



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**siRNAs SINTÉTICOS DIRECIONADOS À NO SINTASE NEURONAL:
EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA E VIABILIDADE
CELULAR DO GLIOMA**

FERNANDO FRANCISCO BORGES RESENDE

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
2011**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**siRNAs SINTÉTICOS DIRECIONADOS À NO SINTASE NEURONAL:
EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA E VIABILIDADE
CELULAR DO GLIOMA**

FERNANDO FRANCISCO BORGES RESENDE

ORIENTADOR: RICARDO TITZE DE ALMEIDA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 045 / 2011

**BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2011**

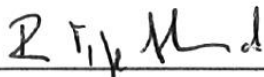
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**siRNAs SINTÉTICOS DIRECIONADOS À NO SINTASE NEURONAL:
EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA E VIABILIDADE
CELULAR DO GLIOMA**

FERNANDO FRANCISCO BORGES RESENDE

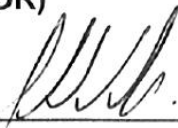
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL,
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:



Ricardo Titze de Almeida

Professor doutor da Universidade de Brasília
(ORIENTADOR)



Ana Carolina Mortari

Professora doutora da Universidade de Brasília
(EXAMINADOR INTERNO)



Luciana Sonne

Professora doutora da Universidade de Brasília
(EXAMINADOR INTERNO)

BRASÍLIA/DF, 12 de dezembro de 2011.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

RESENDE, F.F.B. **siRNAs sintéticos direcionados à NO sintase neuronal: efeitos sobre a expressão gênica e viabilidade celular do glioma**, Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 84 p. Dissertação de Mestrado.

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Resende, Fernando Francisco Borges.

siRNAs sintéticos direcionados à NO sintase neuronal: efeitos sobre a expressão gênica e viabilidade celular do glioma / Fernando Francisco Borges Resende; orientação de Ricardo Titze de Almeida – Brasília, 2011. 84 p.:il.

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

1. RNAi 2. Glioma 3. nNOS 4. siRNA e 5. Terapia gênica. I.

FERNANDO, F. F. B. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo.

Aos meus pais, Fernando e Neiva, pela vida e pelo amor.

À minhas irmãs, sobrinhas e sobrinhos por fazerem parte de minha vida.

A Maíra pelo amor, carinho e por estar ao meu lado.

Ao professor Ricardo Titze, pela orientação, amizade e dedicação.

Aos amigos do laboratório: Ana Paula, Linus, Nádia (Ribeirão Preto), Cátia, Luciana, Ludmylla, Simoneide, Bruno, Juliana, Fátima e Ana Livia por me ajudarem em tudo que foi preciso.

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

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	PÁGINA
PREFÁCIO	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I	10
Introdução	10
Referencial Teórico	14
Objetivos	20
Referências	21
CAPÍTULO II	25
Título do artigo	25
Introdução	25
Material e Métodos	28
Resultados	36
Discussão	44
Conclusões	47
Referências	48
CAPÍTULO III	53
Considerações Finais	53
ANEXOS	54

PREFÁCIO

A pesquisa científica sobre o câncer tem identificado moléculas que participam do desenvolvimento tumoral e poderiam, assim, tornar-se alvos terapêuticos em potencial. Inclui-se aqui o óxido nítrico (NO) que, apesar de ser mensageiro celular atuante em diversos tecidos do organismo animal, tem sido pouco investigado no câncer. Trata-se de molécula gasosa liberada a partir da oxidação da L-arginina em L-citrulina, reação que é catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintases ou NOS. As enzimas NOS apresentam três isoformas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS). A nNOS, objeto do atual estudo, é responsável por grande parte do NO presente no sistema nervoso. Atualmente sabe-se que o NO tem papel importante na formação e no funcionamento do sistema nervoso, bem como na patogenia do crescimento tumoral. Participa, por exemplo, no incremento da vascularização de tumores intracranianos e no aumento do grau de malignidade desses. Nesse sentido, vários estudos mostram que fármacos inibidores das enzimas NOS (p.ex.: L-NAME) são capazes de atenuar os efeitos inflamatórios secundários sobre o tecido sadio ao redor da massa tumoral e também diminuir o crescimento das mesmas. Tais achados vinculam essas enzimas diretamente à patogenia do câncer, colocando-as como alvos terapêuticos potenciais. Estes fármacos, entretanto, provocam efeitos colaterais graves, o que inviabiliza seu uso terapêutico e estimula a busca por alternativas para diminuir a ação das enzimas NOS. Recentemente foram introduzidos conhecimentos e técnicas para silenciamento de genes de interesse em nível pós-transcricional, a chamada interferência de RNA ou RNAi. O presente trabalho voltou-se à obtenção de estruturas de RNA curtos em dupla fita (siRNAs) capazes de modificar a expressão de nNOS. Essas mesmas estruturas genéticas foram eficazes na diminuição da viabilidade celular, revelando o seu potencial uso na terapêutica do câncer.

RESUMO

O objetivo do atual estudo foi avaliar os efeitos do *small-interfering RNA* (siRNA) e28_hnNOS sobre a expressão gênica da enzima NO sintase neuronal (nNOS) e sobre a viabilidade celular de gliomas. O glioma apresenta alta ocorrência entre os tumores cerebrais e tem o pior prognóstico. Entre os vários mediadores da tumorigênese, situa-se o óxido nítrico (NO), formado pelas enzimas NO sintases. A isoforma nNOS é expressa em tumores cerebrais, e está associada ao seu grau de malignidade. No presente estudo foi desenvolvido o siRNA e28_hnNOS para interferência de RNA sobre sequência-alvo do RNAm de nNOS, codificada pelo exon 28. Células de glioma U-251MG, cultivadas em triplicatas, foram transfectadas com este siRNA de 21 nucleotídeos (37,5nM) estruturado em lipossomas catiônicos, para análise nos tempos de 4, 24 e 48 horas pós-transfecção, havendo o controle negativo scramble. O conteúdo de RNAm de nNOS foi quantificado por RT-qPCR e os resultados expressos pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. O siRNA e28_hnNOS alterou o conteúdo de nNOS, com expressão de 0,61 vezes em relação ao controle negativo scramble no tempo 24hs e, surpreendentemente, aumento de 1,4 vezes no tempo 48hs. O efeito do siRNA e28_hnNOS sobre a viabilidade celular foi determinado pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Células foram lesadas com neomicina (300 µg/ml) por 24 horas e transfectadas com o siRNA (37,5nM) por 4 horas, havendo grupo controle não lesado. O uso do siRNA e28_hnNOS combinado com a neomicina reduziu a viabilidade celular para 96,36%. Os resultados do presente estudo mostram que a interferência de RNA via siRNAs pode controlar a expressão gênica de nNOS em gliomas e revelam o potencial uso deste método, em associação com a neomicina, para obtenção de efeitos antiproliferativos.

Palavras-chave: RNAi, glioma, nNOS, siRNA, terapia gênica.

ABSTRACT

The aim of the present study was to test effects of the siRNA e28_hnNOS on neuronal nitric oxide synthase enzyme (nNOS) content and cell viability of glioma cells in culture. Glioma is an aggressive cerebral tumor that holds a very poor prognosis. Nitric oxide synthase enzymes and their respective product - nitric oxide (NO) have a role in cancer development and metastasis. In our study, we tested the siRNA e28_hnNOS, which targets to nNOS mRNA sequence coded by exon 28. For that, glioma cells U-251MG in culture were transfected with e28_hnNOS (37,5 nM) mixed with cationic liposomes. They were tested at the time-points 4, 24, and 48 hours. The negative control was the commercial scramble All-Stars™ (Qiagen™). The nNOS mRNA content was quantified by RT-qPCR and the results were expressed by the method $2^{-\Delta\Delta CT}$. The nNOS content was reduced to 0.61 fold to the scramble negative control value at 24 h. Surprisingly, we found a 1.4 fold increase at 48 h post-transfection. The siRNA effects on cell viability were determined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) assay. Cells were previously lesioned with neomycin (300 µg/ml) for 24 h and then treated with e28_hnNOS for 4 hour. Non-lesioned and scrambled control groups were included. The use of siRNA e28_hnNOS in combination with neomycin reduced the cell viability to 96.36%. In conclusion, our results show the ability of siRNAs to change the nNOS mRNA content in glioma cells in culture and reveal the potential use of RNA interference in combination with neomycin for antiproliferative effects.

Key-words: RNAi, nNOS, glioma, siRNA, gene therapy.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Tumores cerebrais geralmente têm prognóstico desfavorável, provocam várias sequelas e apresentam baixa expectativa de vida, seja em humanos (RUTHERFORD & WLODARCZYK, 2009) ou em animais (YACOUB et al., 2008).

Os diversos tipos de tumores cerebrais são organizados de acordo com a classificação proposta por Louis et al. (2007), conforme seu grau de malignidade, localização e tipo celular predominante.

1. Os gliomas

Gliomas estão entre os tumores primários mais comuns do cérebro em seres humanos e cães. São classificados com base em dois critérios histológicos, a semelhança das células tumorais em relação a células gliais normais e os relativos graus de malignidade. Os quatro tipos de glioma com maior incidência são os astrocitomas de grau I, II, III e IV, esse último também conhecido como glioblastoma (ARKO, 2010).

Astrocitomas são compostos de células tumorais que se assemelham a astrócitos, enquanto tumores oligodendrogliais contêm células neoplásicas que se assemelham a oligodendrócitos. A malignidade é classificada utilizando uma escala de quatro níveis progressivos: os graus I e II são atribuídos a tumores de baixo grau ou benignos, enquanto os graus III e IV referem-se a alto grau ou tumores malignos (CBTRUS, 2007; LOUIS et al., 2007).

Astrocitomas grau I são geralmente benignos e frequentemente curáveis com cirurgia de remoção. Astrocitomas grau II também demonstram crescimento lento e alto grau de diferenciação celular, mas usualmente se infiltram nos tecidos cerebrais adjacentes. A sobrevivência média após o diagnóstico cirúrgico é de seis a oito anos e corresponde ao tempo necessário para os tumores avançarem a um grau mais elevado de malignidade. Astrocitomas grau III, também conhecidos como astrocitomas anaplásicos (AA) são lesões infiltrativas em regiões focais com grau de anaplasia moderado e potencial proliferativo. O tempo médio de sobrevida varia de

dois a três anos e é determinado pelo tempo necessário à progressão tumoral (LOUIS et al., 2007). Astrocitomas grau IV, também conhecidos como glioblastomas multiformes ou glioblastomas (GBM) são o subtipo mais comum e o mais maligno. GBM tipicamente apresentam polimorfismo celular, atipia nuclear, atividade mitótica acelerada, neovascularização e áreas de necrose (ARKO, 2010).

A característica de invasão agressiva e infiltração difusa das células tumorais para o tecido cerebral circundante dificulta a remoção cirúrgica completa do tumor intracraniano, tornando a técnica complicada ou não recomendada. Nos últimos 30 anos, mudanças significativas no padrão de tratamento de gliomas malignos tem sido limitada, resumindo-se à associação de cirurgia com tratamentos quimioterápicos e técnicas de radioterapia, todas com baixa especificidade e alta incidência de efeitos colaterais (ARKO, 2010).

2. Prevalência dos tumores

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer causa 7,1 milhões de mortes anuais, o que significa 12,6% do total de óbitos, sendo que a incidência deverá aumentar de 10 milhões em 2000 para 15 milhões em 2020. Levantamentos indicam que 20 milhões de pessoas vivem com câncer atualmente e que esse número subirá para 30 milhões em 2020 (OPAS, 2003). Estudos recentes corroboram que o câncer é a principal causa de mortalidade em nível mundial, houve 7,4 milhões de mortes (13% do total dos casos de morte) somente no ano de 2004 (OMS, 2009).

Entre cães, a incidência de tumores intracranianos chega à ordem de 14.500 casos a cada 100.000, e o tipo mais comum é o astrocitoma (HEIDNER et al., 1991; STOICA, 2004). Já em humanos esta incidência chega a 86% entre os tumores primários, sendo os gliomas encontrados em 55% dos indivíduos acometidos (VICK, 1997).

3. Mediadores

A dinâmica do crescimento tumoral é composta por vários agentes que promovem a proliferação celular, a angiogênese e retardam a resposta imune inicial.

Grande parte desses agentes são genes e moléculas expressos pelas células aberrantes, garantindo as condições necessárias à tumorigênese (WÜRDINGER, 2009).

Em relação aos mensageiros celulares envolvidos na oncogênese, vários estudos mostram a participação do óxido nítrico (NO) no crescimento e proliferação tumoral. Segundo Fukumura et al., (1997), o NO age aumentando a microcirculação nos tecidos em questão, atuando em fatores como fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular, resposta leucocitária e angiogênese. Thomsen & Miles (1998) relataram que o NO participa na vasodilatação local facilitando a irrigação e o crescimento rápido dos tumores. Esse mensageiro caracteriza-se como uma molécula gasosa de propriedades neurotransmissoras e neuromoduladoras, produzida pela oxidação do aminoácido L-arginina, catalisada pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS), formando o radical livre NO, citrulina e produtos (GELLER & BILLIAR, 1998). Existem três isoformas de NOS encontradas em diferentes tipos celulares (DOYLE & SLATER, 1997). As enzimas NO sintase neuronal (nNOS) e NO sintase endotelial (eNOS) são comumente encontradas em neurônios e células endoteliais, respectivamente (DOYLE & SLATER, 1997). Já a NO sintase induzida (iNOS) está mais relacionada a induções de certas citocinas ou a diversos outros agentes, como lipopolissacarídeos microbianos, por exemplo (FEINSTEIN et al., 1994).

Quanto à participação da nNOS no câncer, sabe-se ainda que a expressão imunohistoquímica desta enzima ocorre em todos os tipos de gliomas, independentemente de seus graus de malignidade, sendo mais presente no centro dos tumores do que nas extremidades ou tecidos normais e, finalmente, a sua expressão está intimamente ligada à formação de edema peritumoral (BAKSHI et al., 1998).

Necmettin et al. (2008) correlacionaram a nNOS com o grau de malignidade tumoral demonstrando que a intensidade e a distribuição da expressão imunohistoquímica de nNOS em tumores de alto grau é significativamente maior do que em tipos mais benignos.

4. Terapia inovadora via interferência de RNA sobre nNOS

Já foi demonstrado experimentalmente que a administração de fármacos inibidores de NOS, como o L-NAME, reduz significativamente o crescimento tumoral em relação a animais não tratados (SWAROOP et al., 2000). Porém a inibição farmacológica não é específica e pode causar alterações adversas como o aumento da pressão arterial e elevação da resistência vascular periférica, entre outros.

Como alternativa aos efeitos colaterais da inibição em massa de NOS, recentes descobertas revelam a possibilidade de silenciar genes específicos em nível pós-transcricional, mediante interferência de RNA (RNAi).

A técnica de RNAi foi utilizada com sucesso para silenciar genes em células cancerígenas intracranianas e também em tumores de mama (ZHANG et al., 2004; WU et al., 2009), sendo considerada uma ferramenta promissora para a terapêutica do câncer. Esse mecanismo celular se desenvolve em duas etapas. Em um primeiro momento, ocorre a clivagem de um fragmento de RNA dupla fita (*double-stranded RNA* – *dsRNA*) em fragmentos que contêm entre 21 a 23 nucleotídeos por ação da nuclease conhecida como *Dicer*. Em uma segunda etapa, os pequenos fragmentos de *dsRNA*, conhecidos como *small interfering RNAs* ou *siRNAs*, associam-se à proteínas celulares formadoras de um complexo nomeado como *RNA-Induced Silencing Complex* ou *RISC*. Uma enzima presente no referido complexo proteico abre a dupla fita dos *siRNAs*, ficando acoplado apenas a fita antisense que tem o papel de guiar todo o complexo até o RNA mensageiro (RNAm) alvo, degradando-o (ALTON et al., 2007).

Dessa forma, seria altamente promissora a construção de uma estrutura genética para tratamento do glioma que fosse capaz de: 1- clivar o RNA mensageiro da nNOS; 2- diminuir a produção de NO sem alterar os outros tipos de óxido nítrico sintases; 3- provocar queda no crescimento tumoral e na inflamação ao seu redor e, 4- diminuir, finalmente, possíveis efeitos colaterais do tratamento convencional do câncer.

REFERENCIAL TEÓRICO

1) Óxido nítrico e tumorigênese do câncer

Estudos têm mostrado que todas as três isoformas de NOS podem estar envolvidas na etiologia do câncer. Atividade da NOS foi detectada nas células tumorais de diversas origens histogenéticas e tem sido associada com o grau do tumor, a taxa de proliferação e a expressão de importantes componentes de sinalização associado ao desenvolvimento do câncer, como o receptor de estrógeno, por exemplo (XU, 2002).

Quanto à angiogênese, o aumento da geração de NO em uma célula pode contribuir para o crescimento tumoral devido à superexpressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (AMBS, 1998).

Outro estudo mostra que a regulação de VEGF mediada por NO provoca neovascularização em tumores e que a angiogênese não só provoca o crescimento tumoral, mas também melhora sua capacidade de invasão e metástase (AMBS, 1998).

Além disso, o óxido nítrico pode aumentar os mecanismos de reparo de DNA do câncer oriundos da enzima p53, da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e da DNA-proteína quinase dependente (DNA-PK), favorecendo assim a sua propagação (XU, 2002).

O NO pode contribuir para a tumorigênese de várias formas. Sendo um radical livre, é uma molécula altamente reativa dentro dos sistemas biológicos, possuindo assim capacidade de interação com outros radicais livres, oxigênio molecular e metais pesados. Os efeitos biológicos do NO podem ser mediados pelos produtos de NO oriundos de diferentes metabólitos. Por exemplo, pode reagir rapidamente dentro da célula formando nitrito e nitrato, tióis S-nitroso ou peroxinitrato, e esses metabólitos podem desempenhar papel chave na mediação de muitos dos efeitos genotóxicos associados ao óxido nítrico. Esses efeitos incluem danos no DNA, o que pode ser iniciado por desaminação nitroativa, quebra da fita de DNA ou modificações na sequência propriamente dita (WINK, 1991).

Uma das consequências do dano ao DNA mediado por NO é o acúmulo de p53, que pode induzir a apoptose e parada do crescimento celular, com aumento na

atividade transcricional ou pós-transcricional (FORRESTER, 1996; AMBS, 1997). Por outro lado, curiosamente, tem sido demonstrado que o acúmulo de p53 reduz a expressão da iNOS por inibição do seu promotor (AMBS, 1997). Assim, um *feedback* negativo é formado entre a geração de NO e o acúmulo de p53, que podem constituir parte de um mecanismo fisiológico, que responde endogenamente produzindo danos ao DNA. Por outro lado, a inibição do crescimento, num primeiro momento, mediada por p53, pode ser útil para fornecer uma pressão de seleção sobre p53 mutante, comumente expressa nas células tumorais (XU, 2002).

Em estudo realizado com camundongos do tipo *nude* portadores de carcinoma humano, a transfecção com cDNA de iNOS, objetivando o incremento da expressão enzimática e conseqüentemente a concentração de NO, levou ao crescimento tumoral ao invés de redução, demonstrando que as enzimas de síntese de NO têm relação com o desenvolvimento câncer (JENKINS et al., 1995).

Estudos anteriores demonstram a correlação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), e conseqüentemente o óxido nítrico (NO), com o crescimento de tumores sólidos, seja ele de qualquer tipo ou localização (BAKSHI et al., 1998; FUKUMURA et al., 1997). Tal ligação parece ocorrer, outra vez, devido às propriedades de angiogênese, vasodilatação, perfusão sanguínea e permeabilidade vascular que o NO formado a partir da nNOS tem sobre os tumores (THOMSEN & MILES, 1998) o que ocasionaria um incremento no crescimento tumoral e na malignidade do mesmo (NECMETTIN et al., 2008).

2) Óxido nítrico – histórico e síntese celular

As primeiras descrições sobre o óxido nítrico (NO) foram iniciadas a partir de estudos sobre a vasodilatação induzida pela acetilcolina, que mostrou-se dependente integridade do endotélio. No dado momento observou-se então que esse efeito foi mediado pela liberação de uma molécula denominada fator de relaxamento dependente do endotélio, posteriormente denominada de NO (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Novos estudos mostraram a importância do NO quanto ao processo de relaxamento vascular (IGNARRO, 1987; PALMER et al., 1987; MONCADA et al., 1988). Além disso, vários trabalhos revelaram a relação entre o NO e a resposta imune do organismo. Atualmente sabe-se que o óxido

nítrico é o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui-se em molécula de regulação do sistema imune (HIBBS et al., 1987; MARLETTA et al., 1988). Finalmente, foi observado que o NO é produzido no sistema nervoso central, demonstrando que sua síntese é estimulada pelo neurotransmissor glutamato, agonista dos receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) (BREDT et al., 1989; KNOWLES et al., 1989; GARTHWAITE et al., 1989).

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

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

3) Enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)

As enzimas óxido nítrico sintases – NOS, como dito anteriormente, têm o papel de catalisar a reação na qual a L-arginina é oxidada em L-citrulina, liberando NO. Três isoformas das enzimas NOS foram descritas: NOS neuronal (nNOS ou NOS1), NOS endotelial (eNOS ou NOS3) e NOS induzida (iNOS ou NOS2). As duas primeiras são enzimas de expressão constitutiva e apresentam como característica a dependência de íons de cálcio e de calmodulina para sua ativação. Já a iNOS é produzida por células do sistema imunológico ou outras células ativadas por

lipolissacarídeos bacterianos ou citoquininas de origens diversas (DUSSE et al., 2003). A nNOS pode ser encontrada principalmente em neurônios, neutrófilos e astrócitos. Já a eNOS está localizada no endotélio vascular e nos astrócitos. Por fim, a iNOS está presente em células como macrófagos, hepatócitos e células da glia (KAVYA et al., 2006).

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

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

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

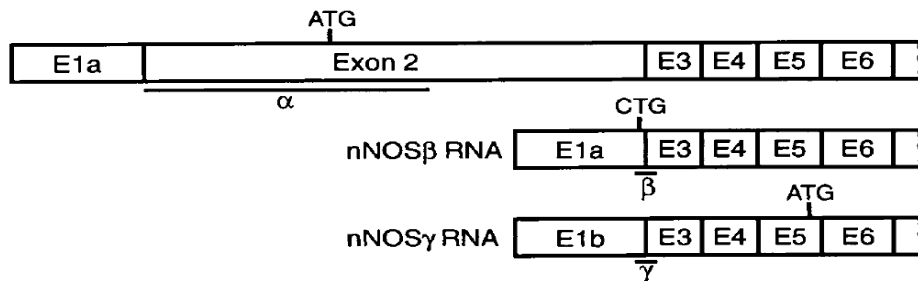


Figura 1: Variantes de *splicing* da enzima nNOS (nNOS α , nNOS β e nNOS γ), obtido de Eliasson et al., (1997).

4) Interferência de RNA (RNAi)

A metodologia apresentada como interferência de RNA ou RNAi já foi utilizada com sucesso para silenciar genes em células neuronais e também em tumores, sendo considerada ferramenta altamente promissora para a terapêutica de neoplasias intracranianas e doenças neurológicas degenerativas (WOOD et al., 2003; GONZALES-ALEGRE, 2007). O mecanismo de RNAi baseia-se em processo celular composto de duas etapas (Figura 2). Inicialmente o RNA em dupla-fita (double-stranded RNA - dsRNA) é clivado dentro da célula em fragmentos de 21 - 23 nucleotídeos pela enzima nuclease *Dicer*. Em seguida, os pequenos fragmentos de dsRNA conhecidos como *small interfering RNAs* (*siRNAs*) se associam a proteínas celulares formando um complexo chamado *RISC* (*RNA Induced Silencing Complex*). Uma enzima presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs e elimina uma das fitas (denominada *passenger*), permanecendo a fita *guide* (antisense), que irá guiar o complexo RISC até o RNAm alvo para posterior degradação (ALTON et al., 2007; TIEMAN & ROSSI, 2009).

Dessa forma, os siRNAs sintéticos tem a capacidade de mimetizar o processo celular em questão (Figura 2) e interferir de maneira específica na expressão gênica da enzima nNOS.

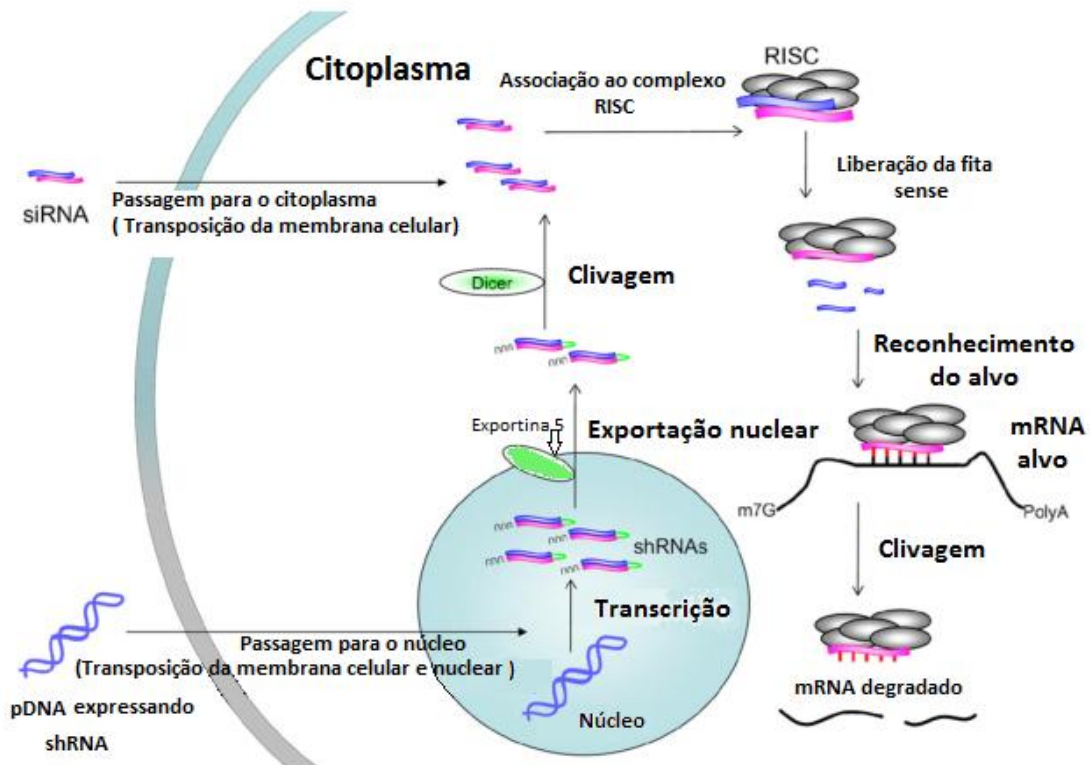


Figura 2. Esquema ilustrativo dos eventos de interferência de RNA (RNAi), adaptado de Takahashi et al., (2006). Os shRNAs são transcritos a partir do DNA genômico e exportados ao citoplasma da célula pela proteína exportina 5 (*Exportin5*). São processados pela enzima *Dicer* e incorporados ao sistema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

Em conclusão, seria relevante o desenvolvimento de uma terapia inovadora baseada em interferência de RNA sobre a enzima sintase do óxido nítrico (nNOS), visando controle do crescimento e diminuição do grau de malignidade de processos tumorais.

OBJETIVOS

GERAL

- Desenvolver estratégia para a terapêutica do glioma, baseada no controle da expressão gênica de nNOS via interferência de RNA.

ESPECÍFICOS

- Quantificar os efeitos de siRNAs direcionados à nNOS sobre o conteúdo de RNAm desta enzima em linhagem celular de glioma;
- Avaliar a eficácia de siRNAs sintéticos direcionados à nNOS, quanto à diminuição da viabilidade celular do glioma.

REFERÊNCIAS

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, n.357, p.593-615, 2001.

ALTON, E.; FERRARI, S.; GRIESENBACH, U. Progress and prospects: gene therapy clinical trials. **Gene Therapy**, n.14, p.1439-1447, 2007.

AMBS, S.; HUSSAIN, S.P.; PERWEZ, H.; HARRIS, C.C. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. **FASEB Journal**, n.11, p.443-448, 1997.

AMBS, S.; OGUNFUSIKA, M.O.; MERRIAM, W.G.; BENNETT, W.P.; BILLIAR, T.R.; HARRIS, C.C. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, n.95, p.8823-8828, 1998.

ARKO, L.; KATSYV, I.; PARK, G.E.; LUAN, W.P.L.; PARK, J.K. Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. **Pharmacology Therapy**, n.128, p.1-36, 2010.

BAKSHI, A.; NAG, T. C.; WADHWA, S. The expression of nitric oxide synthases in human brain tumours and peritumoral areas. **Journal of Neurological Sciences**, n.155, p.196-203, 1998.

BRETT, D. S. & SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhanced of cGMP levels in the cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.86, p.9030-9033, 1989.

CBTRUS. Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 2000-2004. Central Brain Tumor Registry of the United States; 2007.

DOMENICO, R. Pharmacology of Nitric Oxide: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Current Pharmaceutical Design**, n.14, p.1667-1676, 2004.

DOYLE, C.A.; SLATER, P. Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. **Neuroscience**, n.76, p.387-395, 1997.

DUSSE, L.P.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, n.4, p.343-350, 2003.

ELIASSON, M. J, L.; BLACKSHAW, S.; SCHELL, M. J.; SNYDER, S. H. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.94, p.3396-3401, 1997.

FEINSTEIN, D.L.; GALEA, E.; ROBERTS, S.; BERQUIST, H.; WANG, H.; REIS, D.J. Induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells. **Journal of Neurochemistry**, n.62, p.315-321, 1994.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, n.46, p.265-271, 2000.

FORRESTER, K.; AMBS, S.; LUPOLD, S.E. Nitric oxide induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase (NOS2) expression by wild type p53. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, n.93, p.2442-2447, 1996.

FUKUMURA, D.; YUAN, F.; ENDO, M.; JAIN, R.K. Role of the nitric oxide in tumor microcirculation. **American Journal of Pathology**, n.2, p.713-725, 1997.

GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal of Pharmacology**, n.172, p.413-416, 1989.

GELLER, D.A.; BILLIAR, T.R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer Metastasis Reviews**, n.17, p.7-23, 1998.

GONZALES-ALEGRE, P. Technology insight: therapeutic RNA interference – how far from the neurology clinic? **Nature Clinical Practice in Neurology**, n.3, p.394-404, 2007.

HEIDNER, G.L.; KORNEGAY, J.N.; PAGE, R. L.; DODGE, R. K.; THRALL, D.E. Analyses of Survival in a Retrospective Study of 86 Dogs With Brain Tumor. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.5, n.4, p.219-226, 1991.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: Role of L-arginine deiminase and amino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, n.235, p.473-476, 1987.

IGNARRO, L. J. Endothelium derivated relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation Research**, n.61, p.866-879, 1987.

JENKINS DC, CHARLES IG, THOMSEN LL, MOSS DW, HOLMES LS, BAYLIS SA, RHODES P, WESTMORE K. EMSON PC, MONCADA S. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, n.92, p.4392-4396, 1995.

KAVYA, R.; SALUJA, R.; SINGH, S.; DIKSHIT, M. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. **Nitric Oxide**, n.15, p.280-294, 2006.

KNOWLES, R. G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for simulation of the soluble guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, n.86, p.5159-5162, 1989.

LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; CAVENEE, W.K.; BURGER, P.C.; JOUVET, A. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. **Acta Neuropathology**, n.114, p.97–109, 2007.

MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, n.27, p.8706-8711, 1988.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochemical Pharmacology**, n.1, p.2495-2501, 1988.

NECMETTIN, T.; MUSTAFA, O. U.; CIHAN, I.; HAYDAR, D.; BUGE, O.; MUSTAFA, U.; ZIYA, A. Neuronal nitric oxide synthase expression in glial tumors: correlation with malignancy and tumor proliferation. **Neurological Research**, n.30, p.940-944, 2008.

Organização Mundial da Saúde (2009). Câncer, disponível no endereço: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>, acessado em 12/05/2010.

Organização Pan-Americana da Saúde. Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília, 2003.

PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S. & MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, n.333, p.664-666, 1987.

RUTHERFORD, G.W.; WLODARCZYK, C.B.S. Distant Sequelae of Traumatic Brain Injury: Premature Mortality and Intracranial Neoplasms. **Journal of Head Trauma Rehabilitation**, n.24, p.468-474, 2009.

STOICA, G.; KIM, H.T.; HALL, D.G.; COATES, J.R. Morphology, Immunohistochemistry and Genetic Alterations in Dog Astrocytomas. **Veterinary Pathology**, v.41, p, 10-19, 2004.

SWAROOP, G.R.; KELLY, P.A.; BELL, H.S. The effects of chronic nitric oxide synthase suppression on glioma pathophysiology. **British Journal of Neurosurgery**, n.14, p.543-548, 2000.

TAKAHASHI, Y.; YAMAOKA, K.; NISHIKAWA, M.; TAKAKURA Y. Moment analysis for kinetics of gene silencing by RNA interference. **Biotechnology and Bioengineering**, n.93, p.816-819, 2006.

THOMSEN, L. L.; MILES, D. W. Role of nitric oxide in tumour progression: Lessons from human tumors. **Cancer Metastasis Review**, n.17, p.107-118, 1998.

TIEMANN K; ROSSI, J.J. RNAi-based therapeutics – current status, challenges and prospects. **EMBO Molecular Medicine**, n.1, p.142-151, 2009.

VICK, N.A. Seção doze – Tumores intracranianos e estados de alteração da pressão intracraniana. In: BENNETT, J.C.; PLUM, F. CECIL – **Tratado de Medicina Interna**. 20. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan S.A., n.2, p.2345-2356, 1997.

WINK, D.A.; KASPRZAK, K.S.; MARAGOS, C.M. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. **Science**, n.254, p.1001-1003, 1991.

WOOD, M. J.; TRÜLZSCH, B.; ABDELGANY, A.; BEESON, D. Therapeutic gene silencing in the nervous system. **Human Molecular Genetics**, n.12, p.R279-R284, 2003.

WU, X.M.; LIU, X.; BU, Y.Q.; SENGUPTA, J.; CUI, H.J.; YI, F.P.; LIU, T.; YUAN, C.F.; SHI, Y.Y.; SONG, F.Z. RNAi-mediated silencing of the Bmi-1 gene causes growth inhibition and enhances doxorubicin-induced apoptosis in MCF-7 cells. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.4, p.697-703, 2009.

WÜRDINGER, T.; TANNOUS, B.A. Glioma angiogenesis. **Cell Adhesion & Migration**, n.3, p.230-235, 2009.

XU, W.; LIU, L.Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I.G. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Research**, n.12, p.311-320, 2002.

YACOUB, A.; HAMED, H.; EMDAD, L.; DOS SANTOS, W.; GUPTA, P.; BROADDUS, W.C.; RAMAKRISHNAN, V.; SARKAR, D.; SHAH, K.; CURIEL, D.T.; GRANT, S.; FISHER, P.B.; DENT, P. MDA-7/IL-24 plus radiation enhance survival in animals with intracranial primary human GBM tumors. **Cancer Biology & Therapy**, n.7, p.917-933, 2008.

ZHANG, J.; SNYDER, S.H. Nitric oxide in the nervous system. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, n.35, p.213-233, 1995.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.F.; BRYANT, J.; CHARLES, A.; BOADO, R.; PARDRIDGE, W. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. **Clinical Cancer Research**, n.10, p.3667-3677, 2004.

CAPÍTULO II

ARTIGO

siRNAs SINTÉTICOS DIRECIONADOS À ENZIMA NO SINTASE NEURONAL – EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO DE NNOS E VIABILIDADE CELULAR DO GLIOMA

Fernando Francisco Borges Resende^a; Fátima Maria Caetano Caldeira^a; Simoneide Souza Silva^a; Elaine Del Bel^b Luis Pardo^c; Walter Stühmer^c; Ricardo Titze-de-Almeida, PhD^a.

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

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

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

INTRODUÇÃO

Gliomas são os tipos mais comuns de tumor cerebral primário, em cães domésticos (HEIDNER, 1991) e nos seres humanos (ARKO, 2010). Apresentam a menor taxa de solução terapêutica por várias razões: rápido índice de crescimento e proliferação, alto potencial metastático, capacidade de provocar alterações inflamatórias nos tecidos adjacentes, falta de tratamento específico e, finalmente, as intervenções cirúrgicas são complicadas ou, muitas vezes, contra indicadas (OKADA, 2009; ARKO, 2010).

Com base na Organização Mundial da Saúde (OMS), os quatro principais tipos de gliomas são: astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e gliomas mistos (normalmente oligo-astrocitomas). Astrocitomas, os de maior incidência, são normalmente classificados como pilocítico (grau I), difuso (grau II), anaplásico (grau III), ou glioblastoma multiforme (GBM) (grau IV) com alto grau de anaplasia. A categorização de astrocitomas em grau baixo (I e II) ou alto grau (III e IV) é geralmente dependente de atipia nuclear, atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose focal. GBM é o mais comum dos tumores malignos. Composto por astrócitos neoplásicos pobremente diferenciados, os glioblastomas

afetam principalmente adultos, e estão localizados preferencialmente nos hemisférios cerebrais (OKADA, 2009).

O desenvolvimento do glioma envolve constantes alterações genéticas e moleculares. São várias as vias envolvidas nesse processo, sendo necessários novos estudos para elucidação dos seus papéis no desenvolvimento tumoral (WÜRDINGER, 2009).

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

O NO tem papel relevante na fisiologia das células e na patogênese de vários distúrbios, podendo atuar no processo saúde-doença de forma positiva ou negativa (DOMENICO, 2004). Nesse sentido, há evidências de que o NO tenha papel importante nos eventos celulares que levam à apoptose e, também, na fisiopatologia do crescimento tumoral (AMBS, 1997; AMBS, 1998; XU, 2002).

Em relação ao câncer, é sabido que as enzimas de síntese do NO são expressas em diferentes tipos tumorais e que, quanto mais maligno, maior a sua expressão imuno-histoquímica (BAKSHI et al., 1998).

Os efeitos do NO em tumores são vários. O NO pode promover a angiogênese por estimulação do VEGF e favorecer sua capacidade de crescimento, invasão e metástase (AMBS, 1998).

Danos ao DNA celular também estão relacionados ao NO, que atua como radical livre e reage rapidamente dentro da célula, causando efeitos genotóxicos (WINK, 1991).

Neste sentido, uma das consequências dos danos ao DNA mediados por NO é o acúmulo de p53, que pode induzir a apoptose e parada do crescimento celular, com aumento na atividade transcricional ou pós-transcricional (FORRESTER, 1996; AMBS, 1997). Por outro lado, curiosamente, tem sido demonstrado que o acúmulo de p53 reduz a expressão da iNOS por inibição do seu promotor (AMBS, 1997). Assim, um *feedback* negativo é formado entre a geração de NO e o acúmulo de p53, que podem constituir parte de um mecanismo fisiológico, que responde endogenamente produzindo danos ao DNA. Por outro lado, a inibição do crescimento, num primeiro momento, mediada por p53, pode ser útil para fornecer uma pressão de seleção sobre p53 mutante, comumente expressa nas células tumorais (XU, 2002).

Quanto à abordagem terapêutica direcionada ao câncer, tendo o NO como alvo, estudos anteriores mostram que a inibição farmacológica de NOS pela L-NAME é capaz de diminuir significativamente o crescimento tumoral. Porém, tal intervenção é generalizada e atinge todos os tipos de NOS, provocando efeitos inespecíficos indesejados, tais como o aumento da pressão arterial (SWAROOP et al., 2000).

Dessa forma, como opção aos efeitos colaterais da inibição em massa de NOS e também aos tratamentos convencionais para os tumores intracerebrais, metodologias recentes revelam a possibilidade de regulação gênica direcionada especificamente ao RNAm de um alvo de interesse, utilizando para tal a chamada interferência de RNA ou RNAi (FIRE, 1998; GUPTA et al., 2004).

Com base no acima exposto, considera-se relevante o desenvolvimento de estratégias – nesse caso baseadas em RNAi – para interferir na expressão da enzima nNOS, objetivando diminuir o crescimento tumoral e/ou atrasar o avanço na malignidade do glioma. O produto tecnológico objeto do atual estudo é inovador e abre um novo foco para a pesquisa translacional de tumores intracranianos.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente investigação foi organizada em quatro etapas experimentais. Na primeira etapa foi realizada a análise de bioinformática para levantamento e estudo das sequências de nNOS e para identificação de sequências-alvo para RNAi. A estratégia foi utilizar toda a região codante do gene de nNOS para identificação desses alvos de RNAi. Caso houvesse mutações nessas regiões alvo, tal região seria descartada. A etapa seguinte incluiu ensaios para silenciamento de nNOS, utilizando cultivo “in vitro” de glioma e transfecção das células com siRNA sintéticos estruturados em lipossomas catiônicos, no caso a lipofectamina 2000™ (invitrogen™). Na terceira etapa quantificou-se o grau de silenciamento gênico de nNOS, mediante extração de RNA, transcrição reversa e análise da expressão gênica por PCR em tempo real. Por fim, a quarta etapa avaliou o efeito apoptótico dos siRNAs, a partir de testes fenotípicos de viabilidade celular baseados em ensaios de formazan (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) ou MTT.

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

1.1 Análise de sequências nucleotídicas de nNOS

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

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

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

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

Vários métodos foram descritos e disponibilizados para a identificação de regiões do RNAm de nNOS suscetíveis à interferência de RNA (HAJERI & SINGH, 2009). O desempenho de diferentes metodologias foi recentemente avaliado de forma comparativa, mostrando que os algoritmos BIOPREDSi, *ThermoComposition* e DSIR apresentam melhores previsões para silenciamento gênico (MATVEEVA et al., 2007; HUESKEN et al., 2005; VERT et al., 2006).

1.3 Uso de algoritmos baseados em redes neurais artificiais para seleção de alvos de interferência de RNA sobre a enzima nNOS

Tratam-se de algoritmos previamente validados e que são úteis para a identificação de regiões-alvo para RNAi, neste caso presentes na sequência codante do RNAm de nNOS (MATVEEVA et al., 2007). Para o atual projeto, optou-se por utilizar uma sequência de RNAi situada no exon 28 como alvo de silenciamento das três isoformas de nNOS, alfa, beta e gama, denominada de *e28_hnNOS*. A sequência não será aqui apresentada, pois é objeto de patente para obtenção de propriedade intelectual. Foi utilizado o software BLAST (*Basic Local Alinment Search*

Tool) ajustado para sequências curtas, que está disponível no endereço <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para avaliar a ocorrência de eventuais regiões de similaridade das duas sequências utilizadas para RNAi de nNOS com relação a outros genes depositados no *GenBank*. Caso a sequência e28_hnNOS apresentasse similaridade com sequências de outros genes, esse alvo seria imediatamente descartado para evitar-se efeitos de interferência inespecíficos. O controle negativo do atual estudo (*scramble*) corresponde a uma sequência de nucleotídeos sem homologia com qualquer gene descrito em mamíferos, denominada de *All-Stars™ negative control* siRNA (Qiagen™, nº 1027281, 20nmol).

Etapa II – Silenciamento de nNOS em glioma via RNA interferente

2.1 Síntese química das sequências alvo para interferência de RNA

A sequência e28_hnNOS foi sintetizada com estrutura de dupla fita contendo 21 ribonucleotídeos, pré-anelada, na escala de 20 nmol/tubo (Qiagen™). Os siRNAs foram diluídos em um mililitro (mL) de água RNase free.

2.2 Cultura celular de glioma

O presente estudo utilizou cultivo de células da linhagem de glioma humano U-251MG, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Neurofisiologia e Biologia Molecular, Dept. Morfologia Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. O cultivo foi realizado sempre em triplicata. Utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Medium* + F12 (DMEM/F12 Gibco™, Cat. No. 12400-024) aditivado de 10% de soro fetal bovino, 1% de Glutamax™ I (Cat. No. 35050, Gibco™) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (Cat. No. A5955, Sigma-Aldrich™). A contagem de células para plaqueamento foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Tripán (Cat. No. 15250, GIBCO™). Os frascos com capacidade de 60 mL foram semeados com 5×10^5 células e o cultivo realizado em estufa umidificada (*Thermo Scientific* REVCO™) a 37°C e 5% de CO₂. As células foram postas em suspensão utilizando tripsina/EDTA 0,25% (Cat. No. 25300 – Gibco™), seguida de

banhos com *Dulbecco's Phosphate-pBuffered Saline* (D-PBS – Gibco™, Cat. No. 21600-010).

2.3 Transfecção de glioma em cultura com siRNA e28_hnNOS

Os testes de silenciamento de nNOS foram realizados em dois grupos, um deles recebendo o siRNA *e28_hnNOS* e outro a sequência controle *scramble* (*All-Stars™ negative control siRNA*, Qiagen™). Cada siRNA, tanto o alvo quanto o controle, foi inicialmente estruturado em lipossoma catiônico, seguindo as orientações do fabricante (*Lipofectamine 2000™ Transfection Reagent*, Invitrogen™). A metodologia de transfecção dos gliomas em cultura foi baseada em publicações anteriores (TORCHILIN et al., 2005; ZHAO et al., 2008 e HUGHES et al., 2010). Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e utilizando a concentração de 37,5nM de RNAi. A metodologia utilizada é um procedimento operacional padrão desenvolvido pela equipe do Laboratório de Tecnologia para Terapia Gênica e está descrita no POP 44 do anexo II.

2.4 Obtenção das células de glioma para posterior extração de RNA

As células transfectadas com o siRNA *e28_hnNOS* e *Scramble*, na concentração acima descrita, foram incubadas por 4, 8 e 48 horas pós-transfecção. Depois foram re-suspendidas por tripsinização conforme POP 43.1 (Anexo II).

Etapa III – Quantificação do silenciamento gênico de nNOS

3.1 Extração de RNA total e análise de sua integridade

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

3.2 Quantificação do RNA

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

3.3 Obtenção do cDNA

Para realização do método de RT-qPCR descrito a seguir, foi inicialmente realizada a transcrição reversa (RT) do RNA em sequências de cDNA. Para tanto, utilizou-se o kit comercial *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Cat. No. 11904-018, Invitrogen™). A reação utilizou 1500 ng RNA e foi realizada via sistema *Randon Hexamers* (Cat. No.18080-51 , Invitrogen™), conforme POP 48 do Anexo II. Como controle negativo, foi feita a reação de transcrição reversa sem incluir a enzima *SuperScript III* na mistura. Esse controle permite detectar a eventual contaminação da amostra com DNA genômico, o que traria consequências ao RT-qPCR.

3.4 RT-qPCR

O presente estudo utilizou a técnica de PCR em tempo real quantitativo após transcrição reversa - RT-qPCR (*reverse transcription quantitative real time PCR*) para quantificar o RNAm de nNOS no cultivo celular de glioma em estudo. Para realização da técnica, foram seguidos os seguintes passos:

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

Os *primers* utilizados no método de RT-qPCR foram obtidos de publicações anteriores via consulta ao *National Center for Biotechnology Information – NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Foi realizada análise pelo algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para confirmação da identidade e especificidade dos *primers* quanto ao alvo nNOS. Informações complementares sobre características dos *primers* foram obtidas no *IDT (Integrated DNA Technologies)* (<http://www.idtdna.com>), via *software OligoAnalyser 3.1* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), incluindo conteúdo de G e C, *melting temperature (T_m)*, *hairpins*, *self-dimers*, *hetero-dimers*, entre outros.

Os *primers* foram selecionados para o atual estudo com base nas seguintes características: (i) o tamanho desejado do *amplicon* de 100 pares de base (bp); (ii) percentuais de guanina e citosina de aproximadamente 50%; (iii) reduzida complementariedade intramolecular, evitando-se *hairpins* e *self-dimers*; (iv) reduzida complementariedade intermolecular, evitando-se *hetero-dimers*; (v) reduzida variação nas temperaturas de anelamento $\Delta(Tm)$ entre os *primers forward* e *reverse*, preferencialmente próxima de 1°C. Os *primers* que melhor se adequaram a essas características foram selecionados para o presente estudo (Tabela 1).

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

Sigla	Sequência (5' – 3')	Referência
nNOS_Agui	<i>Forward:</i> 5' – GTGGAGGTGCTGGAGGAGTT – 3' <i>Reverse:</i> 5' – CGAGTGC ^u GGTAGGA ^u ACGAT – 3'*	Aguilera et al., (2007)
nNOS_Dötsch	<i>Forward:</i> 5' – GGTGGAGATCAATATCGCGGTT – 3' <i>Reverse:</i> 5' – CCGGCAGCGGTACTCATTCT – 3'	Dötsch et al., (2000)
nNOS_human	<i>Forward:</i> 5' – GAACTGGGAGACTGAGGTGGTTC – 3' <i>Reverse:</i> 5' – CTCAGTGCATCCCGTTTCCA – 3'	Gunningham et al., (2007)

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

b) Seleção de genes controles endógenos

O atual estudo utilizou metodologia de RNAi, que atua sobre vias endógenas do metabolismo celular do RNA, portanto é fundamental a inclusão de genes controle endógenos (TUZMEN et al., 2007). Os critérios de seleção dos genes candidatos foram: (i) similaridade nas sequências nucleotídicas de todas as amostras; (ii) resistência às condições experimentais, ou seja, a expressão deve manter-se estável independente do teste realizado; (iii) possibilidade de utilização nas mesmas condições de RT-qPCR utilizadas para o gene alvo (VANGUILDER et al., 2008). Neste sentido, optou-se por testar dois genes controle endógenos – GPB1 e PAPOLA, utilizando-se os *primers* descritos na Tabela 2.

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

Alvos	Sequência	Referência
GPB1	Forward: 5' – TCACTTGAGGCAGAACACAGA – 3' Reverse: 5' – AGCACATGTTTCATCATTTCAC – 3'	Kwon et al., (2009).
PAPOLA	Forward: 5' – GCTACGAAGACCAGTCCATTG – 3' Reverse: 5' – TGTTGGTCACAGATGCTGCT – 3'	Kwon et al., (2009).

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

Os níveis de RNA mensageiro da enzima NO sintase neuronal foram quantificados por RT-qPCR, considerando cuidados anteriormente descritos para a padronização do método e para a sua utilização específica em ensaios com RNAi (BUSTIN, 2000; TUZMEN et al., 2007). O equipamento utilizado foi o termociclador *7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems™)*.

A mistura de amplificação, para cada triplicada, foi composta de: SYBR™ *Green master mix (Applied Biosystems™)* 20,0 µL; 1,0 µL de cDNA obtido da transcrição reversa de 1500 ng de RNA; 3,2 µL de primer na concentração de 10pmol/µL; água milliQ autoclavada q.s.p. 40µL. Em cada poço foram colocados 10,0 µL da mistura, sendo que os 10,0 µL restantes são preparados como margem de segurança. Os ciclos de RT-qPCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguida de 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 1min, anelamento e extensão a 60°C por 1min). Foram testados os *primers* nNOS_Agui, nNOS_Dötsch, nNOS_human para quantificação de nNOS. Para amplificação dos genes controle endógenos foram utilizados os *primers* *GC-rich promoter binding protein 1* (GPB1) e Poly(A) polymerase alpha (PAPOLA).

d) Quantificação relativa do silenciamento gênico

O nível de silenciamento gênico foi determinado pelo método de quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$), que representa quantas vezes a expressão gênica do RNAm alvo foi reduzida no grupo tratado em relação ao grupo controle (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; TUZMEN et al., 2007). Assim, irá expressar a redução nos níveis de RNAm de nNOS obtida no grupo tratado com siRNAs (gliomas transfectados com o siRNA *e28_hnNOS*) quando comparado com o grupo controle negativo ou *scramble* (gliomas transfectados com a sequência *scramble All-Stars™ negative control*).

Para fins de esclarecimento, o termo Ct (*crossing threshold*) representa o ciclo de PCR no qual a amplificação tornou-se exponencial. Neste caso, o sinal de fluorescência ultrapassou o limiar de detecção, servindo como referência da quantidade do RNA alvo presente inicialmente na amostra. Assim sendo, maiores valores de Ct indicam menor quantidade de RNA, como ocorre nas situações de silenciamento gênico via RNAi.

Etapa IV – Efeito do siRNA sobre a apoptose induzida por neomicina em cultivo celular de glioma

Os efeitos fenotípicos dos siRNAs sobre a apoptose do glioma foram determinados por ensaios de viabilidade celular pelo método de MTT, conforme será descrito abaixo. Inicialmente, os gliomas foram distribuídos em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^4 células por poço contendo 200 μ L de meio DMEM, em triplicata, sendo mantidos por 24 horas em estufa de CO₂ a 37° C. Para avaliar os efeitos dos siRNAs, os gliomas foram lesados com neomicina na concentração de 300 μ g/mL e tratados após 24 horas com siRNA e28_hnNOS (37,5nM) por 4 horas (estufa de CO₂ a 37° C) e controle negativo *scramble*.

Para determinação da viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de MTT - brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (Cat. No. M-6494, Invitrogen™), conforme orientações do fabricante. Tal método baseia-se na avaliação da atividade mitocondrial. Neste caso, a metabolização do MTT por enzimas desidrogenases resulta em produto de coloração roxa denominado formazan; a intensidade dessa coloração indica o grau de viabilidade celular (VISTICA et al., 1991). Assim, adicionou-se 15 μ L de solução de 5 mg/mL de MTT diluído em 135 μ L de DMEM a cada poço, sendo o material incubado por 3h em estufa de CO₂ a 37° C. Em seguida, removeu-se o meio contendo MTT, e adicionou-se 100 μ L de DMSO para solubilizar os cristais de formazan produzidos pelas células. Os resultados foram mensurados por verificação da densidade óptica (OD) a 595 nm. A porcentagem de viabilidade das células tratadas com as diferentes estruturas de siRNA foi determinada considerando-se como referência a densidade óptica dos controles negativos - células previamente incubadas e sem tratamento com RNAi.

RESULTADOS

Este estudo desenvolveu metodologia para regulação gênica da enzima nNOS, baseada em interferência de RNA. Foi identificado e testado um alvo direcionado à sequência de RNAm codificada pelo exon 28 do gene dessa enzima. As etapas dos resultados experimentais que levaram ao desenvolvimento desse produto estão descritas a seguir.

1.1 Resultados de bioinformática

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

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

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

Exon 2 ATGGAGGATCATATGTTTCGGTGTTCAGCAAATTCAGCCCAATGTCAATTTCTGTTTCGTTCTTCAAGCGCAAAGTTGGGGCCTGG
GATTTCTGGTGAAGGAGCGGGTCACTAGTAGAGCCGCGCTGATCACTCTGACCTGATTCGTTGGGGCGCCGAGAGCAGAGTGG
CCTCATCCAGGCGGAGACATCATTCTTGCCTCAACGGCCGCGCTTGGTGGACCTGAGCTATGACAGCGCCCTGGAGTACTC
AGAGCATTCCCTCGAGACCCAGTGGTCTCATTCTGAGGGCCCTGAAGTTTACCACGCACCTGGAGACCCTTTACAG
GTGATGGGACCCCAAGACCATCCGGGTGACACAGCCCTGGTCCCCCACCAGCGTGGATCTGTCCACCAGCCACCGGC
CGGCAAGAAGACAGCCCTGGCAGTGGATGGGCCTCGGGTCCGGGAATGGCCTCAGCATGCCTACGATGATGGGACGAGGCT
GGCTCACTCCCCATGCCAACGGCTGGCCCCAGGCCAGGCCAGGCCGGAAGAAGCAACCAGAGTCAAGCAGCTCC
AAGGCAGAGGGGAGAACAATGAACCTGCTCAAGGAGATAGACCTGTGTGAGCCTTCTCACCAGTGGGAGCAGGGGTCAAGGG
AGGGCACCTGCCAAGGCAGAGATGAAAGATATGGGAATCCAGGTGGACAG

Exon 3 AGATTTGGACGGCAAGTCAACAACCTCTGCCCTCGGGCTGGAGAACGACCGAGTCTTCAATGACCTATGGGGGAGGGCAAT
GTCCCTGTCTCCTCAACAACCCATATTCAGAGAAGGAGCAG

Exon 4 CCCCCACCTCAGGAAAACAGTCCCCACAAAGAAATGGCAGCCCTCCAAGTGTCCACGCTTCTCAAGTCAAGAATGGGAGA
CTGAGGTGGTTCTCACTGACACCCTCCACCTTAAGAGCACATTG

Exon 5 GAAACGGGATGCACGTGAGTACATCTGCATGGGCTCCATCATGCATCCTTCTCAGCATGCAAGGAGGCTGAAGACGTCCGCACAA
AAGGACAGCTCTTCCCTCTCGCCAAAGAGTTTATTGATCAATACTATTCAATTAAGA

Exon 6 ATTTGGAGTGGTTCAAGGACCTGGGGCTGAAGTGGTACGGCTCCCGCCGTGCCAACATGCTCCTAGAGATTGGCGCCTGGAG
GAGCTCATCTATGGGGCAAGCACGCTGGCGGAATGCCTCGCGTGTGTGGGACGATCCAGTGGTCCAAGTGCAG

Exon 7 GTATTCGATGCCCCGTGACTGCACCACGGCCACGGGATGTTCAACTACATCTGTAACCATGTCGAATGTCACCAACAAAGGGA
ACCTCAG

Exon 8 GTCTGCCATCACCATATTTCCCCAGAGGACAGACGGCAAGCACGACTTCCGAGTCTGGAACGCCAGCTCATCCGCTACGCTGGC
TACAAGCAGCTGACGGCTCCACCTGGGGACCCAGCCAATGTGCAGTTCACAGAG

Exon 9 ATATGCATACAGCAGGGCTGGAAACCGCCTAGAGGCGCTTCGATGCTCCTGCCCTCCTGCTTCCAGCCAACGGCAATGACCTG
AGCTCTCCAGATTCTCCAGAGCTGGTGTGGAAGTTCCCATCAGGCCACCCAA

Exon 10 GTTTGAGTGGTTCAAGGACCTGGGGCTGAAGTGGTACGGCTCCCGCCGTGCCAACATGCTCCTAGAGATTGGCGCCTGGAG
TTCAGCGCTGTCCCTCAGTGGCTGGTACATGGGCACAGAGATTGGTGTCCGCGACTACTGTGACAACTCCCGCTACAATATCC
TGGAG

Exon 11 GAAGTGGCCAAGAAGATGAACTTAGACATGAGGAAGACGTCTCCCTGTGGAAGGACCAGGCGCTGGTGGAGATCAATATCGCGG
TTCTCTATAGCTTCCAG

Exon 12 AGTGACAAAGTGACCATTTGTGACCATCACTCCGCCACCGAGTCTTCAATTAAGCACATGGAGAATGAGTACCGCTGCCGGGGG
GCTGCCCTGCCGACTGGGTGTGGATCGTCCCCCATGTCCGGAAGCATCACCCCTGTGTTCCACCAGGAGATGCTCAACTACCG
GCTCACCCCTCCTTCGAATACCAG

Exon 13 CCTGATCCCTGGAAACGCATGCTGGAAGGCACCAACGGGACCCCAAGCGCGAGCCATTGGCTTCAAGAAGCTAGCAG
A

Exon 14 AGCTGTCAAGTTCTCGGCCAAGCTGATGGGGCAGGCTATGGCCAAGAGGGTGAAGCGACCATCCTCTATGCCACAGAGACAGGC
AAATCGCAAGCTTATGCCAAGACCTTGTGTGAGATCTTCAAACACGCTTTGATGCCAAG

Exon 15 GTGATGTCCATGGGAAGATATGACATTTGTGACCTGGAACATGAAACTCTGGTCTTGTGGTCCACCAGCACCTTTGGCAATGGAG
ATCCCCCTGAGAATGGGGAG

Exon 16 AAATCGGGTGTGCTTTGATGGAATGAGGCACCCCAACTCTGTGCAGGAAGAAAGAA

Exon 17 GAGCTACAAGGTCCGATTCAACAGCGTCTCCTCTACTCTGACTCCAAAATCATCAGGCGATGGGCCGACCTCAGAGACAAC
TTTGTAGAGTCTGGACCCCTGGCCAATGTAG

Exon 18 GTTCTCAGTTTTTGGCCTCGGCTCACGAGCATACCTCACTTTTGCCTTCCGACAGCTGTGGACACCCTCCTGGAAGAATG
GGAGGGGAGAGGATCCTGAAGATGAGGAAGGGGATGAGCTCTGTGGGACGGAAGGCTTTCAGGACCTGGGCCAAGAAGGTCT
TCAAG

Exon 19 GCAGCTGTGATGTTCTGTGTGGGAGATGATGTCAACATGAAAAGGCCAACAAATTCCTCATCAGCAATGATCGCAGCTGGA
AGAGAAACAAGTTCCGCTCACCTTTGTGGCCGAAGCTCCAGAATCAACAAG

Exon 20 GTCTATCCAATGTCCACAAAAGCGAGTCTCAGCTGCCCGCTCCTTAGCCGTCAAACCTCCAGAGCCCTAAATCCAG

Exon 21 TCGGTCAACTATCTTCGTGCTCTCCACACCAACGGGAGCCAGGAGCTGCAGTACCAGCCTGGGGACCACTGGGTGTCTTCCCT
GGCAACCAGGAGCCTCGTGAATGCCCTGATCGAGCGCTGGAGGACGCGCCCTGTCAACCAGATGGTGAAGTGAAGTGC
TGGAGGAGCGGAACACGGCTTTAG

Exon 22 GTGTATCAGTAACTGGACAGACGAGCTCCGCTCCCGCCTGCACCATCTTCCAGGCTTCAAGTACTACCTGGACATCACAC
GCCACCAACGCTCTGCAGTGCAGCAGTTTGCCTCCCTAGCTACCAGCGAGAAGGAGAAGCAGCGTCTGTGGTCTCAGCAAG

Exon 23 GGTTCGAGGATACGAGGAATGGAATGGGGCAAGAACCACCATCCTGGTGGAGTGTGGAGGAGTTCCCATCTATCCAGATGC
CGGCCACCTGCTCCTGACCCAGCTGTCCCTGTGCAGCCCGCTACTATTCCATCAGCTCCTCCCCAGACATGTACCCTGATGA
AGTGCACCTCACTGTGGCCATCGTTTCTTACCGCACTCGAG

Exon 24 ATGGAGAAGGACCAATTCACCACGGCGTATGCTCCTTGGCTCAACCGGATACAGGCTGACGAACTGGTCCCTGTTTCGTGAG
AGG

Exon 25 AGCACCCAGCTTCCACCTGCCCGGAACCCCAAGTCCCTGCATCCTCGTTGGACCAGGCACCGGCAATTGCCCTTTCCGAAGC
TTCTGGCAACAGCGGCAATTTGATATCCAACACAAAG

Exon 26 GAATGAACCCCTGCCCATGGTCTTGGTCTTCCGGTTCGGGTCGCGCAATCCAAGATAGATCATATCTACAGGGAAGAGACCTGCAGGC
CAAGAACAAGGGGTCTTCAGAGAGCTGTACACGGTTACTCCGGGAGCCAGACAACCAAAG

Exon 27 AAGTACGTGCAGGACATCTGCAGGAGCAGTGGCGGAGTCTGTGTACCGACCTGAAGGAGCAAGGGGGCCACATACGCTCT
GTGGGACGTCACCATGGCTGCTGATGCTCAAGCCATCCAGCGCATCATGACCAGCAGGGGAAGCTCTCGGCAGAGGACGC
CGGCGTATTATCAGCCGGATGAGG

Exon 28 GATGACAACCGATACCATGAGGATATTTTGGAGTCAACCTGCGAACGTACGAAGTACCAACCGCTTAGATCTGAGTCCATTG
CCTTCAATGAAGAGCAAAAAGACACCGATGA

Exon 29 GGTTCAGCTCCTAA

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

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

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

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

Todas as etapas de cultivo celular e transfecção foram devidamente reproduzidas conforme procedimento operacional padrão desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica, possibilitando condições adequadas para os testes de silenciamento gênico de nNOS em gliomas.

A extração do RNA total via kits comerciais apresentou bom rendimento, obtendo-se concentrações próximas de 300 ng/μL. Essa concentração possibilitou iniciar a transcrição reversa com 1500 ng de RNA em cada reação.

Conforme apresentado na figura 4, o RNA apresentou integridade satisfatória. Podem ser visualizadas as bandas de RNA ribossomal 18S e 28S, com 1900 e 4800 nucleotídeos, respectivamente, bem como ausência de rastro de degradação ou *smear*.

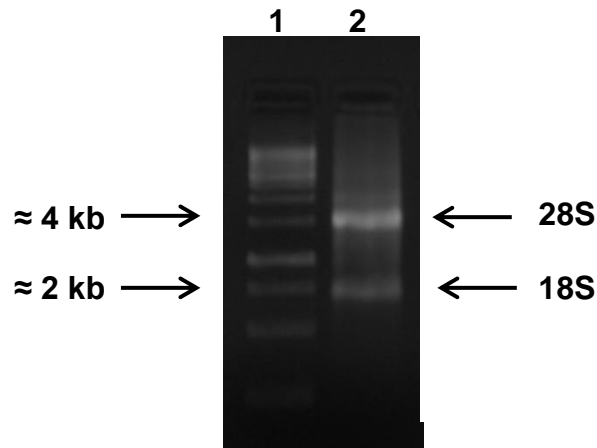


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo representativo de ensaio de extração de RNA. Canaleta 1, marcador de massa molecular 1kb *size marker* DNA Ladder (*Real Biotech Corporation*TM); canaleta 2, amostra de RNA extraído de cultivo celular de glioma.

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

Quanto aos *primers* para amplificação de nNOS e dos genes endógenos no método de qPCR, todos apresentaram resultados de amplificação adequados. Porém, os *primers* nNOS_Dötsch e GPB1 apresentaram menores valores de Ct e maior reprodutibilidade inter-ensaios, razão pela qual foram selecionados para esse estudo.

1.3 Resultados da interferência de RNA sobre o conteúdo de nNOS, por RT-qPCR

Os resultados mostram que o siRNA e28_hnNOS (37,5 nM) causou alteração no conteúdo de RNAm de nNOS nos três tempos testados – 4, 24 e 48 horas, quando comparado com o siRNA controle scramble (Fig. 5). Os valores de Δ Ct foram obtidos pela subtração dos valores de Ct do alvo nNOS em relação àqueles do gene controle endógeno GPB1, nas triplicatas de três ensaios independentes. Os dados mostram que o siRNA em teste causou redução do conteúdo de nNOS nos tempos 4 e 24 horas pós-transfecção, representado por valores de Δ Ct superiores aos obtidos no grupo controle. No tempo de 48 horas, entretanto, observou-se efeito

oposto no grupo tratado com e28_hnNOS, havendo aumento no conteúdo de nNOS, expresso pela redução de ΔCt . As diferenças não apresentaram significância estatística.

Analisando-se a expressão gênica de nNOS em termos percentuais (ΔCt do grupo teste / ΔCt do grupo controle), observa-se que o aumento de conteúdo de nNOS foi superior no tempo 24 horas em relação ao tempo 4 horas (107,08% versus 103,52%), conforme Fig. 6. No tempo 48 horas, ao contrário, houve redução percentual (92,83%).

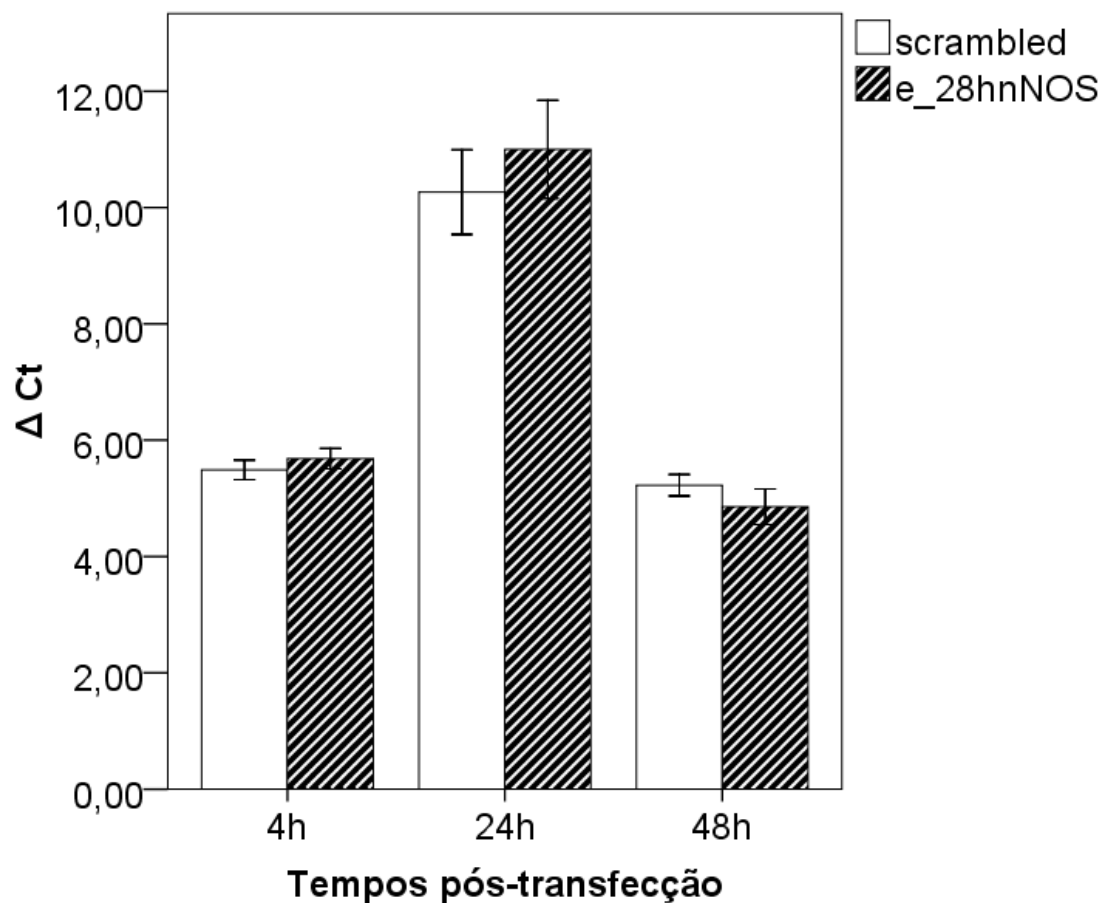


Figura 5. Variação temporal dos valores de ΔCt do alvo nNOS após transfecção com os siRNAs *e28_hnNOS* ou scramble. Culturas de glioma humano da linhagem U-251MG foram transfectadas com siRNA estruturado em lipossoma catiônico (37,5nM). O valor de ΔCt foi obtido pela subtração entre os valores de Ct do alvo nNOS e do controle endógeno GPB1. Os valores foram obtidos por RT-qPCR nos tempos de 4, 24 e 48 horas, em triplicata, e expressos como a média de três repetições experimentais.

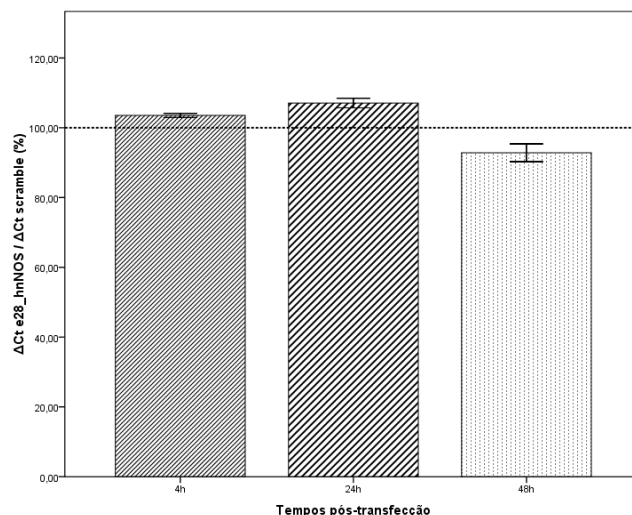


Figura 6. Variação temporal dos valores de ΔCt do alvo nNOS após transfecção de gliomas com os siRNAs *e28_hnNOS* ou *scramble* (37,5nM), expressos como percentual em relação ao grupo *scramble*. Os valores iniciais de ΔCt para os siRNAs *e28_hnNOS* e *scramble* expressam a relação entre os valores de Ct do alvo nNOS e do controle endógeno GPB1. Os valores foram obtidos por RT-qPCR, em triplicata, para três ensaios experimentais independentes.

Quanto ao conteúdo relativo de nNOS, observou-se que o siRNA *e28_hnNOS* causou alteração nos tempos 4, 24 e 48 horas, conforme resultado obtido pelo método da expressão relativa ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Fig. 7). A maior redução deste conteúdo foi observada no tempo 24 horas, atingindo 0,61 em relação ao valor observado no controle *scramble*, ajustado para 1 ou 100% (observar linha pontilhada). No tempo 4 horas, a redução foi de 0,88 em relação ao grupo controle. Foi possível observar tendência, mas não houve diferença estatística entre os tempos quatro e 24 horas ($p=0,053$). Surpreendentemente, houve aumento no conteúdo de nNOS no tempo 48 horas. A expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) no grupo tratado com o siRNA *e28_hnNOS* foi 1,4 vezes superior àquela observada no grupo controle *scramble*, ajustado para 1 ou 100%. A diferença entre os valores observados no grupo 48 horas em relação aos grupos quatro e 24 horas mostrou significância estatística ($p<0,01$, ANOVA *oneway* seguida de Tukey).

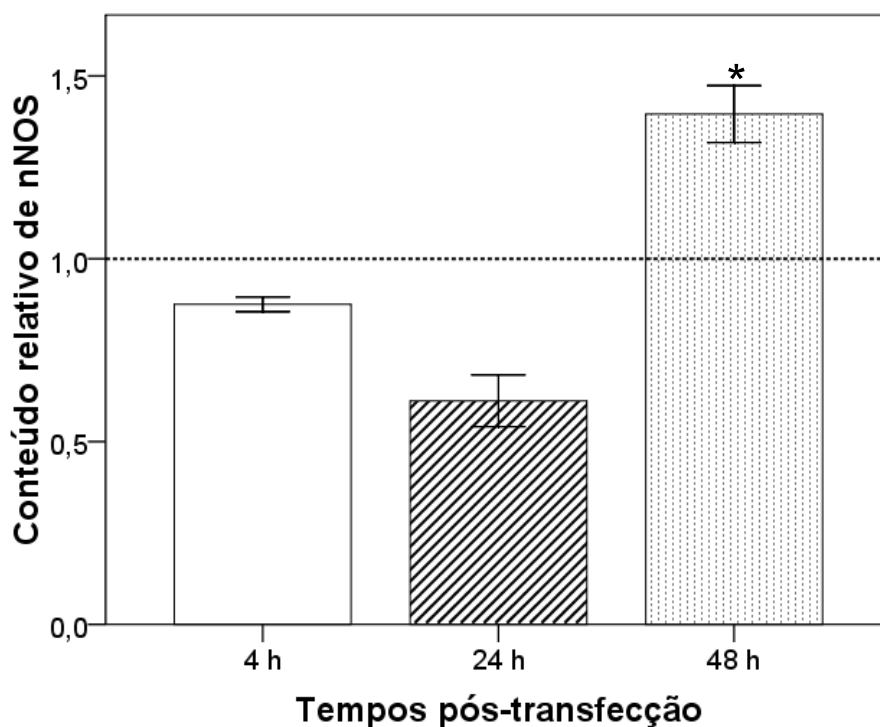


Figura 7. Efeitos dos siRNAs *e28_hnNOS* ou *scramble* sobre o conteúdo de RNAm de nNOS nos tempos 4, 24 e 48h. Culturas de glioma humano da linhagem U-251MG foram transfectadas com os siRNAs estruturados em lipossomas catiônicos (37,5 nM). O níveis de nNOS foram determinados por RT-qPCR, em triplicata e expressos pelo método da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

* - diferença significativa para o tempo de 48 horas quando comparado com os tempos de 4 e 24 horas ($p < 0,01$, ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey).

1.4 Efeitos do siRNA *e_28hnNOS* e da injúria por neomicina sobre a viabilidade de gliomas, pelo ensaio de MTT

O presente ensaio mostrou que a interferência de RNA sobre nNOS foi capaz de produzir efeitos fenotípicos sobre viabilidade celular de gliomas em cultura, e que estes efeitos são influenciados pelo agente pró-apoptótico neomicina. Na ausência da injúria por neomicina, a interferência de RNA pelo siRNA *e28_hnNOS* e também pelo controle *scramble* promoveram aumento na viabilidade celular, em valores de 104,31% e 105,90%, respectivamente (Fig. 8). Na presença da lesão por neomicina os resultados são opostos, havendo queda da viabilidade celular após tratamento com o siRNA *e28_hnNOS* (Fig. 9). Notar que a viabilidade celular foi reduzida para 96,36% apenas no grupo tratado com *e28_hnNOS*; o grupo controle *scramble* apresentou o mesmo efeito observado anteriormente, ou seja, houve aumento deste parâmetro para 103,69%.

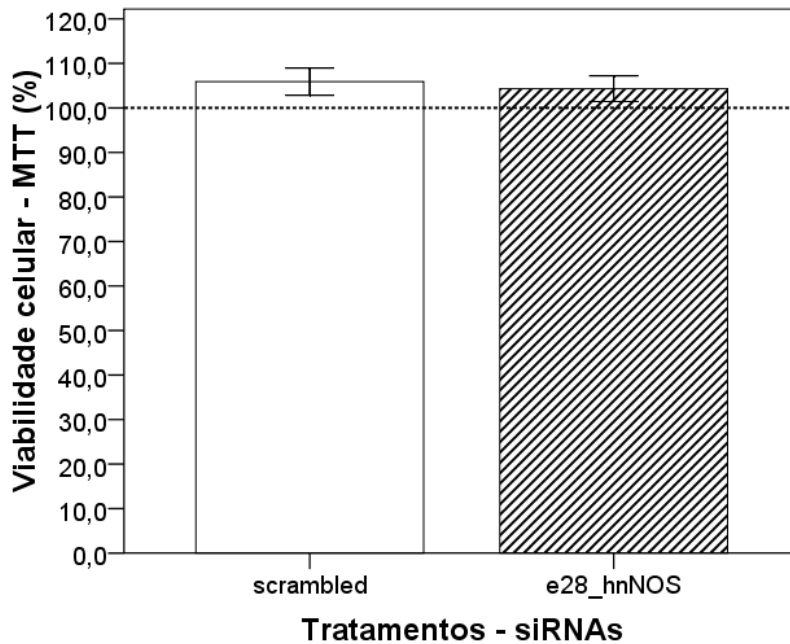


Figura 8. Viabilidade celular de gliomas transfetados com os siRNAs e28_hnNOS e *scramble* (37,5 nM / poço) estruturados em lipossomas catiônicos (Lipofectamine 2000™) no tempo de 4 horas, determinada pelo método de MTT em cinco ensaios independentes. A viabilidade está expressa como percentual em relação aos valores de absorbância observados no grupo controle não tratado.

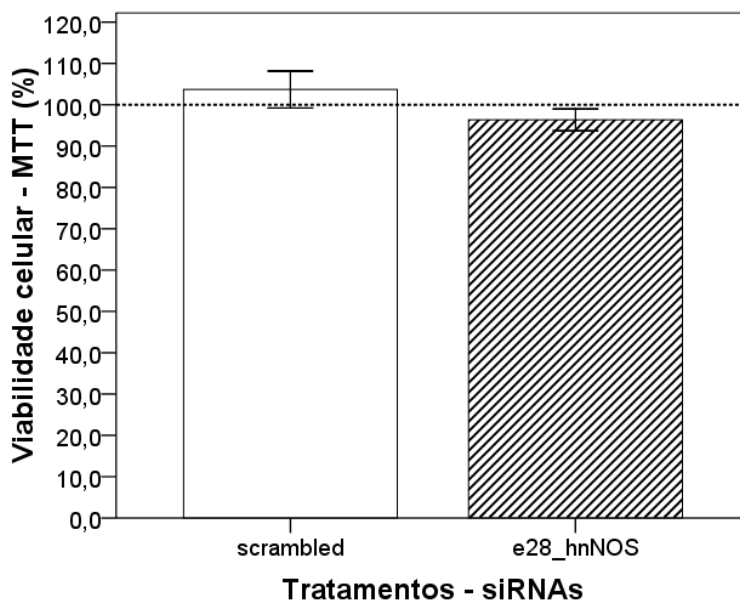


Figura 9. Viabilidade celular de gliomas previamente lesados com neomicina e transfetados com os siRNAs e28_hnNOS ou *scramble* (37,5 nM/poço) estruturados em lipossomas catiônicos (Lipofectamine 2000™) no tempo de 4 horas, determinada pelo método de MTT em cinco ensaios independentes. A viabilidade está expressa como percentual em relação aos valores de absorbância observados no grupo controle não tratado.

DISCUSSÃO

O atual projeto estudou os efeitos da interferência de RNA sobre a enzima NO sintase neuronal em linhagem celular de glioma. A estrutura genética utilizada foi RNA interferente curto, em dupla fita, direcionado à sequência do RNAm de nNOS codificada pelo exon 28, denominado de siRNA e28_hnNOS. Os resultados desta pesquisa mostram que este siRNA causa alteração na expressão da enzima nNOS e no fenótipo de viabilidade celular do glioma, conforme será discutido a seguir.

As enzimas NO sintases são fortemente expressas em gliomas e têm papel importante na regulação do fluxo sanguíneo do tumor. Sendo assim, a inibição sistêmica da NOS pela Ng-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) administrada em ratos acometidos por glioma da linhagem C6, causa aumento na taxa de necrose, o que resulta em efeito antitumoral (SWAROOP et al., 2000). No mesmo sentido, a inibição da isoforma iNOS pela molécula antagonista N6-(1-Iminoethyl)-L-lisina-dicloridrato (L-nil) causou vários efeitos antineoplásicos em linhagem de melanoma, incluindo redução do crescimento tumoral, diminuição da densidade vascular, aumento do número de células apoptóticas, culminando com prolongamento da sobrevivência de camundongos portadores (SIKORA et al., 2010). Apesar destes benefícios terapêuticos, inibidores de NOS não-seletivos podem causar efeitos colaterais graves. Destaca-se o aumento da pressão arterial e a elevação da resistência vascular periférica, acompanhados das respectivas consequências funcionais e estruturais do quadro hipertensivo (TÖROK, 2008). Nesse sentido, foram desenvolvidos inibidores seletivos da isoforma neuronal da enzima - nNOS, que assim teriam efeitos antitumorais, sem causar efeitos hipertensivos – devido à inibição de eNOS, ou problemas sobre o sistema imune – devido à inibição de iNOS (HAITAO et al., 2009; YU et al., 2011). Apesar desta vantagem, alguns compostos seletivos para nNOS são altamente polares, o que dificulta a penetração na barreira hemato-encefálica e, conseqüentemente, limita o seu emprego no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central (SILVERMAN, 2009). Considerando-se essas limitações, assim como os papéis da nNOS no desenvolvimento tumoral, torna-se relevante a busca por alternativas mais específicas de bloqueio enzimático.

O silenciamento gênico mediado por interferência de RNA (RNAi) tem aberto oportunidades para a ciência e o desenvolvimento tecnológico no campo das

ciências translacionais (FIRE et al., 1998; GUPTA et al., 2004; BUSHATI & COHEM, 2007; GONZALES-ALEGRE & PAULSON, 2007). O mecanismo de ação da RNAi mediada por siRNAs ocorre em nível pós-transcricional no citoplasma celular e depende da formação de pontes de hidrogênio entre fita *guide* do siRNA em teste (e28_hnNOS) e a sequência-alvo, no caso do presente estudo a sequência codificada pelo exon28 da nNOS (MEISTER & TUSCHL, 2004; CARTHEW & SONTHEIMER, 2009). Nesse sentido, apenas dois outros estudos utilizaram a metodologia de RNAi para silenciamento de nNOS. O primeiro deles utilizou vetores lentivirais para expressão de *short-hairpins* de RNA, realizando testes *in vitro*, em neurônios corticais do rato, e *in vivo*, após administração intracerebral via cirurgia estereotáxica (MAHAIRAKI et al., 2009). Além da diferença do uso de vetor viral, comparado ao presente estudo que utilizou siRNAs sintéticos, o alvo de silenciamento foi sequência codificada pelo exon 10, enquanto aqui utilizamos como alvo o exon 28. Ambos os exons, entretanto, codificam sequências comuns às três isoformas de nNOS, alfa, beta e gama. Os autores observaram acima de 90% de silenciamento gênico de nNOS no tempo de 48 horas pós-transfecção. No presente estudo obtivemos silenciamento gênico nos tempos de 4 e 24 horas, o que pode ser reflexo da natureza da estrutura genética em uso. siRNAs são sequências curtas de RNA que produzem silenciamento gênico por tempos menores quando comparados com vetores virais, que podem expressar sequências gênicas por períodos mais prolongados (SANDY et al., 2005). O grau de transfectividade celular obtido com lentivírus, sobretudo em células neuronais, é comumente superior àquele obtido com outras estruturas genéticas, o que pode ter contribuído para o grau de silenciamento de 90%, bastante superior ao obtido em nosso estudo, cuja a expressão foi de 0,61 vezes em relação ao observado no controle negativo (MAHAIRAKI, et al., 2009). O segundo trabalho também utilizou lentivírus para expressão de shRNA direcionados à nNOS, em construto genético que continha sequência do microRNA 30 no cassete de expressão e promotor regulado por tetraciclina (LIU et al., 2010). Os autores observaram silenciamento gênico *in vitro* e *in vivo*, porém com grande variação de potência de acordo com a estrutura cerebral em estudo. Até onde nosso conhecimento alcança, os resultados de silenciamento de nNOS em gliomas via RNAi são totalmente inéditos na literatura científica. Da mesma forma, o silenciamento de nNOS via siRNAs sintéticos direcionados ao exon 28 é também

inédito, o que revela um novo alvo terapêutico em potencial para terapia gênica do glioma.

A segunda vertente do atual estudo foi avaliar o efeito do siRNA e28_hnNOS sobre a morte de gliomas induzida por neomicina. Os efeitos tóxicos dos aminoglicosídeos têm sido estudados em vias auditivas, como fenômeno apoptótico que leva à morte de células dos sistemas coclear e vestibular (BEEK et al., 2011). Quanto aos gliomas, estudos anteriores mostram que a neomicina apresenta efeito antiproliferativo, reduzindo a tumorigênese (CUEVAS et al., 2002; CUEVAS et al., 2004). No presente estudo, verificamos que o siRNA e28_hnNOS reduz a viabilidade celular de gliomas lesionados com neomicina. Assim, os achados desta pesquisa, somados aos obtidos em publicações anteriores, mostram o potencial terapêutico de associar um agente pró-apoptótico, neste caso a neomicina, com a interferência de RNA sobre nNOS, como estratégia terapêutica potencial para controle da proliferação celular do glioma. Novamente aqui apresentamos resultado totalmente inédito, que mostra a possibilidade de controle do glioma *in vitro* mediante a associação de antibiótico aminoglicosídeo com terapia gênica via RNAi sobre nNOS.

CONCLUSÕES

Concluindo, o presente estudo obteve e testou o produto e28_hnNOS, sequência de siRNA em dupla fita, que mostrou capacidade de regular a enzima nNOS e de potencializar a apoptose em linhagem celular de glioma previamente lesada por neomicina. Esse resultado vincula a expressão da enzima nNOS com o fenômeno da viabilidade celular e apresenta, além disso, uma nova ferramenta com potencial terapêutico, focada em silenciamento gênico via siRNAs. Projetos futuros poderão clarificar as eventuais vias de morte neuronal ligadas à interferência de RNA sobre a nNOS e, no sentido tecnológico, avançar para os testes em modelos animais de câncer.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, P.; CHÁNEZ-CÁRDENAS, M.E.; FLORIANO-SÁNCHEZ, E; BARRERA, D.; SANTAMARÍA, A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, D.J.; PÉREZ-SEVERIANO, F.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; JIMÉNEZ, P.D. Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. **Neurotoxicology**, n.28, p.1200-1207, 2007.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, n.357, p.593-615, 2001.
- AMBS, S.; HUSSAIN, S.P.; PERWEZ, H.; HARRIS, C.C. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. **FASEB Journal**, n.11, p.443-448, 1997.
- AMBS, S.; OGUNFUSIKA, M.O.; MERRIAM, W.G.; BENNETT, W.P.; BILLIAR, T.R.; HARRIS, C.C. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, n.95, p.8823-8828, 1998.
- ARKO, L.; KATSYV, I.; PARK, G.E.; LUAN, W.P.L.; PARK, J.K. Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. **Pharmacology Therapy**, n.128, p.1–36, 2010.
- BAKSHI, A.; NAG, T. C.; WADHWA, S. The expression of nitric oxide synthases in human brain tumours and peritumoral areas. **Journal of Neurological Sciencies**. n.155, p.196-203, 1998.
- BEECK, K.O.; SCHACHT, J.; CAMP, G.V. Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: The programmed death of the hair cell. **Hearing Research**, n.281, p.18-27, 2011.
- BUSHATI, N.; COHEN, S. M. MicroRNA Functions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, n.23, p.175–205, 2007.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, n.25, p.169-193, 2000.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNA and

- siRNA. **Cell**, n.136, p.642-655, 2009.
- CUEVAS, P.; DÍAZ-GONZÁLEZ, D.; DUJOVNY, M. Antiproliferative effect of neomycin in glioma cells. **Neurological Research**. n.24, p.389-391, 2002.
- CUEVAS, P.; DÍAZ-GONZÁLEZ, D.; DUJOVNY, M. Neomycin inhibits glioma cell migration. **Neurological Research**, n.26, p.273-275, 2004.
- DOMENICO, R. Pharmacology of Nitric Oxide: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Current Pharmaceutical Design**, v.10, n.14, p.1667-1676, 2004.
- DÖTSCH, J.; HARMJANZ, A.; CHRISTIANSEN, H.; HÄNZE, J.; LAMPERT, F.; RASCHER, W. Gene expression of neuronal nitric oxide synthase and adrenomedullin in human neuroblastoma using real-time PCR. **International Journal of Cancer**, n.88, p.172-175, 2000.
- ELIASSON, M. J, L.; BLACKSHAW, S.; SCHELL, M. J.; SNYDER, S. H. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.94, p.3396-3401, 1997.
- FIRE, A. Z. Gene silencing by double-stranded RNA. **Cell Death and Differentiation**, n.12, p.1998-2012, 1998.
- FORRESTER, K.; AMBS, S.; LUPOLD, S.E. Nitric oxide induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase (NOS2) expression by wild type p53. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, n.93, p.2442-2447, 1996
- GONZALES-ALEGRE, P. Technology insight: therapeutic RNA interference – how far from the neurology clinic. **Nature Clinical Practice. Neurology**, n.3, p.394-404, 2007.
- GUNNINGHAM, S. P.; CURRIE, M. J.; MORRIN, H. R.; TAN, E. Y.; TURLEY, H.; DACHS, G. U.; WATSON, A. I.; FRAMPTON, C.; ROBINSON, B. A.; FOX, S. B. The angiogenic factor thymidine phosphorylase up-regulates the cell adhesion molecule P-selectin in human vascular endothelial cells and is associated with P-selectin expression in breast cancers. **The Journal of Pathology**, n.212, p.335-344, 2007.
- GUPTA, S.; SCHOER, R. A.; EGAN, J. E.; HANNON, G. J.; MITTAL, V. Inducible,

- reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.101, p.1927-1932, 2004.
- HAITAO, JI; HUIYING, LI; MARTÁSEK, P.; ROMAN, L.J.; POULOS, T.L.; SILVERMAN, R.B. Discovery of highly potent and selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase by fragment hopping. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, n.3, p.779-797, 2009.
- HAJERI, P.; SINGH S. K. siRNAs: their potential as therapeutic agents. Designing siRNAs. **Drug Discovery Today**, n.14, p.851-858, 2009.
- HEIDNER, G.L.; KORNEGAY, J.N.; PAGE, R. L.; DODGE, R. K.; THRALL, D.E. Analyses of Survival in a Retrospective Study of 86 Dogs With Brain Tumor. *Jornal of Veterinary Internal Medicine*, v.5, n.4, p.219-226, 1991.
- HUESKEN, D.; LANGE, J.; MICKANIN, C.; WEILER, J.; ASSELBERGS, F.; WARNER, J.; MELOON, B.; ENGEL, S.; ROSENBERG, A.; COHEN, D.; LABOW, M.; REINHARDT, M.; NATT, F.; HALL, J. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. **Nature Biotechnology**, n.23, p.995-1001, 2005.
- HUGHES, J.; YADAVA, P.; MESAROS, R. Liposomal siRNA Delivery. In: *Liposomes*, V. **Methods in Molecular Biology**, v.605, c.31, p.445-459, 2010.
- KWON, M.J.; OH, E.; LEE, S.; ROH, M.R.; KIM, S.E.; LEE, Y.; CHOI, Y.L.; IN, Y.H.; PARK, T.; KOH, S.S.; SHIN, Y.K. Identification of Novel Reference Genes Using Multiplatform Expression Data and Their Validation for Quantitative Gene Expression Analysis. **Plos one**, v.4, l.7, 2009.
- LIU, B.; XU, H.; PATON, J.F.; KASPAROV, S. Cell- and region-specific miR30-based gene knock-down with temporal control in the rat brain. **BMC Molecular Biology**, n.6, p.11-93, 2010.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, n.25, p.402–408, 2001.
- MAHAIRAKI, V.; XU, L.; FARAH, M. H.; HATFIELD, G.; KIZANA, E.; MARBÁN, E.; KOLIATSOS, V. E. Targeted knock-down of neuronal nitric oxide synthase expression in basal forebrain with RNA interference. **Journal of Neuroscience**

- Methods**, n.179, p.292-299, 2009.
- MATVEEVA, O.; NECHIPURENKO, Y.; ROSSI, L.; MOORE, B.; SAETROM, P.; OGURTSOV, A. Y.; ATKINS, J. F.; SHABALINA, S. A. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. **Nucleic Acids Research**, n.35, p.63, 2007.
- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double stranded RNA. **Nature**, n.431, p.343-349, 2004.
- OKADA, H.; KOHANBASH, G.; ZHU, X.; KASTENHUBER, E.R.; HOJI, A.; UEDA, R.; FUJITA, M. Immunotherapeutic Approaches for Glioma. **Critical Reviews in immunology**, n.29, p.1-42, 2009.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed), **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.
- SANDY P.; VENTURA, A.; JACKS, T. Mammalian RNAi: a practical guide. **BioTechniques**. n.39, p.215-224, 2005.
- SIKORA, A.G.; GELBARDA, A.; DAVIESA, M.A.; SANOB, D.; EKMEKCIOGLUC, S.; KWONG, J.; HAILEMICHAEL, Y.; JAYARAMANE, P.; MYERSB, J.N.; GRIMMC, E.A.; OVERWIJKA, W.W. Targeted inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits growth of human melanoma in vivo and synergizes with chemotherapy. **Clinical cancer research**, n.15, p.1834-1844, 2010.
- SILVERMAN, R. B. Design of selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases. **Accounts of Chemical Research**, n.3, p.439-451, 2009.
- SWAROOP, G.R.; KELLY, P.A.; BELL, H.S. The effects of chronic nitric oxide synthase suppression on glioma pathophysiology. **British Journal of Neurosurgery**, n.14, p.543-548, 2000.
- THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C. H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C. A.; HARRIS, C. C.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, n.1, p.18-31, 2008.
- TORCHILIN, V.P. Recent advances of liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews. Drug Discovery**, n.4, p.145, 2005.

- TÖROK, J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. **Physiological Research**, v.57, p.813-825, 2008.
- TUZMEN, S.; KIEFER, J.; MOUSSES, S. Validation of short interfering RNA knockdowns by quantitative real-time PCR. **Methods in Molecular Biology**, n.353, p.177-203, 2007.
- VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, n.44, p.619-626, 2008.
- VERT, J.P.; FOVEAU, N.; LAJAUNIE, C.; VANDENBROUCK, Y. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. **BMC Bioinformatics**, n.30, p. 520, 2006.
- VISTICA, D.T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M. R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Research**, n.51, p.2515-2520, 1991.
- WINK, D.A.; KASPRZAK, K.S.; MARAGOS, C.M. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. **Science**, n.254, p.1001-1003, 1991.
- WÜRDINGER, T.; TANNOUS, B.A. Glioma angiogenesis. **Cell Adhesion & Migration**, n.3, p.230-235, 2009.
- XU, W.; LIU, L.Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I.G. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Research**, n.12, p.311-320, 2002.
- YU, L.; DERRICK, M.; JI, H.; SILVERMAN, R. B.; WHITSETT, J.; VÁSQUEZ-VIVAR, J.; TAN, S. Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents Cerebral Palsy following Hypoxia-Ischemia in Fetal Rabbits: Comparison between JI-8 and 7-Nitroindazole. **Developmental Neuroscience**, n.10, p.312-319, 2011.
- ZHAO, M.; YANG, H.; JIANG, X.; ZHOU, W.; ZHU, B.; ZENG, Y.; YAO, K.; REN, C Lipofectamine RNAiMAX: an efficient siRNA transfection reagent in human embryonic stem cells. **Molecular Biotechnology**, n.40, p.19-26, 2008.
- ZHOU, L.; ZHU, D. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide**, n.20, p.223-230, 2009.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O siRNA sintético e28_hnNOS foi capaz de alterar o conteúdo de RNAm da enzima nNOS em cultura celular de glioma. Observou-se redução nos tempos de 4 e 24 horas e, surpreendentemente, aumento no tempo de 48 horas pós-transfecção, fato este incomum para o fenômeno de interferência de RNA.

Os resultados desta estrutura genética sobre o fenótipo de viabilidade celular do glioma mostram caminho promissor no sentido biotecnológico. Considerando-se os severos efeitos colaterais dos quimioterápicos, o problema da resistência das células tumorais à quimioterapia, bem como a agressividade do glioma, a obtenção de efeitos antiproliferativos mediante a associação do siRNA e28_hnNOS com a neomicina pode representar alternativa potencial para obtenção de efeitos antitumorais.

Ensaio futuros de dose-resposta e de toxicidade, preparação de vetores plasmidiais para expressão de shRNA, estruturação destes materiais em nanopartículas e, principalmente, a condução de testes em modelos animais de câncer, são etapas futuras para avaliação da eficácia e potencialidade deste produto tecnológico inovador, o siRNA e28_hnNOS.

ANEXOS

ANEXO I – RESUMOS E CAPÍTULOS PUBLICADOS

i. Trabalho apresentado no 14º congresso da *American Society of Gene and Cell Therapy*, ocorrido em Seattle, WA de 18 a 21 de maio de 2011.

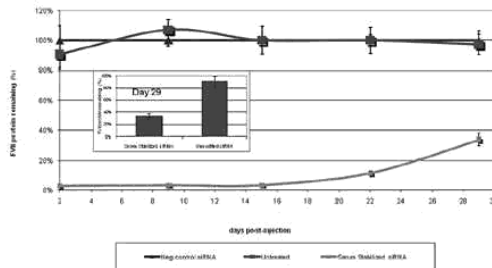


manner of Let-7 mimics was similar with siRNAs. Take together, These results revealed that Let-7s mimics are potential candidates for cancer gene therapy.

849. Effective in vivo silencing for therapeutic application using serum stabilized, non-immunogenic and potent chemically modified siRNAs

Nitin Furi,¹ Chris Burnett,¹ Sasha Vlassov,¹ Angie Cheng,¹ Varun Bagai,¹ Xavier de Mollerat du Jeu,² Kristin Wiederholt,² Susan Magdaleno¹
¹Small RNA R&D, Life Technologies, Austin, TX; ²RNA Delivery R&D, Life Technologies, Carlsbad, CA.

Short interfering RNAs (siRNA) are routinely used in the laboratory to induce targeted gene silencing via RNA interference, and increasingly, this technology is being translated to the clinic. With development of effective delivery systems, the siRNA design also needs to be enhanced for widespread applications. Primary avenues for such enhancements for in vivo applicability are stability against serum nucleases as well as reduction of non-specific effects owing to interaction of the double stranded RNA with the innate immune system. In this abstract, we introduce variety of chemical modifications in siRNAs through altering functional groups on the ribose ring. Such structural modulation of the RNA are shown to positively impact its serum stability as well as make the siRNAs non-immunogenic, without impacting potency. These chemical enhancements in siRNAs are shown to translate into effective in vivo efficacy against multiple organs such as the liver, spleen and pancreas, upon formulation as a lipid nanoparticle. In one example, effective knockdown of chemically modified siRNAs lasts upto 29 days (30% knockdown of the mRNA target compared to negative control in the liver), while the unmodified siRNA shows no knockdown (as compared to the negative control) [figure 1] Chemical modulation of siRNAs is gaining traction in the clinic and is driving siRNAs into therapeutic applications such as cancer and metabolic diseases as well as target validation in vivo.

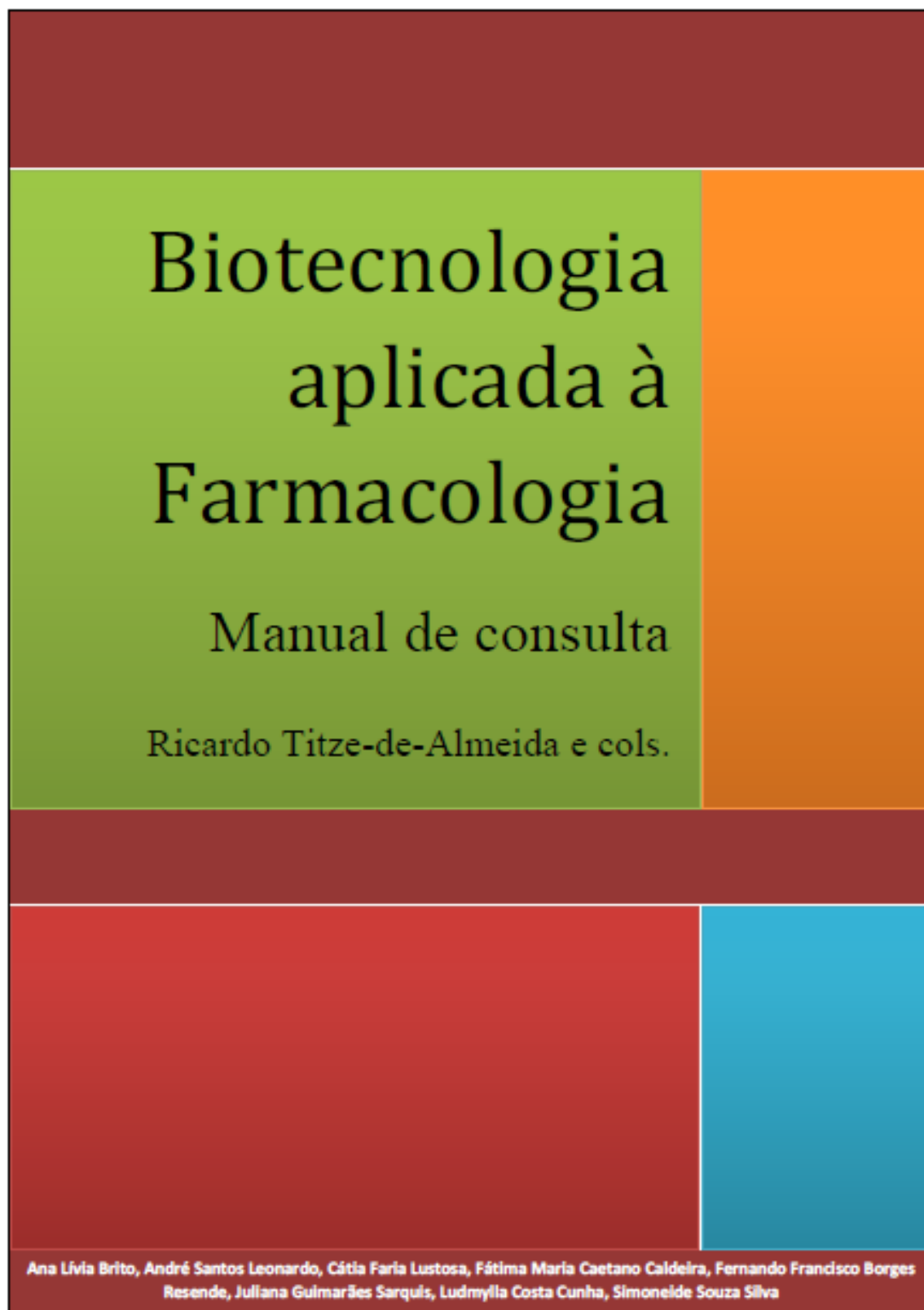


850. RNA Interference Effects on Neuronal Nitric Oxide Synthase Enzyme (nNOS) from Glioma Cells in Culture

Fernando F. B. Resende,¹ Elaine Del Bel,² Luis Pardo,³ Walter Stühmer,³ Ricardo Titze-de-Almeida.¹
¹Lab. Tecnologias para Terapia Gênica, FAV, UNB, University of Brasilia - UnB, Brasilia, Distrito Federal, Brazil; ²Lab. Neurofisiologia e Biologia Molecular, Dept. Morfologia Estomatologia e Fisiologia, FORP, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ³Molecular Biology of Neuronal Signals, Max-Planck-Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany.

The cancer cells overexpress all nitric oxide synthase enzymes during tumor development and metastasis, revealing potential targets for gene therapy. RNA interference (RNAi) techniques commonly produce gene silencing and are useful tools for research or drug development. This study examined whether the RNAi on neuronal nitric oxide synthase enzyme (nNOS) would silence this enzyme in glioma cells (U251MG). We first identified targets for RNAi in the nNOS mRNA sequence using an artificial neuronal network algorithm. The sequence in test here targeted the exon 28 (exon28_nNOS), so it recognized the nNOS splicing variants isoforms alfa, beta, and gama. The glioma cells received 150 pmol of this synthetic double-stranded RNAi (Qiagen) mixed with the transfection agent Lipofectamine® (Invitrogen). The negative control sequence was the commercial scramble All-Star® (Qiagen). The culture media used in this study were Optimen® (Gibco) and DMEM® (Gibco), for the first 6 h and for the remaining 24 h of incubation, respectively. We used commercial kits for RNA extraction (RNeasy Plus MiniKit®, Qiagen) and reverse transcription (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen). To measure the relative expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$) of nNOS, we set up a quantitative PCR protocol with SYBR Green® (Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System). The forward and reverse primers used in our study were, respectively, 5' - GGTGGAGATCAATATCGCGGTT - 3' and 5' - CCGGCAGCGGTAATCTATTCT - 3' for nNOS. For the housekeeping gene β -actin, we used the primers 5' - GACATCCGCAAAGACCTGTACG - 3' and 5' - GCCAGGCAGTGATCTCCTTC - 3'. The PCR mixture contained the following reagents: SYBR Green mix, 5.0 μ L; cDNA, 500 ng; 0.8 μ L of each primer 10 μ M/ μ L; MilliQ water up to 10 μ L. The qPCR conditions were: initial denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of amplification (95 °C for 1 min, 60 °C for 1 min). We tested each sample in triplicate wells in the same plate. Surprisingly, the synthetic RNAi sequence exon28_nNOS produced a relative 1.3 fold increase in the level of nNOS in glioma cells, in comparison to the negative control. This result contrasted with the silencing effects previously found by our group in neuroblastoma cells. In conclusion, we report here an unexpected increase of nNOS expression in glioma cells after an RNAi on exon 28 of this enzyme. The following questions remain to be clarified: where does the interference occur, which nNOS splicing variants are affected, and what are the resulting effects on cell proliferation.

ii. Capítulo sobre cultivo celular no Manual de Consulta de Biotecnologia Aplicada à Farmacologia. Novembro, 2011.



Capítulo 4

CULTIVO CELULAR

A cultura de células é o processo pelo qual as células, sejam procarióticas ou eucarióticas, são cultivadas “*in vitro*” sob condições controladas. Na prática, o termo “cultura de células” é geralmente usado em referência aos cultivos celulares eucariontes multicelulares isolados, especialmente de células animais.

HISTÓRICO

O princípio de toda a técnica de cultivo celular tem origem nos estudos do fisiologista inglês Sydney Ringer desenvolvido em meados do século XIX. Ali foi formulada a solução salina - conhecida até hoje como solução de Ringer, à base de cloreto de sódio, potássio, cálcio e magnésio, na qual foi mantido o coração de um animal batendo fora do corpo durante algum tempo. Em 1885, Wilhelm Roux removeu parte do tecido oriundo de embrião de galinha e o manteve vivo por vários dias em cultura, utilizando para tal uma solução salina morna, estabelecendo assim o princípio da cultura tecidual. Posteriormente, Ross Granville Harrison estabeleceu a metodologia de cultura de tecidos na Escola de Medicina da Johns Hopkins University e depois na Yale University, trabalho publicado em uma série de artigos entre 1908 e 1910.

Técnicas de cultura celular avançadas tiveram grande evolução nas décadas de 40 e 50, como apoio à pesquisa em virologia. O uso de culturas de células para a produção de vírus purificados permitiu a sua utilização na fabricação de vacinas. A vacina Salk contra a pólio foi um dos primeiros produtos produzidos em massa que utilizou técnicas de cultura de células. Esta vacina foi possível graças à investigação de John Franklin Enders, Thomas Weller e Frederick Huckle Chapman Robbins, que foram agraciados com o Prêmio Nobel pela descoberta de um método de cultivo do vírus em culturas de células de rim de macaco.

Tecidas as considerações de natureza histórica, vamos abordar princípios fundamentais para o cultivo de células, o que inclui a obtenção das células, as condições laboratoriais de cultivo em termos de cuidados, infraestrutura e metodologias, bem como as aplicações desta ferramenta de trabalho na pesquisa e no desenvolvimento tecnológico de novos produtos. Conforme vimos no Cap. 1, que trata da expressão de proteínas recombinantes, parte dos produtos comerciais somente podem ser obtidos a partir do cultivo em células de mamífero, como fatores de coagulação, eritropoietina, e vários hormônios (Quadro 1.2). Além desta questão técnica, produtos comerciais recombinantes produzidos em células de mamíferos possuem altíssimo valor agregado, o que torna esta temática também relevante no plano da biotecnologia aplicada à indústria farmacêutica.

ASPECTOS GERAIS SOBRE CULTIVO CELULAR

Como já observamos em outros capítulos deste guia, a precisão nos conceitos é importante também para a temática do cultivo celular. Assim, o Quadro 4.1 apresenta alguns termos comumente empregados no dia-a-dia dos trabalhos com células em cultura.

O termo cultivo tecidual refere-se à cultura de um tecido qualquer, fora de seu organismo original. Por outro lado, cultivo celular está relacionado à manutenção “in vitro” de células individualizadas ou desagregadas de um tecido, sob condições controladas artificialmente. A cultura inicial, proveniente diretamente de um indivíduo, chama-se primária; quando as células são transferidas de um frasco de cultivo a outro, temos o processo conhecido como passagem. Após algumas passagens esse cultivo primário torna-se, então, uma linhagem celular. As linhagens celulares podem ser classificadas como linhagens contínuas, quando as células possuem capacidade “ilimitada” de expansão, ou linhagens celulares finitas, quando as células cultivadas tem determinada vida útil, entrando em senescência após algumas passagens. Para torna-se contínua, a linhagem celular necessita “transformar-se”, ou seja, sofrer uma alteração genética que a permita escapar da senescência, tornando-se “imortalizada”.

Quanto à forma de crescimento, as células irão crescer aderidas a determinadas superfícies, sendo denominadas de aderentes, ou, ao contrário, permanecerão livres, em suspensão. Linhagens de gliomas, HEK e HeLa, são classificadas como aderentes porque crescem fixadas a uma superfície rígida, formando monocamada. Linfócitos, por sua vez, são linhagens que crescem em suspensão, permanecendo dispersos no meio de cultura.

A obtenção da linhagem celular de interesse pode ser feita a partir dos repositórios ou bancos de células, que comercializam, estocam e trocam diferentes tipos celulares. Entre os mais conhecidos estão a *American Type Culture Collection* (ATCC) (<http://www.atcc.org/>) e *European Collection of Cell Culture* (ECACC) (<http://www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp>). Temos também repositórios em nosso País, como o Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (<http://www.bcrj.hucff.ufrj.br/>).

Quadro 4.1 Terminologia relativa à cultura de células

Termo	Definição
Banco de células	Repositores de linhagens celulares e materiais homólogos
Clone	Descendência isolada de uma célula específica
Confluência	Taxa de ocupação da área disponível para crescimento, dentro de uma garrafa de cultivo, por exemplo.
Cultura de célula	Manutenção de células dissociadas em cultura
Cultura de tecidos	Manutenção de determinado tecido em cultura
Cultura Primária	Cultura inicial derivada de material "in vivo"
Imortalização	Habilidade imposta às células que as permitem viver em cultura por tempo indeterminado
Linhagem celular	Subcultura oriunda de um cultivo primário inicial
Linhagem celular contínua	Linhagem imortalizada. Cultura que se estende por tempo indefinido
Linhagem celular finita	Linhagem de células com passagens limitadas. Neste caso, as células irão entrar em senescência ao atingirem certo número máximo de divisões
Passagem	Subcultura de um grupo de células provenientes de um frasco de cultivo
Substrato	Matriz onde as células em cultivo crescem

▪ Cuidado com os microrganismos!

Primeiramente, para o sucesso da cultura de células, o cumprimento das regras e cuidados de asepsia é fundamental, uma vez que cerca de 70% dos problemas que surgem são devidos a contaminações.

▪ Como as células são retiradas dos tecidos ou das garrafas de cultivo?

As células podem ser isoladas dos tecidos para culturas *in vitro* de muitas maneiras. Podem ser facilmente adquiridas a partir do sangue, no entanto, apenas os leucócitos são capazes de crescer em cultura. Células mononucleares podem liberar-se dos tecidos moles por hidrólise enzimática, utilizando-se para tal enzimas como a colagenase, tripsina ou pronase que degradam a matriz extracelular.

Para a desagregação enzimática, a tripsina é a enzima mais usada, uma vez que é bem tolerada pela maioria das células e mostra-se eficaz na maioria dos tecidos. Além disto, a sua atividade residual pode ser neutralizada pelo soro do meio de cultura ou por um inibidor

sintético adicionado. As desvantagens deste método são a possibilidade de lesão celular e a eventual ineficácia em determinados tecidos, particularmente quando apresentam matriz rica em colágeno e fibrina.

A desagregação mecânica é feita por compressão das células contra uma peneira com malha de diâmetro sucessivamente menor, passando as células através de uma seringa e agulha ou simplesmente pipetando repetidamente. Esta técnica tem a vantagem de ser mais rápida do que a dissociação enzimática, embora cause mais lesões mecânicas às células.

▪ **Formas de crescimento celular em cultura: monocamada ou suspensão?**

Conforme citamos anteriormente, a cultura de células pode ocorrer em monocamada ou em suspensão. Na cultura em monocamada, as células vão aderir a um substrato (plástico ou vidro) e se propagam por ele. É o método mais usado, tendo justamente como condição essencial a adesão ao substrato, “ancoragem”. Esta dependência da “ancoragem” é um pré – requisito indispensável à proliferação celular, nesta metodologia. A cultura em suspensão é usada para células que sobrevivem e proliferam sem necessidade de adesão, ou seja, crescem independente da “ancoragem”. É o caso das células hematopoiéticas, das linhas celulares transformadas ou das células derivadas de alguns tumores malignos de órgãos sólidos.

▪ **Quais as condições necessárias para manutenção de células em cultura?**

Para a manutenção das células em cultura é necessário que a incubação ocorra numa atmosfera apropriada e controlada quanto à temperatura, à humidade e à composição da fase gasosa. A maioria requer uma atmosfera pobre em oxigênio, embora variável de acordo com as necessidades específicas das células em causa. A concentração de CO₂, superior à da atmosfera normal, é igualmente fundamental para o sucesso das culturas celulares, sendo frequentemente necessário adicionar este gás à atmosfera em que as células se encontram.

O meio de cultura escolhido é igualmente fundamental e indispensável, uma vez que é este que fornece nutrientes, hormônios, promotores de crescimento e outros substratos essenciais à expressão de funções especializadas das células, sustentando o seu crescimento contínuo. Ensaio com cultura de células devem substituir e reproduzir - o melhor possível - as condições *in vivo*, uma vez que as culturas de células se apresentam como alternativa aos estudos em modelos animais, representando *in vitro* as condições *in vivo*.

Sendo a divisão celular geralmente contínua durante a cultura, é normal a monocamada ocupar toda a área disponível na garrafa de cultivo. Isto pode causar vários problemas: esgotamento de nutrientes no meio, acúmulo de células apoptóticas ou necróticas, inibição da divisão celular por contato (contatos entre as células pode provocar parada do ciclo celular) e diferenciação celular induzida por contatos intracelulares promíscuos. Assim, se faz

necessária a troca constante e cuidadosa dos meios de cultura. Para tanto, deve-se evitar ao máximo os problemas de contaminação por bactérias ou leveduras, que competem por nutrientes e / ou podem infectar e eliminar as células. Assim, toda a manipulação deve ser realizada em uma câmara de fluxo laminar para impedir a entrada de organismos contaminantes. Antibióticos também podem ser adicionados aos meios de cultura. Com as mudanças no meio nutriente é possível renovar e evitar a acumulação de produtos metabólicos potencialmente tóxicos das células mortas. No caso de suspensões de células, as células devem ser separadas por centrifugação do meio e ressuspensas em meio fresco. Em culturas aderentes, o meio pode ser removido diretamente por aspiração e substituído por meio de cultura novo.

▪ **Um método comumente utilizado em cultura de células: passagem celular**

A passagem celular envolve a transferência de um pequeno número de células para uma nova garrafa. As células podem crescer mais se o processo for regular, pois isso evita a senescência prolongada associada com alta densidade celular. Em culturas de suspensão, a passagem é facilmente feita tomando-se uma pequena quantidade da cultura contendo algumas células e diluindo-se em maior volume de meio fresco. Em culturas aderentes, as células inicialmente tem que ser individualizadas, processo comumente realizado com o auxílio de tripsina, embora atualmente existam misturas de outras enzimas para isso. Como citado anteriormente, a tripsina possui a vantagem de ser bem tolerada por quase todos os tipos celulares. O efeito residual é facilmente eliminado por soro fetal bovino e, além disto, tem boa relação custo-benefício. Desta forma, determinado número de células pode ser transferido para cultivo em novo recipiente.

▪ **Aplicações da cultura de células**

O cultivo em massa de linhagens de células animais é essencial para a fabricação de vacinas virais e muitos produtos de biotecnologia. Produtos biológicos produzidos pela tecnologia de DNA recombinante em culturas de células incluem enzimas, hormônios sintéticos, imunobiológicos (anticorpos monoclonais, interleucinas, linfocinas e agentes anticancerígenos), conforme apresentado no Quadro 1.2. Embora muitas proteínas possam ser produzidas por DNA recombinante em culturas de bactérias, as proteínas mais complexas devem ser produzidas em células de animais, como as células CHO e BHK (ver Cap. 1, sistemas de expressão em células de mamífero em cultura).

▪ **Vantagens e desvantagens do trabalho com células em cultura**

Culturas de células têm uma série de vantagens inegáveis, mas também tem desvantagens que devem ser levados em consideração.

▪ Vantagens da pesquisa com células em cultura

- Permite um controle preciso do ambiente. Em uma cultura é possível controlar todos os fatores ambientais: físico-químicos (temperatura, pH, pressão osmótica, os níveis de O₂, CO₂), da tensão superficial e fisiológicos (hormônios, fatores de crescimento, a densidade celular);
- Caracterização e homogeneidade da amostra. Células de linhagem de células cultivadas são homogêneas, com morfologia e composição uniforme. Pode-se facilmente obter um grande número de réplicas idênticas, o que supera a heterogeneidade inerente das amostras associadas com o uso de animais experimentais.
- Economia. Provém economia no uso de reagentes ou drogas.
- A pesquisa biomédica a cada ano provoca o sacrifício de muitos milhares de animais. A cultura celular nem sempre pode substituir o ensaio "in vivo", mas é uma alternativa válida em muitas situações. Permite refinar os estudos ou mesmo reduzir o número de animais utilizados nos ensaios *in-vivo*.

▪ Desvantagens para a cultura de células:

- Técnica sensível. O crescimento de células animais é muito mais lento do que os contaminantes mais comuns (fungos, leveduras, bactérias, micoplasma). Isto implica a necessidade de manter condições de assepsia em todos os momentos. Deve-se ter extremo cuidado quanto ao instrumental e quanto à qualificação de pessoal para a manipulação das células;
- Número e custo. O custo de produção de 1 g de tecido na cultura é mais do que 10 vezes maior do que no animal. Há também uma limitação em termos de quantidade produzida, requerendo-se instalações em plantas industriais de alto custo, para quantidades acima de 100g, por exemplo.
- Instabilidade. Muitas das linhas de células contínuas são instáveis, como resultado de aneuploidia de cromossomos. A composição da população de células pode variar se qualquer uma das subpopulações for capaz de crescer com uma taxa ligeiramente mais elevada, ou seja, podemos encontrar diferenças significativas na linha de células de uma geração para a seguinte. A única maneira de contornar é a utilização de linhas estáveis que são replantadas a partir de um estoque de células congeladas, o que deve ser realizado a cada certo número de gerações.

▪ Quais equipamentos básicos são necessários para o cultivo celular?

Conforme citado anteriormente, a manutenção de um laboratório de cultura de células envolve cuidados rigorosos para manipulação dos cultivos, condições adequadas para crescimento celular e equipamentos auxiliares. Os equipamentos básicos de uma sala de cultivo celular são: 1. Fluxo laminar; 2. Centrífuga; 3. Microscópio invertido; 4. Incubadora/estufa de CO₂; 5. Câmara de Neubauer; 6. Contador de células.

O fluxo laminar é um equipamento necessário para manter condição de isolamento em relação ao ambiente do laboratório, obtido pela geração, como o próprio nome diz, de uma lâmina de ar que impede o acesso de contaminantes ao ambiente interno onde as culturas são manipuladas (Fig. 4.1-1). A centrífuga é utilizada para obtenção de células via centrifugação, durante o procedimento de passagem celular (Fig. 4.1-2). O microscópio invertido é um tipo de microscópio no qual as objetivas situam-se na posição inferior em relação ao material a ser inspecionado, daí o termo “invertido” (Fig. 4.1-3). Permite a visualização das células para análise de sua morfologia, do grau de confluência e de eventuais contaminações com microorganismos. A incubadora ou estufa de CO₂ permite a obtenção de condições necessárias para a sobrevivência e multiplicação das células em cultura (4.1-4). A câmara de Neubauer e o contador de células são utilizados para a quantificação do número de células obtido. Esta determinação permite a contagem correta para novas passagens celulares e, principalmente, para manter homogeneidade numérica entre distintos grupos experimentais submetidos a determinados tratamentos (4.1-5 e 4.1-6).



Figura 4.1 Equipamentos básicos utilizados em uma sala de cultivo celular. 1- Fluxo laminar. 2- Centrífuga. 3- Microscópio invertido. 4- Incubadora/estufa de CO₂. 5- Câmara de Neubauer. 6- Contador de células.

Além dos equipamentos básicos da sala de cultivo, também é necessário o botijão de nitrogênio para armazenamento de células na temperatura correta (Fig. 4.2-1). A correta medição de volumes é importante nestes procedimentos, o que exige micropipetas e suas ponteiros (Fig 4.2-2, 4.2-8), bem como tubos plásticos graduados, comumente referidos como Falcons e tubos eppendorfs de 1,5mL (Fig. 4.2-5, Fig. 4.2-4). Também são utilizados frascos

especiais para cultivo, comumente referidos como garrafas de cultivo que permitem o crescimento das células e a exposição às condições da estufa de CO₂ (Fig. 4.2-6). Finalmente, os pequenos tubos utilizados para armazenamento das linhagens celulares, congeladas em botijão de N₂, os denominados criotubos (Fig. 4.2-3).



Figura 4.2. Equipamentos e plásticos utilizados em cultivo celular. 1- Botijão de Nitrogênio Líquido. 2- Pipetas automáticas. 3- Criotubos. 4- Garrafa de cultivo celular. 5- Tubos tipo Falcon. 6- Pipetadores manuais. 7- Pipetas sorológicas. 8- Ponteiros. Imagens: provém de divulgação comercial.

Procedimentos operacionais padrão aplicados ao cultivo celular

POP 4.1 Plaqueamento / Tripsinização

Materiais necessários

- Tubos tipo Falcon 50mL;
- Meio de cultura (específico para cada tipo celular);
- DPBS;
- Tripsina/EDTA 0,25%;
- Álcool 70%;
- Frascos de cultivo;
- Luvas;
- Pipetas;
- Ponteiras;
- Tubos tipo eppendorffs;
- Tripán blue;
- Câmara de Neubauer.

Procedimentos

- Desinfecção geral – limpar todos os materiais e equipamentos com álcool 70%;
- Verter o meio antigo para um Falcon e reservar;
- Lavar as células com 3,0mL de DPBS e depois verter a solução salina para o mesmo Falcon contendo o meio de cultura antigo, reservar;
- Tripsinizar com 2,0mL de Tripsina/EDTA e homogeneizar, incubar por 3 minutos a 37°C;
- Observar, no microscópio invertido, se as células se soltaram, caso necessário, bater levemente o frasco de cultivo na bancada para auxiliar a individualização celular. Essa etapa deve ser feita o mais rápido possível para evitar lesões às células;
- Verter à garrafa de cultivo o meio de cultura antigo com DPBS da lavagem e misturar bem, depois devolver toda a solução para o Falcon e seguir para o próximo passo;
- Centrifugar por 3 minutos, utilizando 1200 RPM;
- Desprezar o sobrenadante;
- Diluir o pellet formado em 1,0mL de DPBS;
- Contar as células da seguinte forma:

- pipetar 30uL da solução de DPBS contendo as células e misturar com 90uL de solução de azul de tripan;

- preencher a câmara de Neubauer com 10uL da solução anterior e contar as células (não coradas pelo azul de tripan) em cada quadrante externo e usar a fórmula:

Total de células $\times 10^4$. A fórmula apresenta a quantidade de células presente em 1,0mL da solução.

- Para o plaqueamento, utilizar uma nova garrafa contendo meio fresco (5,0mL para garrafas de 25cm³ e 20,0mL para garrafas de 75cm³);
- Adicionar a quantidade desejada de células e homogeneizar;
- Adicionar 1% de solução antibiótica/antimicótica e homogeneizar novamente;
- Incubar a 37°C e 5% de CO₂.

POP 4.2 Criopreservação celular

Materiais necessários

- Criotubos;
- DMSO;
- Soro fetal bovino – FBS filtrado;
- DMEM;
- DPBS.

Procedimentos

- Realizar a tripsinização e contagem das células, conforme o POP 4.1.
- Preparar solução crioprotetora utilizando as seguintes concentrações:
 - 500 uL de DMEM;
 - 200 uL de FBS;
 - 100 uL de DMSO;
 - 200 uL de DPBS contendo aproximadamente 200.000 células.
- Identificar os tubos com nome da linhagem, data e responsável;
- Encaminhar ao freezer -70°C por 24 horas;
- Mover para o tanque de nitrogênio líquido.

POP 4.3 Descongelamento de células

Materiais necessários

- Criotubos contendo as células congeladas;

- Banho maria;
- Meio de cultura próprio;
- Pipetas;
- Ponteiras;
- Frascos de cultivo.

Procedimentos

- Aquecer as células rapidamente em banho maria à 37°C;
- Acrescentar 10mL de meio (pré-aquecido a 37°C) em uma garrafa de cultivo de 75cm³;
- Misturar as células recém-descongeladas para a garrafa de cultivo e misturar bem;
- Visualizar o aspecto morfológico das células, utilizando o microscópio invertido. O ideal é que as células estejam com citoplasma preservado, refringente e arredondado;
- Caso esteja tudo certo, acrescentar mais 10mL de meio pré-aquecido na garrafa e incubar a 37°C e 5% de CO₂;
- Se necessário, acrescentar 1% de solução antibiótica/antimicótica no meio de cultura;
- As células necessitam de tempo para total recuperação do congelamento e efeitos tóxicos do DMSO, portanto o meio deve ser trocado a cada três dias, como maneira de ajudar no processo de crescimento celular.

BIBLIOGRAFIA

Alberts, B. et al. Some Landmarks in the Development of Tissue and Cell Culture. Molecular Biology of the Cell, 2002.

ATCC Technical Bulletin no. 4 Guide to subculturing cell line monolayers. Disponível no endereço eletrônico <http://www.atcc.org/Portals/1/Pdf/tb04.pdf>.

Chaudry, A. [Cell Culture](#). The Science Creative Quarterly, 2004. Disponível no endereço eletrônico <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>.

Cruz, M.; Enes, M.; Pereira, M.; Dourado, M. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. Revista Portuguesa de Pneumologia. V.9,N.4, 2009.

Freshney, R.I. Culture of animal cells – A manual of basic technique. 4th edition. New York: Wiley Liss, 2000.

Jacoby WB, Pasten IH (eds.). Monolayer culture techniques. In: Methods in Enzymology: Cell Culture. Vol. 58. New York: Academic Press, 1979.

Langdon S. P. Basic Principles of Cancer Cell Culture. Methods Mol Med 88:3-15, 2004.

ANEXO II – PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO - POP

i. POP 43.1 – Procedimentos para Manutenção Celular – Plaqueamento

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

1/2

Usuário: _____, Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

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

PROCEDIMENTOS

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

Comentários:

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

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

1/2

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

FIM.

Comentários:

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

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

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

1/1

Usuário: _____ . Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

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

PROCEDIMENTOS

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

OBJETIVOS

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

CUIDADOS

- Contaminação
 - Morte celular
 - Crescimento excessivo
-

FIM.

Comentários:

iii. POP 43.4 – Criopreservação Celular

Criopreservação Celular Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	43.4

1/2

Usuário: _____, Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

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

PROCEDIMENTOS

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

FIM.

Comentários:

iv. POP 43.5 – Descongelamento de Células

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

1/1

Usuário: _____, Data: ____ / ____ / ____

MATERIAIS

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

PROCEDIMENTOS

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

FIM.

Comentários:

v. POP 44 – Transfecção Celular

Transfecção celular Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica	POP
	44

1/2

Usuário: _____ . Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

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

PROCEDIMENTOS

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

Comentários:

Transfecção celular

Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica

POP

44

2/2

4. Preparação dos meios celulares e transfecções

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

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

FIM.

Comentários:

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

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

1/2

Usuário: _____ . Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

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

PROCEDIMENTOS

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

Comentários:

vii. POP 48 – Transcrição Reversa – Max Planck

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

1/2

Usuário: _____ . Data: ____ / ____ / _____

MATERIAIS

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

PROCEDIMENTOS

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

Comentários:

Transcrição Reversa – Max Planck

Lab. de Tecnologias para Terapia Gênica

POP

48

2/2

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

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

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

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

FIM.

Comentários:

ANEXO III - ANÁLISE DE SIMILARIDADE ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE NNOS NM_000620.4 (REFERÊNCIA), U17327.1 (FONTE ORIGINALMENTE DEPOSITADA) E CCDS41842.1 (CONSENSO PARA A REGIÃO CODANTE)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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