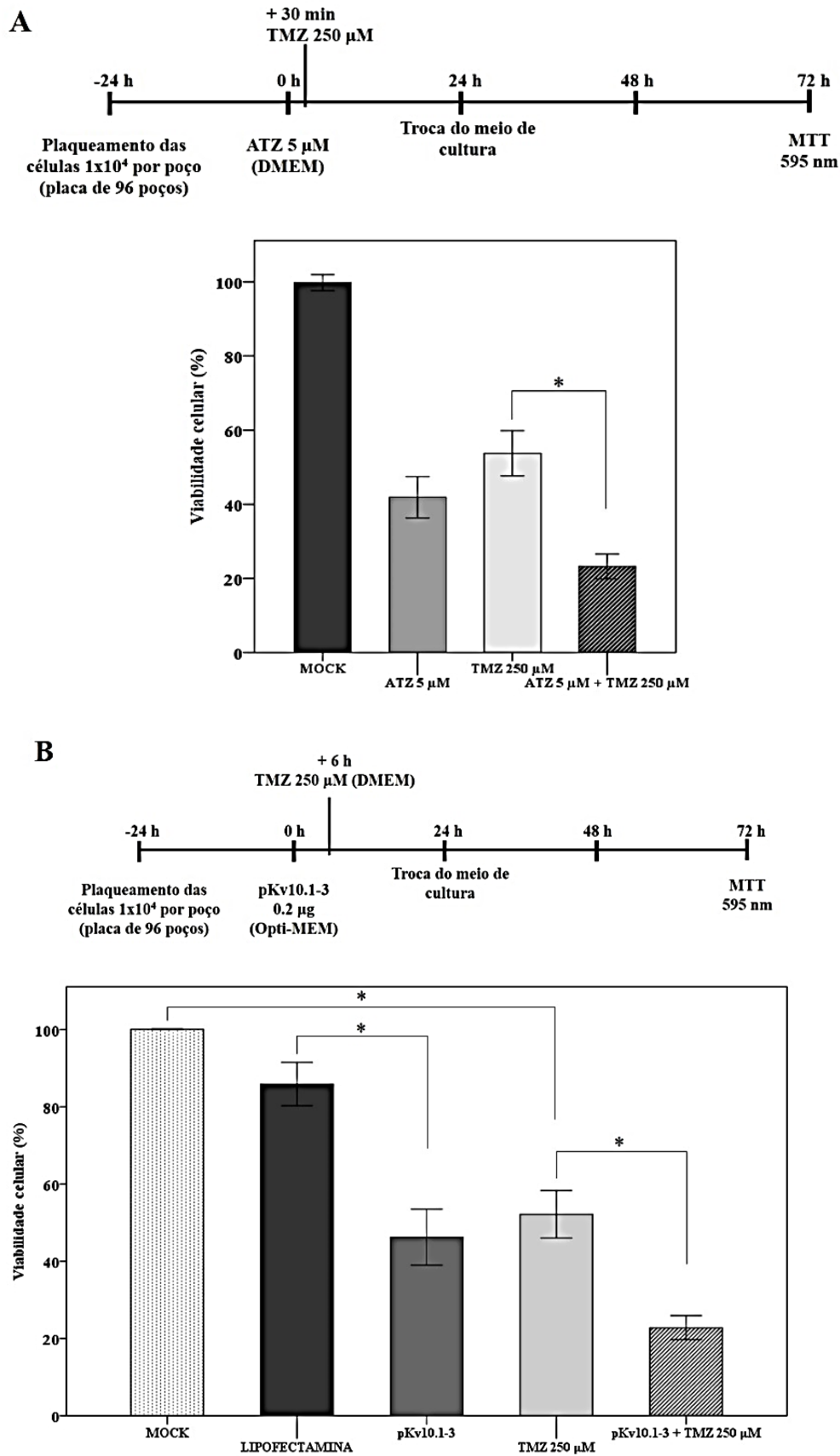


Figura 8. Efeitos causados por ATZ ou por pKv10.1-3, isolados ou em combinação com TMZ, sobre a viabilidade das células U-87 MG. A representação esquemática do procedimento experimental está

apresentada na parte superior de cada gráfico. Viabilidade celular de células de glioma sob bloqueio farmacológico de *Eag1*, em associação com TMZ, está descrita em (A). A viabilidade das células de glioma, após transfecção de pKv10.1-3 em combinação com TMZ, apresenta-se em (B). O ensaio foi determinado pelo método de MTT. Os grupos experimentais foram analisados em triplicata em oito ensaios independentes (n=8). Os resultados estão representados por percentagem com base nos valores encontrados no grupo controle (Mock), expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ (ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey).

4.4 Análise morfológica de células de glioma após tratamentos experimentais

A análise morfológica de células da linhagem U-87 MG, por microscopia óptica, submetidas aos tratamentos com TMZ, ATZ, pKv ou associações, revelou que a supressão de *Eag1* por ATZ 5 μ M ou pKv10.1-3, associada à TMZ, causou alterações morfológicas. Essas alterações incluem diminuição no comprimento (encolhimento celular), baixa aderência, formas redondas e flutuantes, características morfológicas que sugerem fenótipo apoptótico e morte celular, como revelado por microscopia de campo claro (Figura 9).

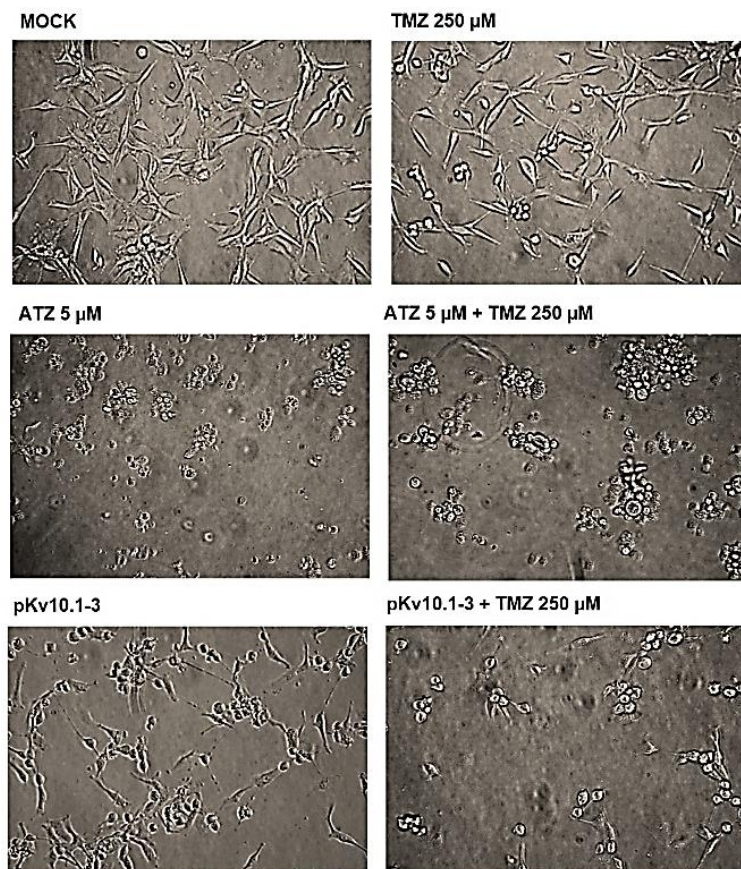


Figura 9. Micrografias de células de glioma (U-87 MG) expostas aos tratamentos com temozolomida, astemizol ou vetor pKv10.1-3, isolados ou em combinação. As imagens foram capturadas 72 horas

após os tratamentos e adquiridas por microscópio invertido de luz (Eclipse TS100-F, Nikon). Ampliação original 20x.

4.5 Apoptose celular determinada por citometria de fluxo

O ensaio experimental mediante marcação celular com Anexina V e Iodeto de propídio (PI), analisado por citometria de fluxo, revelou o grau de apoptose nas células de gliomas nos diferentes tratamentos, como mostrado nas figuras 9 A-G. A apoptose precoce (anexina V+ / PI-) e a apoptose tardia (Anexina V+ / PI+) estão representadas nos quadrantes Q4 e Q2, respectivamente. A supressão de Eag1 aumentou o perfil apoptótico (Q4 + Q2) provocado por temozolomida (Figura 10 H). O bloqueio farmacológico de Eag1 por astemizol provocou aumento de cerca de quatro vezes na apoptose de células de glioma causada por temozolomida, ou seja, de 17% a 82% (Figuras 10 B versus 10 D e 10 H; $p < 0,05$). O silenciamento Eag1 por pKv10.1-3 também aumentou a taxa de apoptose pela TMZ de 17% para 63% (Figuras 10 B versus 10 G e 10 H; $p < 0,05$).

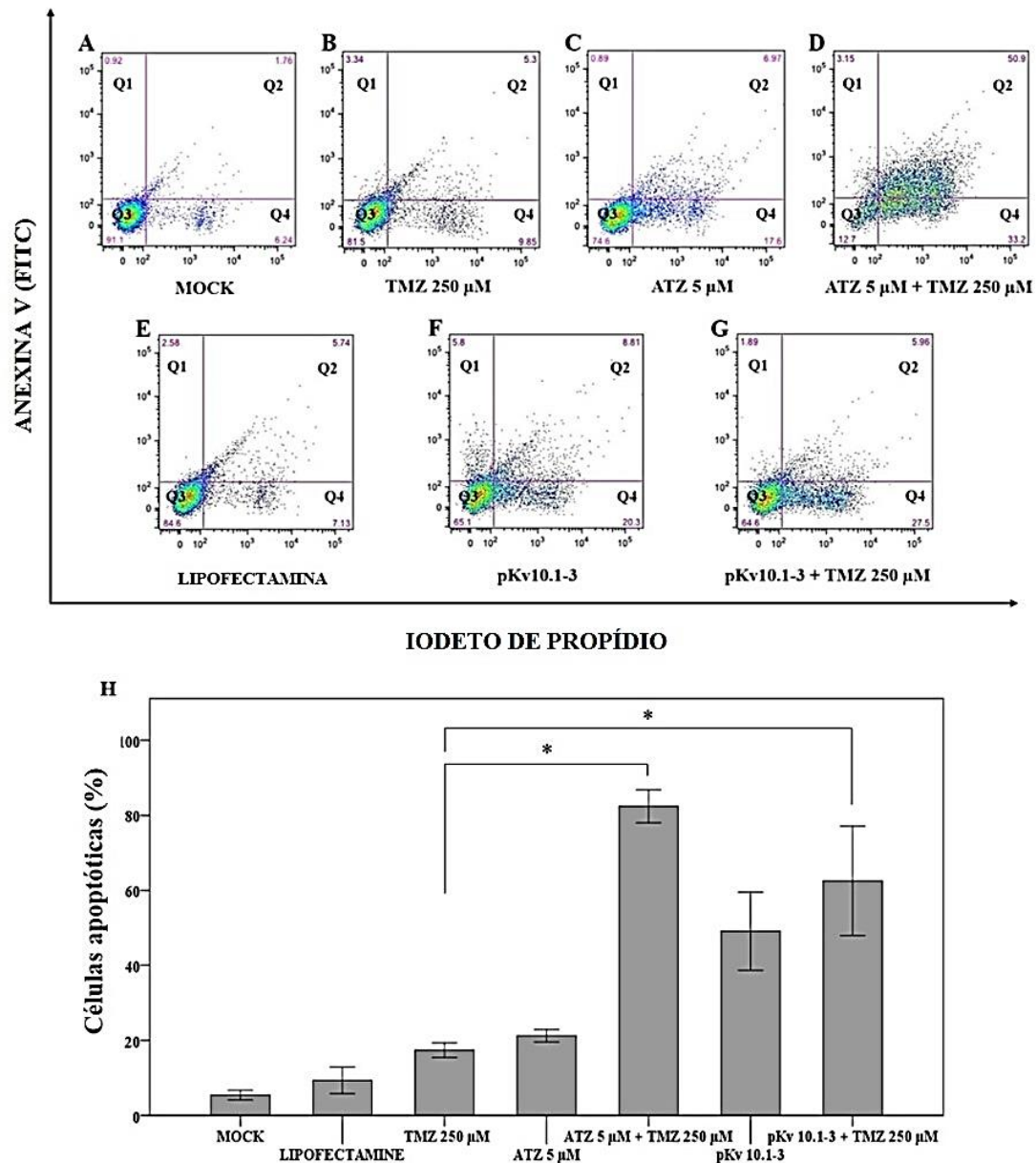


Figura 10. Determinação de apoptose em células da linhagem U-87 MG de glioblastoma. Os grupos experimentais foram analisados por citometria de fluxo, com marcações por Anexina V / iodeto de propídio (PI), após supressão de Eag1 por astemizol ou pKv10.1-3 em células expostas à TMZ. Gráficos representativos mostrando a distribuição das células marcadas por anexina V e por PI (A-G). O eixo X indica a fluorescência de PI detectado em 617 nm e o eixo Y indica a fluorescência da anexina V-FITC detectada a 488 nm. Os quadrantes (Q3) indicam as células viáveis, enquanto quadrantes (Q1) indicam células necróticas. Os quadrantes (Q2) indicam células em apoptose tardia, já os quadrantes (Q4) indicam células em apoptose precoce. Gráfico comparativo com a média dos valores de apoptose precoce e tardia em células U-87 MG (H). Os resultados dos experimentos foram expressos como porcentagem do número total de células. Os experimentos foram realizados em triplicatas, em três ensaios independentes (n=3) expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). * $p < 0,05$ (ANOVA oneway seguido do teste de Tukey).

4.6 Expressão de Eag1 em células de glioma tratadas com TMZ e efeitos da transfecção com pKv10.1-3

1 Eletroforese em gel de agarose

A integridade de cada amostra de RNA extraído foi satisfatória. Não houve presença de rastro de degradação na eletroforese, sendo possível visualizar as bandas de RNA ribossomal 18S e 28S (Figura 11).

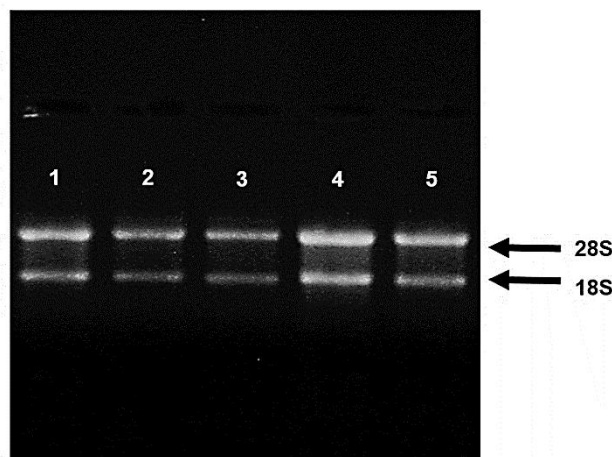


Figura 11. Análise de RNA total por eletroforese em gel de agarose. As setas indicam as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S. Os números nas canaletas referem-se aos seguintes tratamentos: (1) Mock, (2) pScramble, (3) pKv10.1-3, (4) TMZ 250 μ M e (5) pKv10.1-3 + TMZ 250 μ M.

2 Quantificação do conteúdo de RNAm de Eag1 por RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR revelou o conteúdo relativo de RNAm de Eag1 em células de gliomas tratadas com temozolomida. Verificou-se que TMZ 250 μ M causa diminuição de 0,78 vezes no conteúdo relativo de Eag1 após 72h de tratamento (Figura 12 A). O vetor pKv10.1-3 (0,2 μ g) também reduziu o conteúdo de Eag1. As células transfectadas apresentaram diminuição de 0,57 vezes no teor de RNAm de Eag1 em comparação com o grupo controle negativo pScramble (0,2 μ g), conforme Figura 12 B ($p < 0,05$). Finalmente, examinaram-se os efeitos da TMZ em células pré-transfectadas com pKv10.1-3. O vetor reduziu, significativamente, o conteúdo de RNAm do alvo, de 0,78 vezes (TMZ 250 μ M) para 0,31 vezes (pKv10.1-3 + TMZ 250 μ M), no período de 72h, como mostra a Figura 12 C; $p < 0,05$).

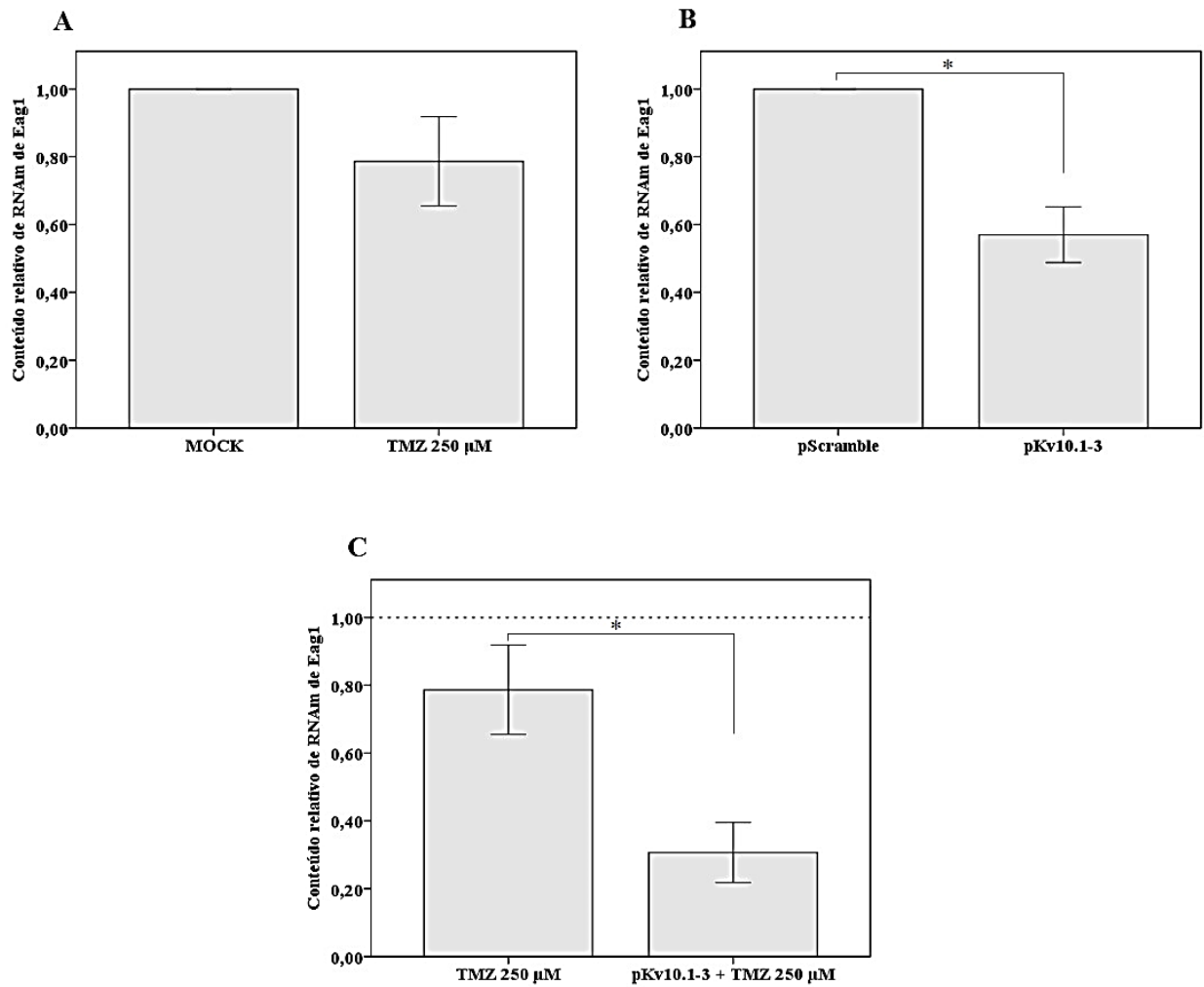


Figura 12. Redução do conteúdo relativo do RNAm de Eag1 em células U-87 MG tratadas por TMZ, pKv10.1-3, ou ambos, durante 72 horas. O nível de RNAm de Eag1 em células de glioma tratadas por TMZ 250 μ M está representado em (A). Efeitos de pKv10.1-3 sobre RNAm de Eag1 em comparação com o controle negativo pScramble (sequência não homóloga) estão descritos em (B). Associação de pKv10.1-3 com temozolomida, mostrando diminuição significativa no conteúdo de RNAm de Eag1 apresenta-se em (C). Os dados foram normalizados pelo gene controle endógeno PAPOLA. Os resultados foram determinados por RT-qPCR, em triplicata, em três ensaios independentes ($n=3$), sendo expressos pelo método da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Valores estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). * $p<0,05$ (ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey).

3 Imunocitoquímica para Eag1

A expressão da proteína Eag1 em células U-87 MG foi detectada por imunocitoquímica (Figura 13). As lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência. A sobreposição das imagens mostra a junção de ambas colorações, sejam do corante Hoechst (azul) e da imunodeteção de Eag1 (fluorescência verde). Esse resultado de imunofluorescência mostrou que Eag1 é altamente expresso nas células de glioblastoma humano da linhagem U-87 MG. As células transfectadas com pKv10.1-3, em tratamento isolado ou associados à TMZ, apresentaram menor densidade celular, com menor conteúdo da proteína Eag1.

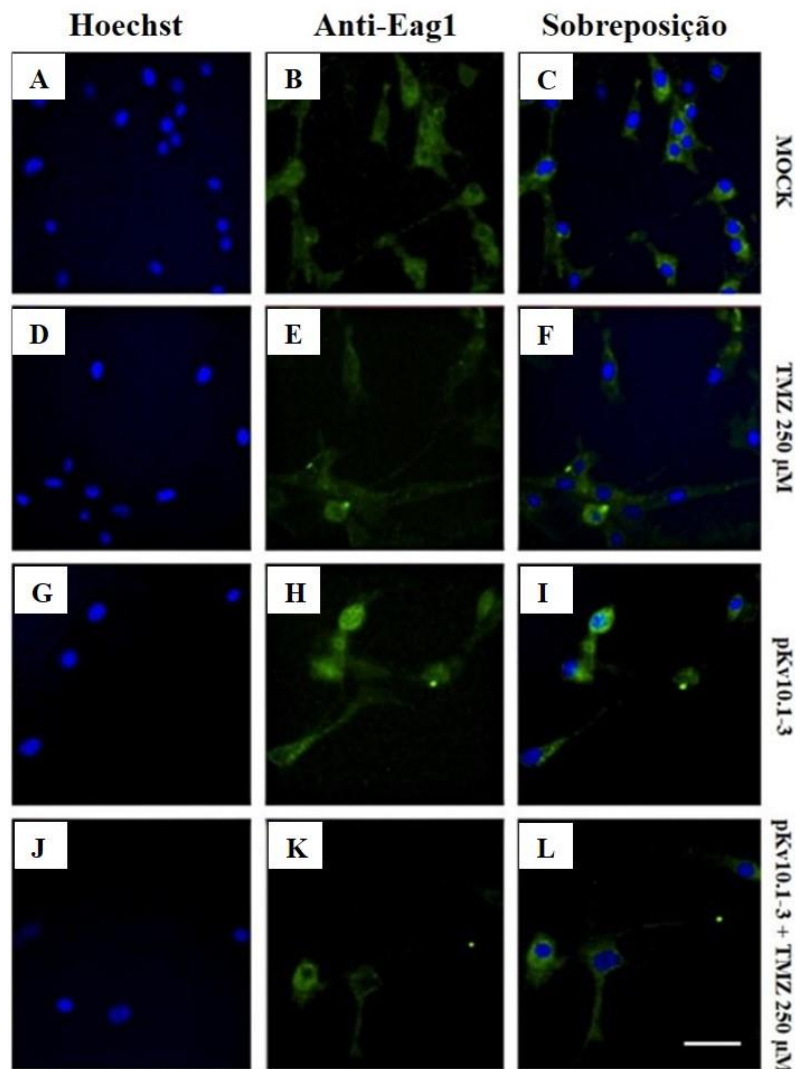


Figura 13. Imunocitoquímica para Eag1 em células da linhagem de glioma humano U-87 MG. Imagens representativas, mostrando a redução da expressão de Eag1 nos grupos tratados com TMZ, pKv10.1-3 ou associações. Mock (A-C), após tratamento com TMZ 250 µM (D-F), células após transfecção via pKv10.1-3 (G-I), e células pré-transfectadas com pKv10.1-3 e tratadas com TMZ 250 µM (J-L). As imagens foram adquiridas por microscopia de fluorescência. Barra de escala = 20 µm.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos da interferência de RNA sobre Eag1 em células de glioma U-87 MG expostas à temozolomida.

Glioblastoma multiforme (glioma de grau IV) é o tipo de tumor cerebral primário mais prevalente e agressivo. Apesar do progresso no desenvolvimento de técnicas cirúrgicas, da radioterapia e quimioterapia, o tratamento de gliomas malignos é extremamente difícil e a sobrevida dos pacientes tratados estende-se por apenas alguns meses (6,7). O tratamento quimioterápico padrão emprega a TMZ. No entanto, muitos pacientes com GBM não respondem a esse agente alquilante ou o tumor adquire resistência. Um mecanismo comum de resistência à TMZ surge por aumento da expressão da enzima de reparação do DNA O⁶ metiltransferase-DNA-metilguanina (MGMT) (71,72). A descoberta de novos alvos terapêuticos para o tratamento do glioma constitui demanda urgente da área de oncologia.

Os canais iônicos desempenham papel fundamental na tumorigênese (22). Estudos revelam que o fluxo de íons na célula, por meio dos canais iônicos, influencia o ciclo celular, o crescimento e a própria apoptose (73). Assim, havendo atividade desregulada ou elevada expressão de canais iônicos, pode ocorrer descontrole da divisão celular, uma característica clássica do câncer (74). Dentre os canais iônicos já descritos, destaca-se o canal de K⁺ Eag1 como regulador do crescimento celular, do perfil neoplásico e também da malignidade tumoral (32,36). Diversos tipos de tumores exibem hiperexpressão de Eag1, incluindo células de câncer de mama (75), tumores da cabeça e pescoço (76), câncer de cólon (77,78), esôfago (77), câncer cervical (79,80), leucemia (81), neuroblastoma (82), melanoma (83), câncer de estômago (77) e sarcomas (84). Gliomas também expressam Eag1, independentemente do seu grau de malignidade (39). Por meio da pesquisa apresentada nesta dissertação, confirmou-se que as células U-87 MG de glioblastoma em cultura apresentam elevada expressão de Eag1 e, após transfecção com o vetor de silenciamento para Eag1, o número de células foi reduzido nas placas. Os resultados corroboraram o papel citado de Eag1 na tumorigênese, destacando o gene como um alvo promissor para a terapia do câncer. No entanto, como os canais de potássio desempenham propriedades eletrofisiológicas, a inibição da atividade do canal pode causar efeitos adversos. Essa preocupação pode ser avaliada em estudo anterior, realizado em camundongos nocautes para Eag1 (85). Os animais não apresentaram alterações na embriogênese,

desenvolvimento cerebral e propriedades elétricas das células Purkinje do cerebelo. Foram observadas apenas mudanças comportamentais leves, incluindo hiperatividade em sessões de atividade espontânea e alterações na catalepsia induzida por haloperidol. Considerando que esses animais (destituídos de canais ativos) não mostraram alterações importantes da fisiologia, pode-se considerar que o Eag1 constitui alvo viável para o tratamento do câncer. Nesse sentido, estudos com anticorpos monoclonais, siRNAs, astemizol e imipramina confirmaram que a inibição de Eag1 controla o desenvolvimento do câncer (40,41,50,86). O calcitriol (vitamina D3) também foi capaz de suprimir a expressão de Eag1, causando a inibição do ciclo celular em células de tumor mamário (87).

Astemizol é antagonista do receptor histaminérgico H1 e, também, bloqueia o canal Eag1. Esse fármaco mostrou atividade contra diferentes tipos de câncer, incluindo o hepatocarcinoma, tumores de mama e células de câncer cervical (86,88,89). Os resultados da atual pesquisa corroboram esses achados, reforçando o papel do Eag1 no crescimento e proliferação celular. O astemizol causou diminuição dose-dependente na viabilidade de células de GBM mantidas durante 24, 48 e 72h após o tratamento. A utilização do astemizol para o tratamento de câncer, no entanto, é dificultada devido a seus efeitos colaterais cardiovasculares (44). O fármaco pode causar arritmia ventricular; trata-se de feito tóxico raro, porém potencialmente fatal (90,91).

No que se refere aos tumores cerebrais, o potencial terapêutico do astemizol é prejudicado por uma questão farmacocinética. Esse anti-histamínico de segunda geração não tem capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica (BHE), não alcançando o tumor cerebral. Curiosamente, essa propriedade farmacocinética é valiosa para os anti-histamínicos, pois evita sonolência ou sedação. Não é desejável, entretanto, para os fármacos que precisem alcançar tecidos cerebrais lesionados, como ocorre nos gliomas (92). A barreira tumoral hematoencefálica (BBTB, *blood-brain tumor barrier*) também representa um obstáculo para a quimioterapia do glioma. Na parte central do glioblastoma, essa barreira é rompida, mas, em grande parte da massa tumoral, permanece inalterada, bloqueando o acesso de medicamentos antitumorais (93).

Em estudo anterior, pequenos RNAs de interferência sintéticos (siRNAs) apresentaram a capacidade de silenciar a expressão de Eag1 em vários tipos de células tumorais (50). Além disso, siRNAs direcionados para Eag1 diminuíram o

RNA_m de Eag1 e o conteúdo da proteína, reduzindo o crescimento e proliferação de vários tipos celulares. Entre os quatro siRNAs testados, aquele denominado de Kv10.1-3 causou o maior efeito silenciador em Eag1. Esse siRNA tem como alvo a sequência nucleotídica 1793-1813 do RNA_m de Eag1 (NM_172362). Utilizou-se a mesma sequência alvo para o estudo proposto neste trabalho, a qual foi “engenheirada” para clonagem em vetor de expressão de grampios curtos de RNA, denominado de pKv10.1-3. Os resultados deste trabalho mostram que pKv10.1-3 reduz a viabilidade de células de glioma. Destaque-se que esse vetor de expressão também intensificou a injúria por IFN- γ em células de glioma (49).

O presente estudo mostrou, principalmente, que pKv10.1-3 sensibiliza células de glioma aos efeitos da TMZ, quimioterápico de escolha para esse tipo tumoral. O mesmo efeito foi observado em células tratadas com astemizol, um bloqueador de Eag1. Além de sensibilizarem as células à injúria com TMZ, esses tratamentos causaram, também, mudanças na morfologia celular, para um fenótipo apoptótico. Os resultados de citometria de fluxo confirmaram que houve apoptose celular. Finalmente, a análise por RT-qPCR mostrou que o vetor pKv10.1-3 potencializa a redução do RNA_m de Eag1 causada por TMZ para 0,78 vezes. Ou seja, os efeitos do vetor sobre a viabilidade celular estão correlacionados com a diminuição do conteúdo de Eag1.

O uso de RNAi para silenciamento de Eag1 foi previamente relatado em outras linhagens celulares de câncer. O emprego de vetor viral que expressa shRNAs para Eag1, reduziu o crescimento tumoral e angiogênese em osteossarcoma (94). Além disso, interferência de RNA para Eag1 sensibilizou células de câncer de ovário aos efeitos da cisplatina (95). Nenhum trabalho anterior, entretanto, examinou se o silenciamento do gene Eag1 sensibilizaria células de glioma ao quimioterápico TMZ.

O presente estudo revelou que a supressão de Eag1 potencializa o efeito do quimioterápico TMZ em células de glioma. Além de apontar um papel para Eag1 na injúria por TMZ, esse achado também projeta potencial estratégia para a terapêutica do glioblastoma multiforme.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- ✓ o canal de potássio Eag1 tem papel na viabilidade das células de glioma;
- ✓ a supressão de Eag1 por astemizol ou pKv10.1-3 potencializa os efeitos da temozolomida em células de glioma;
- ✓ o tratamento com pKv10.1-3, em células lesadas por TMZ, leva à morte celular por apoptose.

7. REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p: il. col., mapas.
2. National Cancer Institute. Cancer Trends Progress Report. Disponível em: <http://progressreport.cancer.gov>. Acesso em 25 de setembro de 2014.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J: CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro Oncol.* 16(Suppl 4): iv1–iv63, 2014.
4. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M: Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 494-503, 2006.
5. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN: Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.*15:1333, 2001.
6. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P: The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 114(2): 97–109, 2007.
7. Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International.* 5:64, 2014.
8. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK and DePinho RA: Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15: 1311-1333, 2001.
9. Ohgaki H: Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 25: 1-7, 2005.
10. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM and Kleihues P: Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64: 6892-6899, 2004.
11. Chaudhury AR: Pathology of Glioblastoma Multiforme. In: Ray SK. (Ed). *Glioblastoma: molecular mechanisms of pathogenesis and current therapeutic strategies.* Dordrecht; New York: Springer, 2010, páginas 77-84.
12. Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Disponível em:

- <http://anatpat.unicamp.br/taneugliomas.html>. Acesso em 16 de agosto de 2015.
13. Dziurzynski K, Blas-Boria D, Suki D, Cahill DP, Prabhu SS, Puduvalli V, Levine N: Butterfly glioblastomas: a retrospective review and qualitative assessment of outcomes. *J Neurooncol.* 109(3):555-63, 2012.
 14. Holland EC: Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(12): 6242–6244, 2000.
 15. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO: Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10(5), 459-466, 2009.
 16. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA: NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 33, 9045- 9051, 1994.
 17. Nagasawa DT, Chow F, Yew A, Won K, Cremer N, Yang I: Temozolomide and Other Potential Agents for the Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Neurosurg Clin N Am* 307-322, 2012.
 18. Newlands ES, Blackledge GR, Slack JÁ, Rustin GJ, Smith DB, Stuart NS, Quarterman CP, Hoffman R, Stevens MF, Brampton MH, et al: Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *Br J Cancer.* 65(2), 287-291, 1992.
 19. Tentori L & Graziani G: Recent Approaches to Improve the Antitumor Efficacy of Temozolomide. *Curr Med Chem.* 16(2):245-57, 2009.
 20. Hille B: Ionic channels of excitable membranes. Second edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1991. 607 p.
 21. Turner KL, Sontheimer H: Cl⁻ and K⁺ channels and their role in primary brain tumour biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1638: 20130095, 2014.
 22. Kunzelmann K: Ion channels and cancer. *J. Membr. Biol.* 159-73, 2005.
 23. Lang F, Hoffmann EK: Role of ion transport in control of apoptotic cell death. *Compr. Physiol.* 2037-2061, 2012.

24. Basrai D, Kraft R, Bollensdorff C, Liebmann L, Benndorf K, Patt S: BK channel blockers inhibit potassium-induced proliferation of human astrocytoma cells. *Neuro Report*, vol. 13, no. 4, pp. 403–407, 2002.
25. Ishiuchi S, Tsuzuki K, Yoshida Y, Yamada N, Hagimura N, Okado H, Miwa A, Kurihara H, Nakazato Y, Tamura M, Sasaki T, Ozawa S: Blockage of Ca²⁺-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nat Med*. 8(9):971-8, 2002.
26. Soroceanu L, Manning TJ Jr, Sontheimer H: Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl⁻ and K⁺ ion channel blockers. *J Neurosci*. 15;19(14):5942-54, 1999.
27. Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stühmer W, Pardo LA: Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 638: 20130094, 2014.
28. Takahashi A, Yamaguchi H, Miyamoto H: Change in K⁺ current of HeLa cells with progression of the cell cycle studied by patch-clamp technique. *Am J Physiol*. 265(2 Pt 1): C328-36, 1993.
29. Conti M: Targeting K⁺ channels for cancer therapy. *J Exp Ther Oncol*. 4(2):161-6, 2004.
30. Downie BR, Sánchez A, Knötgen H, Contreras-Jurado C, Gymnopoulos M, Weber C, Stühmer W, Pardo LA: Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *J Biol Chem*. 26;283(52):36234-40, 2008.
31. Hemmerlein B, Weseloh RM, Mello de Queiroz F, Knötgen H, Sánchez A, Rubio ME, Martin S, Schliephacke T, Jenke M, Heinz-Joachim-Radzun, Stühmer W, Pardo LA: Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular Cancer Mol Cancer*. 5;5:41, 2006.
32. Occhiodoro T, Bernheim L, Liu JH, Bijlenga P, Sinnreich M, Bader CR, Fischer-Lougheed J: Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Lett*. 28;434(1-2):177-82, 1998.
33. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X: International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*. 57(4):473-508, 2005.

34. Schwarz JR, Bauer CK: The ether-à-go-go-Related Gene K(+) Current: Functions of a Strange Inward Rectifier. *News Physiol Sci.* 14:135-142, 1999.
35. Asher V, Sowter H, Shaw R, Bali A, Khan R: Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. *World J Surg Oncol.* 8: 113, 2010.
36. Pardo LA, del Camino D, Sánchez A, Alves F, Brüggemann A, Beckh S, Stühmer W: Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J.* 18: 5540-7, 1999.
37. Wu X, Zhong D, Lin B, Zhai W, Ding Z, Wu J: p38 MAPK regulates the expression of ether à go-go potassium channel in human osteosarcoma cells. *Radiol Oncol.* 47(1):42-9, 2013.
38. Ding XW, Yan JJ, An P, Lü P, Luo HS: Aberrant expression of ether a go-go potassium channel in colorectal cancer patients and cell lines. *World J. Gastroenterol* 13: 1257-1261, 2007.
39. Patt S, Preussat K, Beetz C, Kraft R, Schrey M, Kalff R, Schönherr K, Heinemann SH: Expression of ether a go-go potassium channels in human gliomas. *Neurosci Lett.* 30;368(3):249-53, 2004.
40. Gavrilova-Ruch O, Schönherr K, Gessner G, Schönherr R, Klapperstück T, Wohlrab W, Heinemann SH: Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J Membr Biol* 15;188(2):137-49, 2002.
41. Gómez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Knötgen H, Sánchez A, Hettmann T, Ossipov D, Weseloh R, Contreras-Jurado C, Rothe M, Stühmer W, Pardo LA: Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Res.* 1;67(15):7343-9, 2007.
42. Gonzalez-Alegre P, Paulson HL: Technology insight: therapeutic RNA interference – how far from the neurology clinic? *Nat Clin Pract Neurol* 3(7):394-404, 2007.
43. Ouadid-Ahidouch H, Le Bourhis X, Roudbaraki M, Toillon RA, Delcourt P, Prevarskaya N: Changes in the K⁺ current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether.a-gogo K⁺ channel. *Receptors Channels* 7:345–56, 2001.
44. García-Quiroz J, Camacho J: Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug. *Anticancer Agents Med Chem* 11:307-14, 2011.

45. García-Quiroz J, García-Becerra R, Santos-Martínez N, Barrera D, Ordaz-Rosado D, Avila E, Halhali A, Villanueva O, Ibarra-Sánchez MJ, Esparza-López J, Gamboa-Domínguez A, Camacho J, Larrea F, Díaz L: In vivo dual targeting of the oncogenic Ether-à-go-go-1 potassium channel by calcitriol and astemizole results in enhanced antineoplastic effects in breast tumors. *BMC Cancer* 14:745, 2014.
46. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M: hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440:463–9, 2006.
47. Zhou BY, Ma W, Huang XY. Specific antibodies to the external vestibule of voltage-gated potassium channels block current. *J Gen Physiol* 111:555–63, 1998.
48. Pardo LA and Stühmer W: EAG1: an emerging oncological target. *Cancer Res* 68: 1611-1613, 2008.
49. Cunha LC, Del Bel E, Pardo L, Stühmer W and Titze-DE-Almeida R: RNA Interference with EAG1 Enhances Interferon Gamma Injury to Glioma Cells In Vitro. *Anticancer Res* 33:865-870, 2013.
50. Weber C, Mello de Queiroz F, Downie BR, Suckow A, Stühmer W and Pardo LA: Silencing the activity and proliferative properties of the human Eagl Potassium Channel by RNA Interference. *J Biol Chem* 281: 13030-7, 2006.
51. Burnett JC and Rossi JJ: RNA-based therapeutic: current progress and future prospects. *Chem Biol* 19: 60-71, 2012.
52. Wu J, Zhong D, Fu X, Liu Q, Kang L, Ding Z: Silencing of Ether à Go-Go 1 by shRNA Inhibits Osteosarcoma Growth and Cell Cycle Progression. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(4):5570-5581, 2014.
53. Pieraets S, Cox L, Gielen O, Cools J. Development of a siRNA and shRNA screening system based on a kinase fusion protein. *RNA*. 18(6):1296-1306, 2012.
54. Cullen BR: RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nat Immunol*. 3(7):597-9, 2002.
55. Kewal K. Jain MD, FRACS, FFPM: Role of RNAi in Cancer. *Applications of Biotechnology in Oncology 2014*, pp 549-572.
56. 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*. 19;391(6669):806-11, 1998.

57. Wang Z, Rao DD, Senzer N, Nemunaitis J: RNA Interference and Cancer Therapy. *Pharm Res.* 28(12):2983-95, 2011.
58. Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J: siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Ver.* 25;61(9):746-59, 2009.
59. Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ, Siolas D, Hu G, Paddison PJ, Schlabach MR, Sheth N, Bradshaw J, Burchard J, Kulkarni A, Cavet G, Sachidanandam R, McCombie WR, Cleary MA, Elledge SJ, Hannon GJ: Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat. Genet.* 37(11):1281-8, 2005.
60. Silva K, Schnierle BS: Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology J.* 21;7:248, 2010.
61. Giering JC, Grimm D, Storm TA, Kay MA: Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic. *Mol Ther.* 16(9):1630-6, 2008.
62. Castanotto D, Rossi JJ: The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature.* 22;457(7228):426-33, 2009.
63. Hajeri PB, Singh SK: siRNAs: their potential as therapeutic agents Part I. Designing of siRNAs. *Drug Discov Today* 14(17-18):851-8, 2009.
64. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development.* 17(24):3011-3016, 2003.
65. Sontheimer EJ, Carthew RW: Molecular biology. Argonaute journeys into the heart of RISC, *Science* 3;305(5689):1409-10, 2004.
66. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods.* 16;65(1-2):55-63, 1983.
67. Mareschi K, Novara M, Rustichelli D, Ferrero I, Guido D, Carbone E, et al: Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and each K⁺ channel type. *Exp Hematol* 34: 1563-1572, 2006.
68. Kwon MJ, Oh E, Lee S, Roh MR, Kim SE and Lee Y: Identification of novel reference genes using multiplatform expression data and their validation for quantitative gene expression analysis. *PLoS One* 4: e6162, 2009.

69. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 25(4):402-8, 2001.
70. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*. 114(2):97-109, 2007.
71. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, Plass C, Hegi M, Platten M, Reifenberger G: MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol*. 10(7):372-85, 2014.
72. Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M, González B, Melguizo C: Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. *PLoS One*. 10(10): e0140131, 2015.
73. Kondratskyi A, Kondratska K, Skryma R and Prevarskaya N: Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1848(10 Pt B): 2532-46, 2014.
74. Lang F, Föllmer M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, et al: Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol* 205: 147-157, 2005.
75. Roy J, Vantol B, Cowley EA, Blay J and Linsdell P: Pharmacological separation of hEAG and hERG K⁺ channel function in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Oncol Rep* 19: 1511-1516, 2008.
76. Menéndez ST, Villaronga MA, Rodrigo JP, Alvarez-Teijeiro S, García-Carracedo D, Urduñigo RG, et al: Frequent aberrant expression of the human ether a go-go (hEAG1) potassium channel in head and neck cancer: pathobiological mechanisms and clinical implications. *J Mol Med (Berl)* 90: 1173-1184, 2012.
77. Ding XW, Luo HS, Jin X, Yan JJ, Ai YW: Aberrant expression of Eag1 potassium channels in gastric cancer patients and cell lines. *Med. Oncol*. 24: 345-350, 2007.
78. 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*. 13: 824-31, 2007.
79. Ortiz CS, Montante-Montes D, Saqui-Salces M, Hinojosa LM, Gamboa-Dominguez A, Hernández-Gallegos E, Martínez-Benítez B, Del Rosario Solís-

- Pancoatl M, Garcia-Villa E, Ramírez A, Aguilar-Guadarrama R, Gariglio P, Pardo LA, Stühmer W, Camacho J: Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia. *Oncol. Rep.* 26: 1377-1383, 2011.
80. Farias LM, Ocaña DB, Díaz L, Larrea F, Avila-Chávez E, Cadena A, Hinojosa LM, Lara G, Villanueva LA, Vargas C, Hernández-Gallegos E, Camacho-Arroyo I, Dueñas-González A, Pérez-Cárdenas E, Pardo LA, Morales A, Taja-Chayeb L, Escamilla J, Sánchez-Peña C, Camacho J: Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res.* 1;64(19):6996-7001, 2004.
81. Agarwal JR, Griesinger F, Stühmer W, Pardo LA: The potassium channel Ether a go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia. *Mol. Cancer* 9: 18, 2010.
82. Meyer R, Heinemann SH. Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J Physiol.* 508(Pt 1):49–56, 1998.
83. Meyer R, Schönherr R, Gavrilova-Ruch O, Wohlrab W, Heinemann SH: Identification of ether a go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *J Membr Biol.* 171(2):107–15, 1999.
84. Mello de Queiroz F, Suarez-Kurtz G, Stühmer W, Pardo LA: Ether a go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Mol Cancer.* 5:42, 2006.
85. Ufartes R, Schneider T, Mortensen LS, de Juan Romero C, Hentrich K, Knoetgen H, et al: Behavioural and functional characterization of Kv10.1 (Eag1) knockout mice. *Hum Mol Genet* 22: 2247-62, 2013.
86. García-Quiroz J, Camacho J: Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug. *Anticancer Agents Med Chem* 11: 307-14, 2011.
87. García-Becerra R, Díaz L, Camacho J, Barrera D, Ordaz-Rosado D, Morales A, Ortiz CS, Avila E, Bargallo E, Arrecillas M, Halhali A, Larrea F: Calcitriol inhibits Ether-à go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Experimental Cell Res.* 1;316(3):433-42, 2010.
88. de Guadalupe Chávez-López M, Pérez-Carreón JI, Zuñiga-García V, Díaz-Chávez J, Herrera LA, Caro-Sánchez CH, et al: Astemizole-based anticancer therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), and Eag1 channels as potential early-stage markers of HCC. *Tumour Biol* 36: 6149-58, 2015.

89. de Guadalupe Chávez-López M, Hernández-Gallegos E, Vázquez-Sánchez AY, Gariglio P, Camacho J: Antiproliferative and proapoptotic effects of astemizole on cervical cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 24 :824-8, 2014.
90. de Abajo FJ and Rodríguez LA: Risk of ventricular arrhythmias associated with nonsedating antihistamine drugs. *Br J Clin Pharmacol* 47: 307-13, 1999.
91. Oppenheimer JJ, Casale TB: Next generation antihistamines: therapeutic rationale, accomplishments and advances. *Expert Opin Investig Drugs* 11: 807-17, 2002.
92. González MA, Estes KS: Pharmacokinetic overview of oral second-generation H1 antihistamines. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 36: 292-300, 1998.
93. van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, Wesseling P, Wurdinger T, de Vries HE: Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat* 19: 1-12, 2015.
94. Wu J, Wu X, Zhong D, Zhai W, Ding Z, Zhou Y: Short Hairpin RNA (shRNA) Ether à go-go 1 (Eag1) inhibition of human osteosarcoma angiogenesis via VEGF/PI3K/AKT signaling. *Int J Mol Sci* 13: 12573-83, 2012.
95. Hui C, Lan Z, Yue-Li L, Li-Lin H, Li-Lin H: Knockdown of Eag1 Expression by RNA Interference Increases Chemosensitivity to Cisplatin in Ovarian Cancer Cells. *Reprod Sci pii: 1933719115590665*, 2015.

APÊNDICE A – ENSAIOS DE MTT: GRUPOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

1. Curva dose-resposta dos efeitos da temozolomida (TMZ)

Foram utilizadas três diferentes concentrações de TMZ. Os ensaios foram conduzidos nos tempos de 24, 48 e 72 horas e divididos em quatro grupos de tratamentos, conforme descrito a seguir.

Grupo	Tratamento
I	Mock (células não tratadas com TMZ)
II	TMZ 125 μ M
III	TMZ 250 μ M
IV	TMZ 500 μ M

2. Bloqueio farmacológico do Eag1 com astemizol (ATZ)

Para avaliar a participação do canal de potássio Eag1 sob a viabilidade celular, as células foram tratadas com o bloqueador farmacológico astemizol. Os ensaios foram conduzidos nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Foram utilizados quatro grupos experimentais, conforme descrito abaixo.

Grupo	Tratamento
I	Mock (células não tratadas com ATZ)
II	ATZ 2,5 μ M
III	ATZ 5 μ M
IV	ATZ 10 μ M

3. Silenciamento gênico de Eag1 via interferência de RNA

A transfecção foi realizada conforme descrito em material e métodos, tópico 3.3. Usou-se o vetor de expressão pKv10.1-3 (0,2 μ g), avaliando-se a viabilidade por MTT em três tempos após transfecção (24, 48 e 72 horas). Os grupos experimentais foram divididos em três tratamentos, conforme tabela abaixo.

Grupo	Tratamento
I	Mock (células não transfectadas)
II	Controle lipofectamina
III	pKv10.1-3 (0,2 µg)

4. Efeitos do bloqueio farmacológico de Eag1 com astemizol associado à TMZ e do silenciamento gênico de Eag1 após injúria com TMZ

Com base nos resultados anteriores de curva dose-resposta e curva temporal, decidiu-se estabelecer o período de 72 horas para os experimentos de viabilidade celular dos grupos experimentais descritos na tabela abaixo.

Grupo	Tratamentos
I	Mock (células sem tratamento)
II	TMZ 250 µM
III	ATZ 5 µM
IV	ATZ 5 µM + TMZ 250 µM
V	Controle lipofectamina
VI	pKv10.1-3 (0,2 µg)
VII	pKv10.1-3 + TMZ 250 µM

APÊNDICE B – CAPÍTULO DE *E-BOOK*



BIOLOGIA
MOLECULAR
Fundamentos & técnicas básicas

RICARDO TITZE-DE-ALMEIDA

© 2014, Ricardo Títze-de-Almeida

Todos os direitos reservados e protegidos pela Lei nº 9.610, de 19/02/1998. Nenhuma parte deste eBook, sem autorização prévia por escrito do autor, poderá ser reproduzida ou transmitida sejam quais forem os meios empregados: eletrônicos, mecânicos, fotográficos, gravação ou quaisquer outros.

Editoração Eletrônica e versão eBook: Nextmídia Soluções Interativas.

ISBN 978-85-917405-0-5

O autor não assume qualquer responsabilidade por eventuais danos ou perdas a pessoas ou bens, originados do uso desta publicação.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

761.7b
Títze-de-Almeida, Ricardo
Biologia molecular : fundamentos e técnicas básicas [livro eletrônico] / Ricardo Títze-de-Almeida. — Brasília : 2014.
2.454 f. : ePub.
Bibliografia.
ISBN 978-85-917405-0-5
1. Biologia Molecular. 2. Ciência da vida.
I. Títze, Ricardo.
CDB-500.570

Índices para catálogo sistemático:

1. Ciência. 2. Ciência da vida: biologia. 500.570

SEÇÃO I

AS CÉLULAS E O SEU MATERIAL GENÉTICO

Ao longo do nosso eBook de Biologia molecular, vamos conhecer como as células manipulam a sua informação genética para a manutenção da vida e para a divisão celular. Onde se localizam os genes, e como é feita a leitura do código genético para a síntese das proteínas do organismo, são alguns tópicos que iremos abordar em capítulos posteriores. Neste momento vamos visitar uma célula do corpo humano! Entender como se organizam os compartimentos celulares, as funções de algumas organelas, e como a informação genética transita neste ambiente curioso. Trata-se de uma base necessária para entendermos, logo mais à frente, onde ocorrem diversas etapas da biologia molecular dos genes, como a duplicação do DNA, a síntese do RNA mensageiro e a formação das proteínas celulares.

A seção I do nosso eBook é composta dos seguintes capítulos:

Capítulo 1 - As células e seu material genético

Capítulo 2 - Cultivo celular

Capítulo 3 - Viabilidade celular

Nos capítulos anteriores, aprendemos sobre a importância das organelas e proteínas presentes nas células, e como elas oferecem suporte para as funções celulares. Além disso, vimos como cultivar e manter as células fora do organismo vivo. O cultivo de células é uma metodologia importante para vários estudos como, por exemplo, análise fenotípica de células tumorais, avaliações pré-clínicas de efeitos de fármacos e toxinas, entre outros. Neste sentido, muitos ensaios biológicos requerem um método para se medir a viabilidade de células animais cultivadas em laboratório (cultivo *in vitro*). O atual capítulo irá tratar de um desses métodos, que tem por base a colorimetria e utiliza o reagente brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-dimetiltetrazólio (MTT). Este método, desenvolvido por Tim Mossman em 1983, é frequentemente usado em áreas da toxicologia e farmacologia para avaliar a ação de compostos químicos sobre a viabilidade celular.

I. PRINCÍPIOS DO MÉTODO DE MTT

O ensaio de MTT baseia-se na conversão do sal de tetrazólio em um corante púrpura denominado formazan (Fig. 3.1). A reação de conversão deste sal ocorre da seguinte forma: a enzima **succinato-desidrogenase**, presente no interior das mitocôndrias, atua sobre o sal de tetrazólio (de cor amarela e solúvel em água) gerando um produto final de cor púrpura/azul escuro chamado formazan (insolúvel em água). O formazan assim formado se acumula no citoplasma das células viáveis.

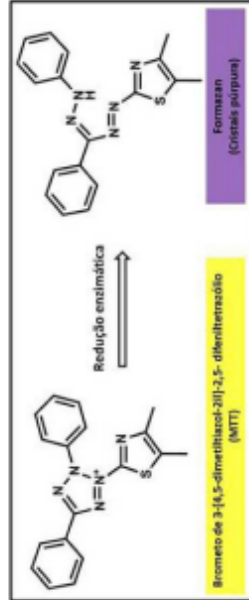


Figura 3.1 - Reação de redução do MTT pelo succinato-desidrogenase. A figura ilustra a conversão do MTT em um produto de coloração púrpura denominado de formazan, reação química que indica a viabilidade celular.

II. COMO O MÉTODO DIFERENCIA AS CÉLULAS VIVAS DAS MORTAS?

A conversão do sal de tetrazólio em formazan descrita na Figura 3.1 ocorre apenas em células vivas. Assim, a quantidade de pigmentos púrpura produzidos é proporcional ao número de células viáveis. Para quantificar a intensidade da coloração púrpura, é necessário dissolver os cristais com um solvente chamado DMSO (dimetil sulfoxido). Em seguida, os resultados são lidos em um equipamento denominado espectrofotômetro, na forma de absorbância. Ou seja, maiores valores de absorbância indicam maior viabilidade celular, como pode ser visualizado no ensaio de MTT exemplificado na placa abaixo (Fig. 3.2).

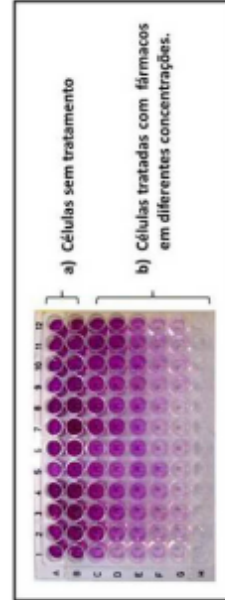


Figura 3.2 - Exemplo de um experimento de MTT utilizado para avaliar efeitos de fármacos sobre a viabilidade de células tumorais. a) Células sem tratamento (linhas A e B); b) Células tratadas com concentrações crescentes de um fármaco que reduz a viabilidade celular (linhas C a G). Observe que à medida que a concentração do fármaco aumenta, a viabilidade celular diminui proporcionalmente.

LEMBRE-SE: O sal de tetrazólio é clivado na mitocôndria ativa, então a reação ocorre somente em células vivas.

III. DESCRIÇÃO DO ENSAIO DE MTT

O ensaio de MTT requer quatro passos essenciais, conforme descrito na **Fig. 3.3**. Primeiro, as células são cultivadas em placas de 96 poços e então submetidas ao tratamento com o fármaco que se deseja estudar (**Fig. 3.3a**). Em seguida, o meio de cultivo celular é substituído por outro meio contendo o MTT (**Fig. 3.3b**). O MTT será metabolizado apenas pelas células viáveis, conforme citamos. Para que esta reação ocorra, é necessário incubar as células em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 3 horas. Após este período de incubação, o meio contendo o MTT é removido cuidadosamente, sendo adicionado DMSO para dissolução dos cristais de formazan presentes no citoplasma da célula. (**Fig. 3.3c**). Finalmente, realiza-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (**Fig. 3.3d**).

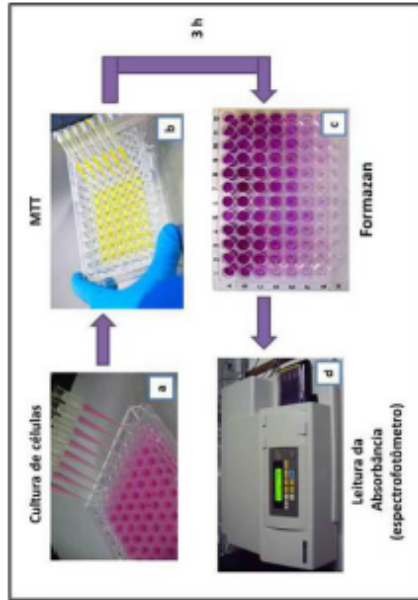


Figura 3.3 – Etapas realizadas no ensaio de MTT. Os quatro principais passos do ensaio de MTT são: a) cultura de células em placas de cultivo de 96 poços; b) adição do composto de MTT para ocorrer a reação (incubação da placa na estufa a 37°C e 5% de CO₂ pelo período de 3 horas); c) produção de formazan acumulado no citoplasma celular presente nas células viáveis; d) leitura em um espectrofotômetro.

VANTAGENS DO MÉTODO DE MTT

- Economia nos custos em reagentes e equipamentos.
- Redução do trabalho através da eliminação dos passos de processamento da amostra.
- Adequada repetibilidade entre ensaios.
- Adequada sensibilidade nos resultados dos experimentos.

...

ANEXO A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP 43.1)



Procedimentos para manutenção de células – Plaqueamento Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica	POP 43.1
---	-------------

MATERIAIS

- Meio de cultura (específico para cada tipo celular)
- DPBS
- Tripsina/EDTA 0,25%
- Álcool 70%
- Tubo Falcon de 15 mL
- Garrafas para cultivo celular
- Eppendorfs de 0,8 ml e 1,5 mL
- Luvas
- Pipetas
- Ponteiras para P200 e P1000
- Câmara de Neubauer

PROCEDIMENTOS

1. Desinfecção geral

- Usar álcool 70% para limpar o fluxo laminar, plásticos, vidrarias, luvas, etc.

2. Lavagem das células

- Descartar todo o meio de cultura velho da garrafa
- Adicionar 5,0 mL de DPBS (garrafa de 75cm²) ou 1,0 mL (garrafa de 25cm²). Agitar suavemente.
- Descartar o DPBS.

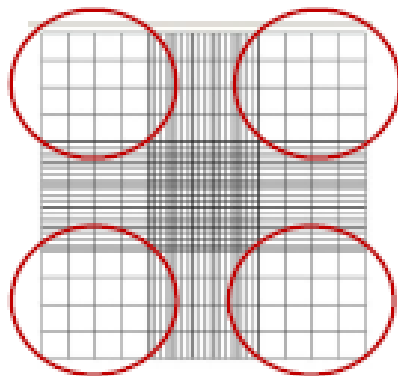
3. Tripsinização

- Adicionar 1,0 mL de Tripsina (75cm²) ou 0,5 mL (25cm²) rente à parede da garrafa onde as células estão aderidas.
- Aguardar 3 minutos.
- Observar no microscópio se as células se soltaram.
- Adicionar 4,0 mL de DMEM (75cm²) ou 1,0 mL (25cm²). Agitar suavemente.

- Transferir todo o conteúdo da garrafa para um tubo Falcon de 15 mL.
- Centrifugar por 3 minutos a 1200 rpm
- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 1,0 mL de DPBS e homogeneizar 30 vezes.

4. Contagem das células

- Transferir 30 μL das células do tubo Falcon para um eppendorf de 0,6 mL e adicionar 90 μL de DPBS
- Preencher a Câmara de Neubauer com 10 μL e proceder a contagem nos quatro quadrantes.



$$\text{n}^{\circ} \text{ de células/mL} = \text{n}^{\circ} \text{ de células} \times 10^4$$

- O resultado indica a quantidade de células em 1,0 mL.

5. Plaqueamento

- Em uma garrafa nova, adicionar 15,0 mL (75cm^2) ou 5,0 mL (25cm^2) de meio de cultura.
- Transferir 50 – 150 μL de células para a garrafa nova. A quantidade de células vai depender da concentração exigida para os procedimentos futuros.
- Levar a garrafa à estufa (37°C e 5% de CO_2).

6. Estocagem do pellet

- Transferir do tubo Falcon para um eppendorf de 1,5 mL o volume necessário para a concentração desejada de células
- Centrifugar por 3 minutos a 1200 rpm
- Descartar o sobrenadante.
- Repetir a centrifugação se necessário.
- Levar o pellet para congelamento no freezer -20°C .

Comentários:

Concentração celular:

$\times 10^4$ para passagem (garrafa grande)

$\times 10^4$ para passagem (garrafa pequena)

2×10^6 para extração de RNA (Kit RNeasy)

10^3 a 10^7 para extração de miRNA (Kit Mirvana)

ANEXO B – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER

45º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

45º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

INNOVATION: NEW DRUG DEVELOPMENT

CERTIFICADO

We certify that the work **SILENCING EAG1 ENHANCES TEMOZOLOMIDE EFFECTS ON GLIOBLASTOMA CELLS IN CULTURE**, authorship of Sales TT, Resende FFB, Rocha WS, Del Bel E, Pardo L, Stühmer W, Titze-de-Almeida R was presented as poster at the 45th Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics held in Ribeirão Preto, SP, from October 28- 31, 2013.

Mauro M. Teixeira
Mauro M. Teixeira
 Presidente SBFTE

Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental
 SBFTE

ANEXO C – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER

Workshop sobre estudos neurológicos e células da glia



DAAD/CAPES · University of Brasília, Brazil

**Differentiation and regeneration potential of glial cells
in acute and chronic Central Nervous System pathologies**

Poster Award

given to

Thais Torquato-Sales

Technology for Gene Therapy Lab, FAV, University of Brasília, UnB, Brasília, DF, Brazil

for her outstanding presentation

**Role of the Eag1 potassium channel in the injury caused
by temozolomide on glioblastoma cells**

Brasília, Nov 28, 2014

Elaine del Bel

Elaine del Bel
Universidade de São Paulo
Ribeirão Preto, Brazil



Frank Kirchhoff

Frank Kirchhoff
University of Saarland
Homburg, Germany



Ricardo Titze de Almeida

Ricardo Titze de Almeida
Universidade de Brasília
Brasília, Brazil

