

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

NAYARA DELGADO ANDRÉ

**Silenciamento dos Genes da PKR e do Receptor de Quimiocina CXCR4 através
de RNA de Interferência: Efeitos sobre o Crescimento Tumoral e o Potencial
Metastático das Células de Melanoma B16-F10**

Ribeirão Preto
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

NAYARA DELGADO ANDRÉ

**Silenciamento dos Genes da PKR e do Receptor de Quimiocina CXCR4 através
de RNA de Interferência: Efeitos sobre o Crescimento Tumoral e o Potencial
Metastático das Células de Melanoma B16-F10**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Luiz De Lucca

Ribeirão Preto
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nayara Delgado André

Silenciamento dos Genes da PKR e do Receptor de Quimiocina CXCR4 através de RNA de Interferência: Efeitos sobre o Crescimento Tumoral e o Potencial Metastático das Células de Melanoma B16-F10

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica

Aprovada em: 11 de fevereiro de 2008.

Banca Examinadora

Prof.a. Dra. Ester Silveira Ramos

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando Luiz De Lucca

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Assinatura: _____

Prof.a. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes

Instituição: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

Assinatura: _____

Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Instituição: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta tese, parte tão importante de um grande sonho, aos meus amados pais, André e Lenita, minhas irmãs, Karina e Larissa, meus avós José Delgado e Isaura e ao meu marido, eterno companheiro e amor, Cesare Alexandre, pessoas tão singulares que estiveram sempre presentes e torceram muito para a realização deste trabalho.

Agradecimientos

*A **Deus**, que tornou tudo isso possível. Que sempre esteve ao meu lado durante toda minha vida me iluminando e me dando sabedoria para fazer as escolhas corretas. Que me deu força nos momentos de indecisão, angústia e insegurança, mostrando-me tantas, tantas vezes que tudo é possível quando realmente queremos e acreditamos. “O coração do homem traça o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos” (Pv. 16:9).*

*À **Nossa Sra. de Fátima**, minha mãe, que está sempre comigo, guiando e iluminando meu caminho.*

*Aos meus pais, **André e Lenita**...O que dizer de vocês?*

São duas jóias raras que Deus colocou na minha vida e que tudo fizeram e fazem para meu crescimento pessoal e profissional. Estiveram sempre ao meu lado, tomaram meus sonhos por seus, me incentivando a cada curva, cada obstáculo que surgia no caminho. Mais não podiam fazer!!!!

Sem vocês, eu nada seria!!!

*Às minhas irmãs, **Karina e Larissa**. Vocês são duas pedrinhas preciosas que o Papai do Céu me deu. Juntas crescemos e aprendemos a lutar pelos nossos ideais. Tenho certeza que continuaremos sempre unidas para comemorarmos nossas conquistas!!! AMO VOCÊS!!!!*

*Ao meu marido, meu grande amor, **Cesare Alexandre**, que esteve comigo desde a infância dos meus sonhos, que os viu nascer, crescer e ganhar força a cada dia. Obrigada por seu amor, companheirismo, apoio, incentivo, paciência, quanta paciência....Obrigada por ter estado sempre ao meu lado, me ajudando a subir cada degrau deste longo caminho, mesmo que isso significasse ter que adiar um pouco os seus sonhos...Sem você esse momento não seria tão especial...*

*Aos meus avós, **José Delgado e Isaura**....como é difícil falar de vocês...*

Meus padrinhos tão amados com quem passei momentos lindos desde pequenina e que realmente foram meus segundos pais. A vocês, que sempre acreditaram em mim, que vibraram junto à cada passo dado, cada degrau subido, cada tijolinho que eu ia colocando na minha vida. Tenho certeza vó, que onde quer que o senhor esteja, continua ao meu lado, torcendo e mais que nunca, guiando os meus passos!!!! AMO VOCÊS!!!

*Aos meus tios, **Célia Regina** (in memorian), **Andréa, Leonardo e Renato**, grandes exemplos de família, trabalho, persistência e dedicação. Muito obrigada pela torcida, apoio e incentivo.*

*Ao meu orientador, **Dr. Fernando Luiz De Lucca...** As palavras ficam pequenas para dizer o quanto sou grata ao senhor. Orientador, amigo, mestre e até terapeuta... Sempre pronto a me apoiar e indicar o melhor caminho. O senhor que abriu as portas da sua segunda casa e confiou em mim parte dos seus sonhos quando ainda tão pouco me conhecia. Um exemplo de pessoa, que me ensinou a ser forte, não desanimar diante das dificuldades ou resultados negativos, me mostrando que são nesses momentos que aprendemos, crescemos e amadurecemos. Quanta paciência com uma aluna tão ansiosa, mas que está aprendendo que tudo tem o seu tempo e o seu porquê... Ao senhor, meu **MUITO OBRIGADA** e minha eterna admiração.*

*À **Maria Angélica Ehara Watanabe**, minha orientadora de iniciação científica, um grande exemplo de pessoa e profissional. Você apareceu na minha vida no momento em que eu mais precisava. Depois de tanta insistência acreditou no meu sonho e abriu as portas do seu laboratório sempre tão procurado. Obrigada por me fazer crescer, amadurecer e chegar até aqui.*

*À **Thais Amaral e Souza**, com quem compartilhei grande parte do meu doutorado. Uma goianinha inicialmente tímida que entrou para a família e veio trazer toda sua alegria, sinceridade, amizade e seu jeito moleca de ser. Você trouxe um colorido especial para todos nós que convivemos com você.*

*À **Viviane Aline Oliveira e Silva**, um grande presente enviado ao laboratório. Você é a pequenininha mais meiga, amiga, companheira, dedicada e leal que conheci. Queria dizer que você me ensinou muito durante todo esse tempo que permanecemos juntas. Me ensinou que a simplicidade, a amizade e as coisas feitas de coração não têm preço!!!!*

*À **Cacilda Dias Pereira**, um anjo que encontrei durante esta fase da minha vida, que cuidou de mim com tanto carinho e dedicação. Acompanhou de tão perto todo meu crescimento e me ajudou **MUITO** com os experimentos, principalmente com os animais. Me ensinou a simplicidade das coisas e que nunca, nunca devemos deixar de acreditar que tudo o que queremos é possível. A você, meu muito obrigada.*

*À **Zuleica Aparecida de Moraes** por todo apoio e ajuda nesses quatro anos de doutorado. Por ter estado sempre presente e pronta a qualquer coisa que eu precisasse, sempre dando o seu melhor. Quantos géis nós corremos, não Zu? E pode ter certeza que sua mão deu um toque todo especial !!!*

À **Maria Emília Soares Martins dos Santos**, minha grande amiga e irmã. Nos conhecemos no dia da seleção e logo a afinidade, ansiedade e tantos sonhos em comum nos uniu. Nunca acreditei ser possível existir uma pessoa tão parecida até você ter surgido no meu caminho. Muito obrigada pelo apoio e amizade sincera durante nossa caminhada. Você é um de tantos motivos que posso dizer que tudo valeu a pena !!!

À **Andressa de Freitas**, grande amiga que conheci na faculdade e com quem convivi diariamente durante esses 4 anos. Pois é mocinha...Buscamos juntas e juntas conseguimos realizar esse grande sonho de chegar até aqui. Muito obrigada por TODOS os momentos vivenciados.

À **Fernanda Lopes Menini**, com quem tive o grande prazer de conviver durante os dois primeiros anos da tese. Uma grande amiga, parceira de grupo e tantos seminários...Você foi muito importante nessa nova fase da minha vida e tenho certeza que aprendemos muito juntas ao longo dessa caminhada.

A **Andressa Rodrigues de Souza**, amiga tão querida e especial em quem encontrei tantas semelhanças, tantos sonhos em comum. Tenho certeza que muito em breve conseguiremos torná-los realidade !!!

À **Rosana Inácio dos Reis**, pela preciosa ajuda nos protocolos de transfecção no começo do meu projeto e por todos os seus toques que sempre acrescentaram muito ao meu trabalho.

Às amigas **Larissa, Valéria, Amanda, Danúbia, Fabiana, Patrícia, Mariana e Andréia**...foi muito bom ter conhecido e convivido com vocês.

Aos **amigos do Departamento de Bioquímica e Imunologia** pelo convívio e amizade.

Aos **professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia** pelos ensinamentos dispensados durante toda a minha formação.

Aos **professores Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, Dra. Ester Ramos de Oliveira, Dr. Tone Luiz Gonzada e Dra. Iscia Terezinha Lopes Cendes** pelos comentários e sugestões imprescindíveis que contribuíram muito para a melhoria deste trabalho.

*Aos funcionários da secretaria, **Maria Ivone Campos Fonseca, Lúcia Yaeko Shimada, Maria Tereza Rodrigues (Teia) e Ronaldo Sordi Campanini**, sempre prontos a nos socorrer a qualquer hora.*

*Ao **Vitor Dias Galban** que tanto me ajudou durante esses anos. Os corriqueiros problemas tão freqüentes do computador, o help com as figuras submetidas, as animações indisponíveis para download.....Parece que tudo ficava tão simples diante dos seus comandos!!! À você, meu muito obrigada!!!*

*À **Ana Kátia dos Santos** pela grande atenção e preciosa ajuda nas injeções retro-orbitais. Pode ter certeza que sua mãozinha deu um brilho especial aos nossos resultados.*

*Aos funcionários **José Antônio da Silva (Marrom), Carlos Alberto Vieira (Beto) e Sílvia Regina Andrade (Silvinha), Fabíola Leslie Antunes Cardoso Mestriner** pelo auxílio técnico em várias fases do desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos funcionários do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, **Júlio Anselmo Siqueira, Cristiana Carolina P. Ribas e Rúbens Salomão de Campos** pela responsabilidade, dedicação e qualidade dos animais.*

*À Sra. **Catherine David** pelas amostras de jetPEIT™ gentilmente cedidas (Polyplus, Illkirch, França).*

*À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da minha bolsa de doutorado e à **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho (Proc. 06/57963-1)*

*E finalmente, à minha grande amiga, **Zezé**, pessoa tão especial e iluminada, que me ajudou a dar CADA passo deste grande e desafiador caminho!!!!*

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram acrescentando seu toque especial.

A todos vocês, meu muito obrigada!

“È impossível ser feliz sozinho. Se formos o vencedor, para que nossa vitória tenha graça, é preciso que a compartilhemos, no mínimo, com uma pessoa. Senão, a vitória não tem sentido”.

“O mundo está nas mãos daqueles que têm coragem de sonhar e correr o risco de viver os seus sonhos”.

Paulo Coelho

“Se podemos sonhar, também podemos tornar nossos sonhos realidade”.

Walt Disney

“Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável”.

Galileu Galilei

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”.

Paulo Freire

Resumo

RESUMO

Delgado André, N. **Silenciamento dos Genes da PKR e do Receptor de Quimiocina CXCR4 através de RNA de Interferência: Efeitos sobre o Crescimento Tumoral e o Potencial Metastático das Células de Melanoma B16-F10.** 2008, 166 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O presente estudo utilizou a tecnologia do RNA de interferência (RNAi) no modelo de melanoma murino com o objetivo de investigar o papel da proteína quinase dependente de RNA (PKR) e do receptor de quimiocina CXCR4 sobre o crescimento tumoral e o potencial metastático das células de melanoma B16-F10. O RNAi tem sido utilizado, nos últimos anos, como uma importante ferramenta na elucidação da função gênica em células de mamíferos. O RNAi induz o silenciamento gênico pós-transcricional, o qual é seqüência específico e mediado por um RNA de dupla fita (dsRNA) de seqüência homóloga à do RNAm alvo. As moléculas longas de dsRNA são processadas pela enzima Dicer, resultando na produção de siRNAs (*small interfering RNAs*). O silenciamento gênico em células de mamíferos tem sido obtido através da transfecção com siRNAs sintéticos ou com auxílio de vetores de expressão, cujos promotores são reconhecidos pela RNA polimerase III, resultando na síntese de *short hairpin RNAs* (shRNAs), os quais produzem siRNAs pela ação da Dicer. Estudos sobre a participação da PKR no controle da proliferação celular sugerem que a PKR atua como supressor de tumor. Entretanto, os resultados obtidos com animais transgênicos não confirmaram esta hipótese, verificando-se ainda que ocorre um aumento da expressão e atividade da PKR em vários tipos de tumores humanos. Portanto, a participação da PKR no controle da proliferação celular é ainda um problema aberto à investigação. As células de melanoma expressam um elevado nível do RNAm do receptor de quimiocina CXCR4 em relação aos melanócitos normais e o seu ligante SDF-1 α também está elevado nos pulmões, o que explicaria a freqüência alta de metástase pulmonar. Por outro lado, o papel desempenhado pelo receptor CXCR4 no melanoma murino não foi ainda investigado. Neste trabalho, o silenciamento dos genes da PKR e do receptor CXCR4 foi realizado através da transfecção das células de melanoma B16-F10 com o plasmídeo psiSTRIKE (Promega), o qual expressa os shRNAs anti-PKR ou anti-CXCR4. Na primeira etapa deste trabalho foi possível

demonstrar *in vitro*, através das técnicas de RT-PCR semi-quantitativo e Western Blot, uma redução significativa da expressão do RNAm da PKR (98%) e do CXCR4 (81%) após 48 horas da transfecção das células de melanoma B16-F10. A seqüência do shRNA controle não está presente no genoma de camundongo. Com relação aos efeitos *in vivo*, verificou-se uma redução significativa do peso tumoral nos camundongos que receberam uma injeção subcutânea de células B16-F10 transfectadas com os plasmídeos anti-PKR (86%) ou anti-CXCR4 (66%). A administração intratumoral destes plasmídeos foi também eficaz em reduzir significativamente o desenvolvimento tumoral tanto no caso do plasmídeo anti-PKR (82%) como com o plasmídeo anti-CXCR4 (70%). Com o objetivo de se estudar a participação da PKR e do receptor CXCR4 no desenvolvimento de metástase experimental, as células de melanoma B16-F10 transfectadas com plasmídeos anti-PKR ou anti-CXCR4 foram inoculadas via endovenosa e a colonização pulmonar avaliada no 21^o dia. Os resultados mostraram uma redução dramática do número de nódulos pulmonares metastáticos quando as células tumorais injetadas foram previamente transfectadas com o plasmídeo anti-PKR (95%) ou plasmídeo anti-CXCR4 (94%). Os nossos dados sugerem ainda que os efeitos da PKR no melanoma murino são mediados pelo fator de transcrição NF- κ B. Em resumo, o presente estudo revelou que a redução transitória da expressão da PKR e do receptor CXCR4 foi capaz de inibir tanto o crescimento do melanoma B16 como também a formação de nódulos pulmonares metastáticos. Portanto, os nossos resultados não suportam o conceito de que a PKR atua como supressor de tumor e sugerem que a PKR desempenha um papel crítico na fase inicial do desenvolvimento tumoral e na formação de metátases. Assim, os genes da PKR e do receptor CXCR4 seriam alvos potenciais para o tratamento de câncer com a tecnologia do RNAi, especialmente em tumores que apresentam um aumento da expressão da PKR e do receptor CXCR4 e um elevado potencial metastático como observado nos casos de melanoma humano e de câncer de mama.

Palavras-chave: melanoma B16, PKR, receptor de quimiocina CXCR4, metástase, câncer

Abstract

ABSTRACT

Delgado André, N. **Knockdown of PKR and the chemokine receptor CXCR4 genes by RNA interference: effects on the tumor growth and the metastatic potential of B16-F10 melanoma cells.** 2008, 166 f. Doctorate Thesis – School of Medicine University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The present study used the technology of RNA interference (RNAi) in the model of murine melanoma to investigate the role played by the RNA-dependent protein kinase (PKR) and the receptor of chemokine CXCR4 in the tumor growth and the metastatic potential of the B16-F10 melanoma cells. In the last years, RNAi has been used as an important tool to elucidate the function of genes in mammalian cells. RNAi induces gene silencing in a sequence specific manner and this phenomenon is mediated by a double-stranded RNA (dsRNA) which has complementarity with the mRNA target. Long dsRNA molecules are processed by the enzyme Dicer, producing *small interfering* RNAs (siRNAs). The gene silencing in mammalian cells has been achieved by transfection with synthetic siRNAs or with vectors of expression containing promoters that are recognized by RNA polymerase III and producing *short hairpin* RNAs (shRNAs) which are processed by Dicer resulting in the production of siRNAs. Studies on the role played by PKR in the control of cellular proliferation suggest that PKR acts as a tumor suppressor. However, results with transgenic animals do not confirm this hypothesis and it was described the increase of the expression and activity of PKR in many human tumors. Therefore, the role played by PKR in the control of cellular proliferation is still controversial. Melanoma cells express a high level of the chemokine receptor CXCR4 when compared with non-transformed melanocytes and its ligand SDF-1 α is also increased in lungs which would explain the high frequency of pulmonary metastasis. On the other hand, the role played by the CXCR4 receptor was not still investigated in murine melanoma. In this work, the knockdown of the expression of PKR and the CXCR4 receptor was performed by transfection of B16-F10 melanoma cells with the psiSTRIKE plasmid (Promega) which express the anti-PKR shRNA or anti-CXCR4 shRNA. In the first step of this work it was possible to demonstrate a significant reduction *in vitro* of the expression of PKR mRNA (98%) and CXCR4 mRNA (81%) after 48 hours of transfection of B16-F10 melanoma cells by using the semi-quantitative RT-PCR and

Western blot. The sequence of the shRNA used as control is not present in the mouse genome. The results obtained *in vivo* indicated a significant reduction of the tumor weight only in mouse that had received a subcutaneous injection of the B16-F10 melanoma cells transfected with the plasmids anti-PKR (86%) or anti-CXCR4 (66%). The intratumoral injection of these plasmids was also effective in reducing the melanoma growth in the case either of the anti-PKR plasmid (82%) or the anti-CXCR4 (70%). To investigate the role played by PKR and the receptor CXCR4 in our experimental model of metastasis, the B16-F10 melanoma cells transfected with the plasmids anti-PKR or anti-CXCR4 were injected intravenous and the pulmonary colonization was evaluated on 21 day. The results showed a dramatic reduction of the number of pulmonary metastatic nodules when the tumor cells were previously transfected with the plasmids anti-PKR (95%) or anti-CXCR4 (94%). Our findings also suggest that effects of PKR in the murine melanoma are mediated by the transcription factor NF- κ B. In summary, the present study indicates that a transient reduction of the expression of PKR and CXCR4 was effective in inhibiting the B16 melanoma growth and the formation of metastatic pulmonary nodules. Therefore, our results do not support the concept that PKR acts as a tumor suppressor and suggest that PKR plays a critical role in the initial steps of tumor growth and in of metastasis. Thus, the genes of PKR and CXCR4 may be potential targets for the treatment of cancer with the technology of RNAi, especially in tumors that show an increase of the expression of PKR and the receptor CXCR4 and a high metastatic potential as observed in the case of the human melanoma and the breast cancer.

Keywords: B16 melanoma, PKR, receptor CXCR4, metastasis, cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura A-	Estrutura do receptor de quimiocina CXCR4, indicando os domínios extracelulares, intracelulares e transmembrana.....	34
Figura B-	Influência dos receptores de quimiocinas na metástase de câncer de mama.....	35
Figura C-	Estrutura dos domínios regulatórios e catalíticos da PKR.....	40
Figura D-	Mecanismo de ativação da PKR pelos RNAs sintéticos, virais ou celulares.....	41
Figura E-	Mecanismo de ação do RNA de interferência.....	55
Figura 1-	Integridade das amostras de RNA obtido de células de melanoma B16-F10.....	86
Figura 2-	Expressão dos genes da PKR e CXCR4 em células de melanoma B16-F10 através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo.....	86
Figura 3-	Controle da ligação dos shRNAs no vetor psiSTRIKE através da digestão do DNA plasmidial.	87
Figura 4-	Integridade das amostras de RNA obtidos das células de melanoma B16-F10 transfectadas.....	88
Figura 5-	Redução da expressão do RNAm da PKR em células de melanoma B16-F10 após 5 horas de transfecção.....	90
Figura 6-	Redução da expressão do RNAm da PKR em células de melanoma B16-F10 após 24 horas de transfecção.....	91
Figura 7-	Redução da expressão do RNAm da PKR em células de melanoma B16-F10 após 48 horas de transfecção.....	92
Figura 8-	Nível da proteína PKR nas células melanoma B16-F10 transfectadas com o vetor shRNA anti-PKR-2.....	94
Figura 9-	Efeito da transfecção das células de melanoma B16-F10 com o plasmídeo shRNA PKR-2 sobre o desenvolvimento tumoral.....	95

Figura 10-	Efeito da injeção intratumoral do plasmídeo psiSTRIKE shRNA PKR-2 sobre o desenvolvimento do tumor subcutâneo em camundongos C57BL/6.....	96
Figura 11-	Efeito da transfecção das células de melanoma B16-F10 com o plasmídeo shRNA anti-PKR-2 sobre o seu potencial metastático pulmonar em camundongos C57BL/6.....	98
Figura 12-	Níveis da PKR ativada (fosforilada) e do I- κ B β em células de melanoma B16-F10 transfectadas com plasmídeo shRNA anti-PKR-2.....	99
Figura 13-	Redução da expressão do RNAm do CXCR4 em células de melanoma B16-F10 após 5 horas de transfecção.....	101
Figura 14-	Redução da expressão do RNAm do CXCR4 em células de melanoma B16-F10 após 24 horas de transfecção.....	102
Figura 15-	Redução da expressão do RNAm do CXCR4 em células de melanoma B16-F10 após 48 horas de transfecção.....	103
Figura 16-	Nível da proteína CXCR4 nas células melanoma B16-F10 transfectadas com o vetor shRNA anti-CXCR4-1.....	105
Figura 17-	Efeito da transfecção das células B16-F10 com o plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 sobre o desenvolvimento do tumor subcutâneo em camundongos C57BL/6.....	107
Figura 18-	Efeito da injeção intratumoral do plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 sobre o desenvolvimento do tumor subcutâneo em camundongos C57BL/6.....	108
Figura 19-	Efeito da transfecção das células B16-F10 com o plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 sobre o seu potencial metastático em camundongos C57BL/6.....	109
Figura 20-	Efeito da administração endovenosa do plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 sobre o número de nódulos pulmonares em camundongos C57BL/6.....	111
Figura 21-	Diagrama de possíveis eventos moleculares envolvidos na redução dos nódulos pulmonares metastáticos em camundongos injetados com células de melanoma B16-F10 transfectadas com plasmídeo psiSTRIKE expressando shRNA específico para PKR.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Protocolo da reação de ligação do shRNA ao vetor psiSTRIKE.....	69
Tabela 2-	Protocolo da reação de digestão do DNA plasmidial.....	70
Tabela 3-	Composição da Solução da amostra.....	73
Tabela 4-	Composição do Tampão de Aplicação da amostra.....	73
Tabela 5-	Composição do Tampão MOPS 5X (pH7)	74
Tabela 6-	Composição da Solução A do método de Lowry.....	77
Tabela 7-	Composição da Solução A do método de Cadman.....	78
Tabela 8-	Protocolo utilizado no preparo do Gel de Empilhamento.....	79
Tabela 9-	Protocolo utilizado no preparo do Gel de Separação (10%- com SDS).....	79
Tabela 10-	Composição do Tampão de Transferência.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BIS	N-N' –metileno-bis-acrilamida
C	Cisteína
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CCR10	Receptor 10 de quimiocina da família CC
CCR7	Receptor 7 de quimiocina da família CC
CC	Cisteína- Cisteína
CXC	Cisteína- X aminoácido- Cisteína
CXXXC	Cisteína- XXX aminoácido- Cisteína
CXCR	Receptor de quimiocina família CXC
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRBD	Domínio de ligação ao RNA de dupla fita
dsRNA	Ácido ribonucléico de dupla fita
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eIF-2 α	Fator de iniciação de transcrição eIF-2 α
g	Constante gravitacional
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HEPES	Ácido sulfônico hidroxietil piperazina
HRI	Quinase heme-regulada
HSV	Vírus herpes simples

IFN	Interferon
I- κ B	Inibidor de NF- κ B
IKK	I κ B-kinase
IL	Interleucina
IRF-1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Quilo Dalton
LB	Meio Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Mol/L
v/v	Porcentagem volume/volume
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
Met-tRNA	RNA de transferência da metionina
mg	Miligrama
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
Mig	Monocina induzida por interferon gama
miRNA	Micro-RNA
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MMPs	Metaloproteinases
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
Myc	<i>Myelocytomatosis viral oncogene</i>

NaCl	Cloreto de sódio
ncRNAs	RNAs não codificadores de proteínas
NF- κ B	Fator nuclear κ appa B
nt	Nucleotídeo
nm	Nanômetro
ORF	<i>Open read frame</i>
PAZ	<i>Piwi, argonaute e zwillie</i>
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
pEGFP	<i>Green fluorescent protein plasmid</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PERK	Proteína quinase do retículo endoplasmático
PKR	Proteína quinase dependente de RNA
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	<i>Phenylmethanesulphonylfluoride</i>
Poli(I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PM	Peso molecular
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RAS	Proteína regulada e secretada (oncogene)
RHD	Domínio de homologia rel
RhoA	<i>ras homolog gene family, member A</i>
RISC	Complexo de silenciamento gênico induzido por RNA
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência

RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA _t	RNA de transferência
rpm	Rotações por minuto
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDF	Fator derivado do estroma (CXCL12)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNAs	<i>Small interfering RNAs</i>
STAT	<i>Transducer and activator of transcription</i>
TBE	Tampão Tris, Acido bórico, EDTA
TEMED	N,N,N',N',tetrametilenodiamina
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TRIS	Tris- (hidroximetil)-aminometano
V	Volts
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
UTR	<i>Untranslated region</i>
VV	Vírus Vaccinia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	28
1.1 Considerações básicas sobre melanoma.....	30
1.2 Quimiocinas e progressão neoplásica.....	33
1.2.1 Receptores de quimiocinas e melanoma.....	35
1.3 Proteína quinase dependente de RNA.....	37
1.4 RNAs reguladores.....	47
1.5 RNA de Interferência.....	51
2. OBJETIVOS.....	61
2.1 Objetivo Geral.....	62
2.2 Objetivos Específicos.....	62
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.1 Cultura de células de melanoma B16-F10.....	65
3.2 Análise da viabilidade celular.....	65
3.3 Delineamento do shRNA (<i>short hairpin</i> RNA)	66
3.4 Preparo de células competentes.....	68
3.5 Pareamento dos oligonucleotídeos.....	68
3.6 Clonagem.....	69
3.7 Extração de DNA plasmidial.....	70
3.8 Digestão de DNA plasmidial.....	70
3.9 Preparo do complexo lipofectamina-shRNA.....	71
3.10 Transfecção de células de melanoma B16-F10.....	71
3.11 Extração de RNA.....	72
3.12 Dosagem de RNA.....	72

3.13 Eletroforese de RNA.....	73
3.14 Reação de transcrição reversa.....	74
3.15 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	75
3.16 Eletroforese de DNA.....	76
3.17 Obtenção de extrato de células de melanoma B16-F10.....	76
3.18 Solubilização de proteína transmembrana.....	76
3.19 Dosagem de proteína.....	77
3.20 Eletroforese de proteína.....	78
3.21 Transferência.....	79
3.22 Imunodeteção da PKR total, PKR fosforilada (PKR-P), I- κ B β e CXCR4.....	80
3.23 Imunodeteção da β -actina.....	81
3.24 Animais.....	81
3.25 Modelo de tumor subcutâneo.....	81
3.26 Injeção intratumoral dos plasmídeos shRNA anti-PKR e shRNA anti-CXCR4.....	82
3.27 Modelo de Colonização Pulmonar.....	82
3.28 Administração endovenosa do plasmídeo shRNA anti-CXCR4	82
3.29 Análise Estatística.....	83
4. RESULTADOS.....	84
4.1 Identificação da PKR e do CXCR4 em células de melanoma B16-F10.....	85
4.2 Extração de DNA plasmidial.....	87
4.3 Transfecção de células de melanoma B16-F10.....	88

4.4	Análise do silenciamento gênico da PKR por RT-PCR semi-quantitativo.....	89
4.5	Análise do silenciamento da expressão da PKR por Western Blot.....	93
4.6	Efeito do silenciamento da expressão da PKR sobre o desenvolvimento tumoral.....	95
4.7	Injeção intratumoral do plasmídeo shRNA anti-PKR-2.....	96
4.8	Efeito do silenciamento da expressão da PKR sobre o potencial metastático das células de melanoma B16-F10.....	97
4.9	Efeito do silenciamento da expressão da PKR sobre a degradação do I- κ B β	99
4.10	Análise do silenciamento da expressão do receptor de quimiocina CXCR4 através de RT-PCR semi-quantitativo.....	100
4.11	Análise do silenciamento da expressão do CXCR4 por Western Blot.....	104
4.12	Efeito do silenciamento da expressão do CXCR4 sobre o desenvolvimento tumoral.....	106
4.13	Administração endovenosa do plasmídeo psiSTRIKE em camundongos C57BL/6.....	110
5.	DISCUSSÃO.....	112
5.1	Considerações Finais.....	127
6.	CONCLUSÕES.....	128
7.	REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS.....	130
Anexo	- Artigo publicado durante o desenvolvimento da tese.....	158

1. Introdução

A integridade de um determinado tecido, assim como sua função, é conferida por um equilíbrio estabelecido entre proliferação e morte celular. Este equilíbrio é mantido através de um complexo sistema de sinalização intra e extracelular. Quando este equilíbrio é perdido, as células passam a proliferar de forma anômala, formando uma massa de células desordenadas que constituem o tumor primário. No processo de progressão tumoral, algumas células do tumor primário perdem a capacidade de adesão podendo levar à formação de metástases. A perda do controle da proliferação e a aquisição de características associadas com a progressão tumoral são consequência de alterações que ocorrem no conteúdo genético das células. A célula alterada, por adquirir uma maior capacidade de proliferação em relação às células vizinhas, sofre uma expansão clonal, transmitindo geneticamente a alteração para todas as células que, a partir dela, se originam. Devido à complexidade e à existência de vias alternativas no controle da proliferação celular, é necessária a ocorrência de alterações adicionais e sucessivas em diferentes genes para que haja a formação de um tumor. Cada nova alteração é acompanhada de uma nova onda de expansão clonal e, ao final desse processo, surge uma população celular com grande potencial de crescimento e invasão, um tumor maligno. Assim sendo, o câncer pode ser considerado uma doença genética complexa que resulta de alterações simultâneas em genes geralmente relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular (Rakoff-Nahoum., 2006).

A transformação celular, o crescimento tumoral e a metástase são processos bioquímicos complexos que envolvem, entre outros eventos, crescimento celular e interações tumor hospedeiro. As bases moleculares para muitos destes eventos estão cada vez mais sendo compreendidas, particularmente em relação ao controle

do ciclo celular, morte celular programada, angiogênese, remodelamento da matriz extracelular e evasão da resposta imunológica (Payne e Cornelius, 2002).

1.1 Considerações básicas sobre melanoma

A incidência do melanoma tem aumentado muito durante as últimas décadas apresentando uma alta taxa de mortalidade devido à disseminação metastática das células tumorais e à quimioresistência (Fecher e cols., 2007; Kasper e cols., 2007)

O melanoma, mais agressivo tipo de câncer de pele, é o nono tipo de câncer mais comum entre caucasianos nos Estados Unidos, sendo que metástases ocorrem entre 15-36% dos pacientes (Hsu e cols., 2002) e constituem a principal causa de morbidade e mortalidade como observado em vários tipos de câncer. O potencial metastático do melanoma, associado com a falta de sistemas terapêuticos efetivos, contribuem para uma baixa taxa de sobrevida mediana para melanoma metastático, em torno de 6 a 10 meses. O prognóstico do melanoma está diretamente associado à sua detecção precoce.

Os melanomas são tumores malignos da camada epidérmica da pele originados a partir de melanócitos, células que produzem o pigmento melanina. Na pele humana, em que a epiderme e a derme são separadas por uma membrana basal, os melanócitos estão localizados na junção entre derme e epiderme e são separados por células denominadas queratinócitos, na proporção de cinco melanócitos para dez queratinócitos. Os melanócitos interagem fisicamente com os queratinócitos através dos seus dendritos para distribuir o pigmento melanina, que se encontra nos melanossomas e confere proteção contra os efeitos lesivos causados pela luz ultravioleta. O desenvolvimento do melanoma é uma consequência patológica de danos causados pelo meio ambiente aos mecanismos

genéticos que controlam o ciclo celular. Dados epidemiológicos indicam que a radiação ultravioleta é o principal carcinógeno ambiental que leva ao surgimento do melanoma.

Um dos modelos experimentais de melanoma mais utilizados em pesquisa é o melanoma B16, o qual se originou espontaneamente em camundongos C57BL/6 nos Estados Unidos em 1954. O tumor primário de melanoma B16 contém subclones que diferem em sua capacidade de formar metástases. Quando essa população heterogênea é injetada na veia de camundongos, cada animal recebe uma mistura de células com níveis variáveis de potencial metastático e, conseqüentemente, os pulmões de cada animal apresentam números diferentes de nódulos metastáticos. Entretanto, no caso das células do tumor primário serem clonadas, é possível isolar as populações metastáticas para os diferentes órgãos do camundongo. O melanoma B16 foi adaptado ao crescimento *in vitro* a fim de se comparar as propriedades metastáticas de vários clones. O melanoma murino B16, clone F10, é derivado de melanoma B16 espontâneo e adaptado *in vitro* seletivamente, ou seja, após dez ciclos de colonização pulmonar (Fidler., 1970; 1975; 1990).

Fidler (1970) demonstrou que a invasão das células do melanoma B16-F10 ocorria preferencialmente para os pulmões. Nicolson (1993) verificou que a proliferação das células do melanoma B16-F10 é diferencialmente regulada por fatores liberados de diferentes tecidos e que vários subclones do melanoma B16 expressam diferentes quantidades de componentes de superfície celular e receptores, que podem ser fundamentais no crescimento diferencial do tumor para sítios específicos. É razoável, então, admitir que estas células possam ter seu crescimento estimulado ou inibido por fatores teciduais variavelmente expressos em órgãos particulares. As células do melanoma B16-F10 sintetizam grande quantidade

de enzimas degradativas como colagenase tipo IV (Liotta e cols., 1980), heparanase (Nakajima e cols., 1984) e catepsina B (Sloane e cols., 1981), indicando que essas células tumorais provavelmente rompem a membrana basal ou a parede capilar através de um mecanismo enzimático.

A palavra metástase (origem grega: mudança de posição) refere-se à migração das células tumorais para regiões do corpo distantes do tumor primário. Sabe-se, na clínica, que este processo de migração celular não é randômico (Nicolson, 1993). A metástase ocorre preferencialmente em certos órgãos do que em outros dependendo da origem do tumor primário. Por exemplo, o melanoma apresenta um padrão de metástase preferencial para cérebro, pulmão, fígado e pele, enquanto células de câncer de próstata tendem a metastizar para os ossos. A metástase resulta de vários passos seqüenciais que incluem liberação de células tumorais do tumor primário, invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos, aderência das células metastáticas às células endoteliais do órgão alvo, extravasamento das células tumorais dos vasos e sobrevivência em um novo microambiente (Chambers e cols., 2002; Murakami e cols., 2004).

A determinação do órgão alvo da metástase é feita com base em considerações da anatomia dos vasos sanguíneos, por propriedades intrínsecas à célula tumoral como expressão de receptores específicos ou alterações do citoesqueleto e pelas propriedades do próprio órgão alvo, tais como produção local de fatores de crescimento (Murakami e cols., 2004).

A evasão das células tumorais do sistema imunológico é um ponto crítico na progressão do melanoma. A diminuição na expressão de moléculas da classe I do complexo de histocompatibilidade principal e a modulação da resposta inflamatória por citocinas têm sido descritas (Allavena e cols., 2007; Singh e cols., 2007). Dados

recentes sugerem que a expressão de quimiocinas e seus receptores em células de melanoma podem contribuir para que ocorra o escape tumoral e pode explicar padrões preferenciais de metástase para sítios como linfonodos, pele e pulmões (Müller e cols., 2001).

1.2 Quimiocinas e progressão neoplásica

O gradiente de quimiocinas tem grande importância no direcionamento de células em vários processos normais bem como patológicos. Assim, o repertório de receptores de quimiocinas presente nos diferentes tipos de tumores pode estar relacionado com o padrão de metástase (Kulbe e cols., 2004).

As quimiocinas representam uma grande família de moléculas polipeptídicas sinalizadoras que são notáveis pelo seu papel na quimiotaxia, migração de leucócitos e migração direcional. Elas têm sido recentemente implicadas na progressão tumoral e desenvolvimento de metástases (Payne e Cornelius, 2002; Ben Baruch e cols., 2007; Koizumi e cols., 2007).

As quimiocinas são proteínas de 8 a 10kDa com 20 a 70% de homologia na seqüência de aminoácidos. Já foram identificadas mais de 40 quimiocinas e estas classificadas em quatro grupos (CXC, CX₃C, CC e C) com base na posição de seus resíduos de cisteína (Baggiolini e cols., 1994; 1997; Strieter e cols., 1995).

A ação das quimiocinas é mediada por uma família de receptores transmembrana (Figura A) acoplados à proteína G (Murphy, 1994; Premack e Schall, 1996) que têm crescido consideravelmente nos últimos anos e atualmente inclui 18 membros (Murdoch e Finn, 2000).

A interação da quimiocina ao seu receptor leva à uma cascata de ativação na célula, incluindo a geração de trifosfato de inositol, a liberação de cálcio intracelular

e a ativação da proteína quinase C (Rozengurt, 2007). A sinalização através do receptor de quimiocina também leva à ativação de proteínas ligantes do tipo guanosina trifosfato pertencentes à família RAS (Laudanna e cols., 1996). As proteínas ligantes estão envolvidas na motilidade celular através da regulação de processos actina-dependentes, tais como ondulação da membrana, formação de pseudópodos e também organização de complexos focais de adesão. Portanto, o que tem sido demonstrado é que os receptores de quimiocinas ativam múltiplas vias sinalizadoras da célula, as quais regulam a maquinaria intracelular necessária para determinadas respostas celulares (Balkwill, 2004).

O câncer tem uma rede complexa de quimiocinas que pode influenciar o infiltrado leucocitário e o processo de angiogênese (Balkwill e Mantovani, 2001). As células tumorais podem também expressar receptores que respondem ao gradiente de quimiocinas influenciando por sua vez o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases. Verificou-se que diferentes tipos de câncer expressam diferentes tipos de receptores de quimiocinas CC e CXC e os seus ligantes correspondentes são, por sua vez, expressos nos sítios de metástases (Balkwill e Mantovani, 2001; Müller e cols., 2001; Murphy, 2001).

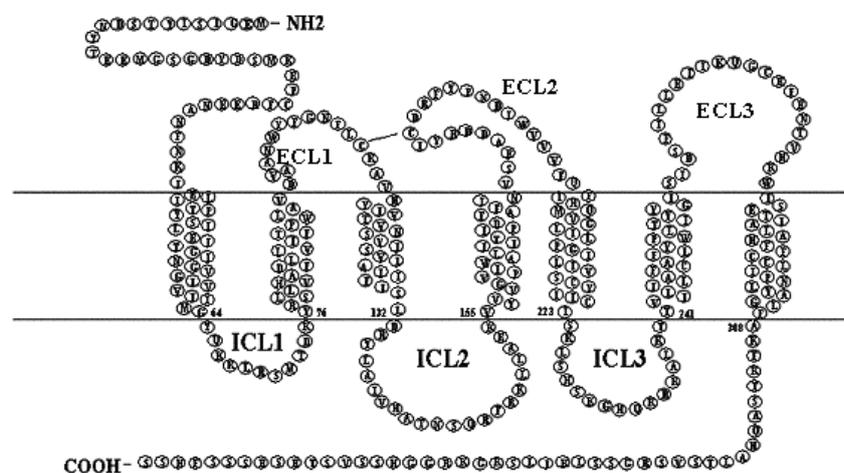


Figura A. Estrutura do receptor de quimiocina CXCR4, indicando os domínios extracelulares, intracelulares e transmembrana.

1.2.1 Receptores de quimiocinas e melanoma

A secreção coordenada de quimiocinas e a ligação a seus receptores na superfície celular direcionam a migração de leucócitos para sítios específicos. Nos últimos anos foi demonstrado que os receptores de quimiocinas exercem um papel fundamental na migração de clones metastáticos de câncer de mama e melanoma para sítios específicos (Müller e cols., 2001; Koizumi e cols., 2007). Estudos têm demonstrado que células malignas expressam um padrão distinto e não randômico de receptores de quimiocinas, os quais direcionam o destino das células metastáticas através da expressão dos níveis de quimiocinas nos órgãos alvo (Murphy, 2001) como indicado na Figura B.

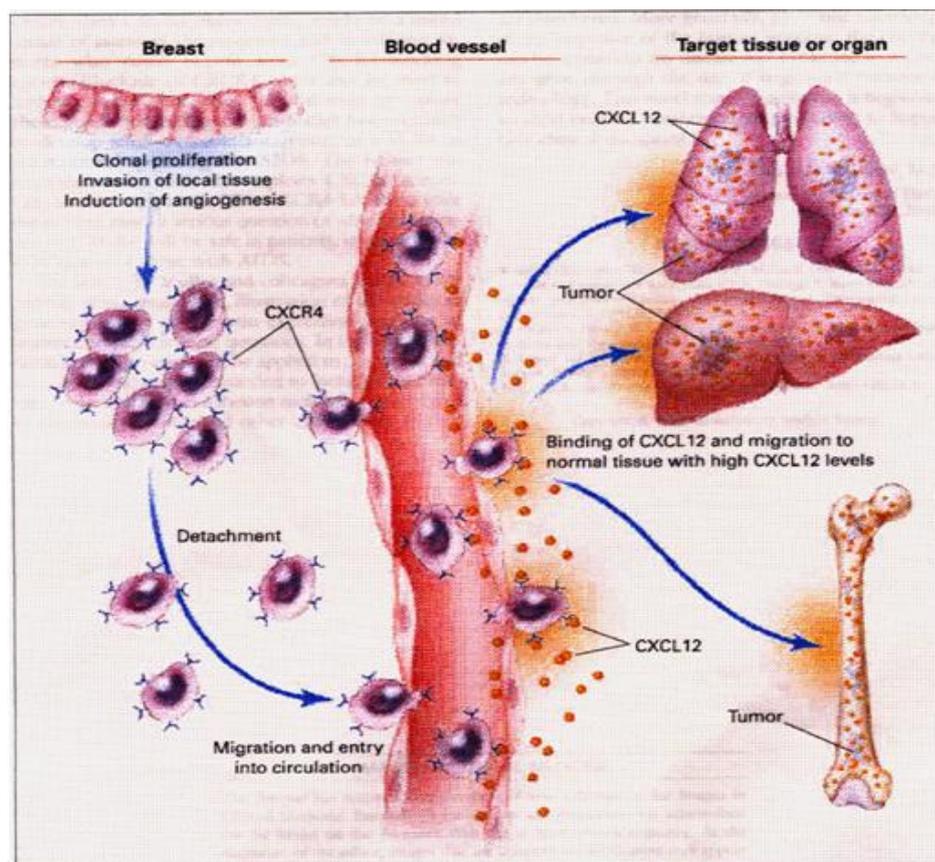


Figura B. Influência dos receptores de quimiocinas na metástase de câncer de mama. Fonte: Murphy PM; N. Engl. J. Med, 2001.

As células de melanoma expressam elevados níveis de RNA mensageiro de CXCR4, CCR7 e CCR10 quando comparadas com melanócitos normais. Os respectivos ligantes para esses receptores, SDF-1 α , CCL21 e CCL27 exibem níveis mais elevados nos pulmões, linfonodos e pele, de acordo com os padrões de metástase do melanoma (Payne e Cornelius., 2002)

Várias linhagens de melanoma, incluindo células de melanoma BLM, altamente invasivas e células de melanoma de infiltrados macroscópicos de linfonodos expressam os receptores CXCR3, o receptor para quimiocina Mig (IP-10) e/ou CXCR4, receptor para SDF1- α . A expressão destes receptores nas células de melanoma podem contribuir para motilidade celular durante invasão, bem como para regulação da proliferação e sobrevivência celular (Robledo., 2001).

O ligante do receptor de quimiocina CXCR4 é o SDF- α , o qual é expresso constitutivamente por células do estroma de vários tecidos incluindo fibroblastos, células endoteliais, pulmão e ossos sendo, portanto, considerado uma quimiocina homeostática (Nagasawa e cols., 1999), além de ser também produzido por células do estroma do tumor.

1.3 Proteína quinase dependente de RNA

A proteína quinase dependente de RNA (PKR) é o membro mais estudado de uma subfamília de enzimas que têm um substrato em comum, o fator de iniciação de transcrição eIF-2 α (Samuel e cols., 1993; Clemens e Elia, 1997; Srivastava e cols., 1998). Homólogos da PKR foram identificados não apenas em células humanas, mas também em células de camundongo, ratos, coelhos e plantas (Langland e cols., 1995; 1996). Mais distante da PKR, mas possuindo o mesmo substrato, está a proteína quinase GCN2, envolvida no controle geral da biossíntese de aminoácidos em levedura, a quinase heme-regulada HRI e a proteína quinase do retículo endoplasmático PERK/PEK envolvida na regulação da síntese de proteínas em reticulócitos. Entretanto, todas essas enzimas são ativadas de formas completamente diferentes da PKR.

A PKR foi muito estudada com o objetivo de se elucidar o mecanismo molecular da atividade antiviral do IFN (interferon), descoberto por Isaacs e Lindenmann em 1957 como uma substância que protege as células das infecções virais.

Os trabalhos pioneiros (Ehrenfeld e Hunt, 1971; Clemens e cols., 1975; Hunter e cols., 1975) demonstraram que a síntese de proteínas, em lisados de reticulócitos, era inibida pela adição de RNA viral de dupla fita (dsRNA).

A PKR foi descoberta depois da observação dos grupos de Metz e Kerr no National Institute for Medical Research (London, United Kingdom) de que extratos celulares, preparados a partir de células infectadas pelo vírus *Vaccinia* tratadas com IFN, que sabidamente tinham a tradução de RNAs mensageiros virais e celulares bloqueados em cultura, foram extremamente sensíveis ao bloqueio da tradução após a adição de RNA mensageiro exógeno e forma sintética de dsRNA,

poly(rI)·poly(rC)(poli:l:C) (Kerr e cols., 1974). Estes estudos levaram à identificação de uma proteína com atividade quinase dependente de RNA hoje conhecida como PKR, a qual foi clonada (Meurs e cols., 1993) depois da produção de anticorpos específicos para purificação e parcial seqüenciamento da PKR pelo laboratório de Hovanessian (Laurent e cols., 1985).

Verificou-se que a inibição da tradução era conseqüência da fosforilação do fator de iniciação eIF-2 α pela proteína quinase dependente de RNA, a qual era ativada pelo dsRNA viral (Farrel e cols., 1977).

Em resposta à infecção viral ocorre um aumento da concentração de IFN que, por sua vez, induz um aumento da expressão da PKR, a qual é ativada pelo dsRNA de origem viral que são sintetizados em células infectadas por vírus como subprodutos da transcrição e replicação viral (Proud, 1995). No caso de vírus do tipo RNA, os dsRNA são intermediários obrigatórios para síntese de novas cópias do RNA genômico. Vírus DNA complexos como o vírus *Vaccinia*, adenovirus ou vírus herpes simples (HSV) apresentam ORFs em orientações opostas, produzindo RNAs mensageiros que podem apresentar regiões altamente estruturadas e de dupla fita responsáveis pela ativação da PKR nas células infectadas (Jacquemont e Roizman, 1975; Maran e Mathews, 1988; Langland e Jacobs, 2002). Como conseqüência do acúmulo de dsRNAs nessas células infectadas, ocorre ativação da PKR com subsequente fosforilação do fator de transcrição eIF-2 α que induz à inibição da tradução, mecanismo este através do qual a PKR exerce atividade antiviral em um largo espectro de vírus DNA e RNA (Lee e cols., 1993; 1996; Balachandran e cols., 2000; Stojdl e cols., 2000).

A PKR é uma serina-treonina quinase que catalisa a transferência de um grupo fosfato- γ do ATP para os grupos alcoólicos presentes nos resíduos de serina e

treonina, os quais funcionam como aceptores de fosfato. O ciclo da fosforilação protéica representa a principal maneira de regulação rápida das atividades celulares, pois permite a mudança quase imediata das proteínas reguladoras de um estado funcional para outro.

Nos mamíferos, todos os polipeptídeos são iniciados com um resíduo de metionina. O fator de transcrição eIF-2, composto de três subunidades (α , β e γ) promove a ligação do RNA transportador iniciador (Met-tRNA) à subunidade 40S do ribossomo para iniciar a síntese protéica em um processo GTP dependente. Uma vez ligado o Met-tRNA, o eIF-2 é liberado do complexo de iniciação depois da hidrólise do GTP em GDP (Hershey, 1991; Majumdar e Maitra, 2005). A troca GDP para GTP é um processo catalisado pelo fator eIF-2B. Uma vez ativada, a PKR é capaz de promover a fosforilação da subunidade α do fator de iniciação-2 (eIF-2 α), o que aumenta a sua afinidade pelo fator eIF-2B cerca de 100 vezes e resulta na inibição da tradução (Sudhakar e cols., 2000). Uma vez que o eIF-2B está presente em pequena quantidade em relação ao eIF-2 α , um pequeno aumento na fosforilação do eIF-2 α representa não apenas o principal ponto de controle da síntese protéica, mas também o desencadeador da resposta à situações de stress.

A PKR humana possui 551 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 68kDa e a PKR murina 515 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 65kDa sendo codificada por um gene localizado no cromossomo 2p21-22 nos humanos e no cromossomo 17 em camundongos (Barber e cols., 1993; Kuhen e cols., 1996; Squire e cols., 1993). A PKR humana consiste de 17 exons, enquanto a PKR murina de 16 (Kuchen e cols., 1996; Tanaka e Samuel, 1994). A PKR, expressa constitutivamente nas células dos mamíferos, está presente na maioria das células em um estado latente devido ao efeito autoinibitório do seu domínio de ligação ao

dsRNA (dsRBD), que bloqueia o domínio catalítico regulando assim a ativação da quinase. Além da ativação em resposta à dsRNA de origem celular ou viral e RNAs sintéticos, a PKR também pode ser ativada por poliânions como heparina, sulfato de dextran, sulfato de condroitina e poli-L-glutamina (Hovanessian e Galabru, 1987). Algumas proteínas virais como tat, bem como o VAI RNA de adenovirus podem bloquear a ligação da PKR ao RNA (McMillan e cols., 1995).

As moléculas de RNA ligam-se à PKR através de dois domínios reguladores localizados na porção N-terminal, resultando na ativação da PKR e autofosforilação (Clemens, 1997; Clemens e cols., 1997). Os dois domínios dsRBD, denominados RI e RII, consistem de 70 aminoácidos cada, localizados entre os resíduos 11-77 (RI) e 101-167 (RII), homólogos entre si e codificados pelos exons 4 e 6 do gene da PKR humana conectados por uma cadeia de 20 aminoácidos. Estes domínios são encontrados em outras proteínas que ligam dsRNA como Staufen e Rnase III e parecem constituir um domínio universal de reconhecimento de RNA (Saunders e Barber, 2003). Na região C-terminal, encontra-se o domínio catalítico, o qual apresenta onze (I-XI) subdomínios consenso, encontrados em todas as proteínas quinases (Proud, 1995) como mostrado na Figura C.

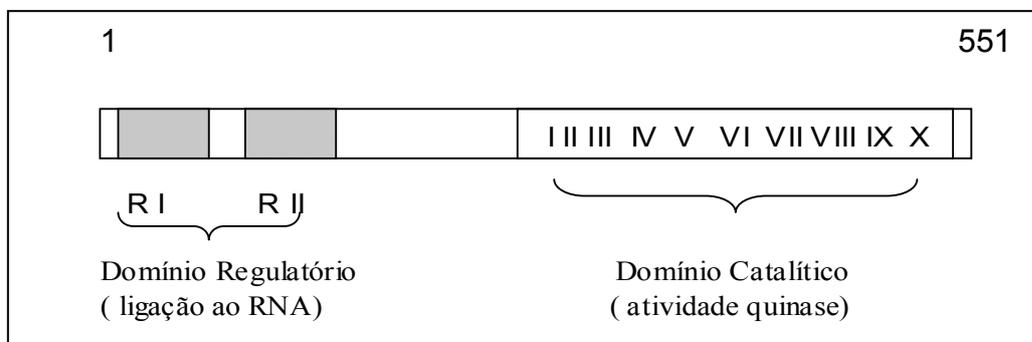


Figura C. Estrutura dos domínios regulatórios e catalíticos da PKR.

A estrutura dos domínios reguladores RI e RII foi determinada por ressonância magnética e mostrou uma conformação espacial que permite que o dsRBD se enrole ao redor da molécula de RNA de modo a permitir uma interação ideal entre a proteína e a molécula de RNA.

Após a ligação do dsRNA, a PKR sofre alterações conformacionais que inibem as interações autoinibitórias da enzima e permitem o reconhecimento do seu substrato. A PKR sofre então rápida autofosforilação principalmente nos resíduos Thr446 e Thr451 (Taylor e cols., 1996; Zhang e cols., 200; Dey e cols., 2005) dimerizando-se durante esse processo de ativação, o que acaba por estabilizar a enzima e aumentar a atividade catalítica da quinase (Figura D). Foi demonstrado também que a enzima é ativada por baixos níveis de dsRNA e inibida por altas concentrações. Após ocorrer a autofosforilação da PKR, a atividade desta proteína quinase torna-se independente da presença de dsRNA (Manche e cols., 1992).

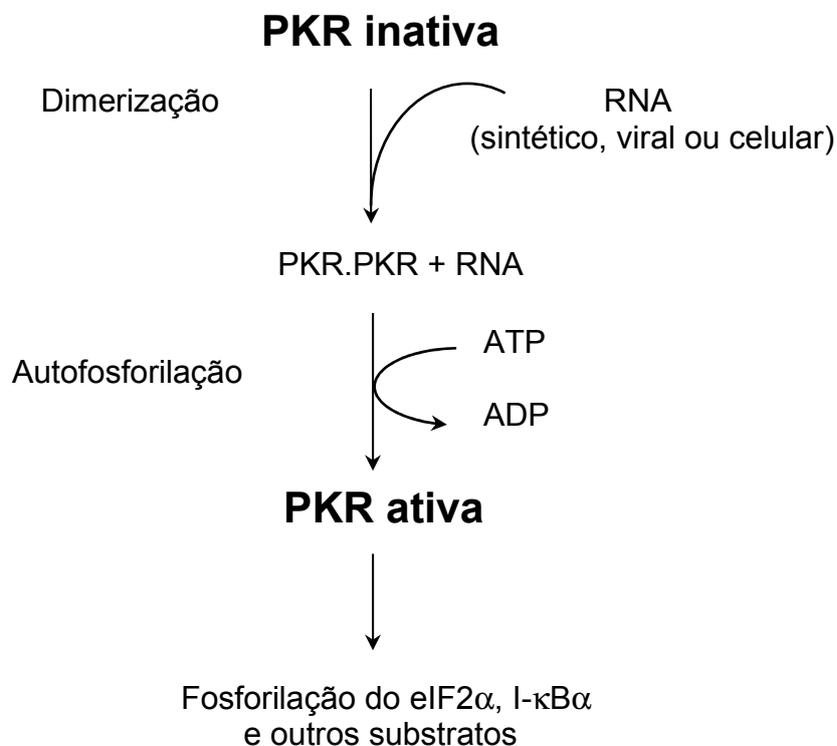


Figura D. Mecanismo de ativação da PKR pelos RNAs sintéticos, virais ou celulares.

Os estudos sobre a PKR permaneceram, durante muitos anos, restritos ao âmbito do mecanismo de ação dos IFN- α/β , acreditando-se que somente o RNA de origem viral era capaz de ativar esta proteína quinase. É importante salientar que embora a PKR esteja envolvida em importantes funções celulares, os estudos sobre a regulação desta proteína quinase foram realizados quase que exclusivamente com RNA de origem viral (Clemens e cols., 1994; Clemens e Elia, 1997).

Considerando os dados recentes da literatura sobre o importante papel desempenhado pela PKR na célula, é razoável admitir que esta enzima seja também regulada por RNAs celulares. É fato conhecido, há várias décadas, que RNAs extraídos de células de diferentes origens e denominados de RNAs exógenos, são capazes de modular a atividade de células eucarióticas (Bhargava e Shanmugan, 1971; Dray e Braun, 1979). Entretanto, o mecanismo de ação dos RNAs exógenos não foi ainda elucidado.

O nosso laboratório demonstrou a modulação de linfócitos e macrófagos com RNAs exógenos (De Lucca e cols., 1982; Bertolini e De Lucca, 1985; 1986a; 1986b; Passos e cols., 1988; 1991; Sales e cols., 1996; Watanabe e cols., 1997) e sugeriu a participação da PKR e do fator de transcrição NF- κ B neste fenômeno (Souza e cols., 2000; Watanabe e cols., 2005).

Foi também verificado que a PKR pode ser ativada por RNAs de fita simples com estrutura secundária estável (Li e Petryshyn, 1991; Bommer e cols., 2002, Murad e cols., 2006; Delgado André e De Lucca, 2007) e pela região 3'-UTR (3'-*untranslated region*) de RNAs mensageiros de células de mamíferos (Davis e Watson, 1996; Nussbaum e cols., 2002). De Lucca e cols. também demonstraram que frações de RNA poli A (+) obtidas de RNA total extraído de linfócitos de animais

imunizados com peptídeos sintéticos do HIV-1 são capazes de ativar a PKR humana (De Lucca e cols., 2002; 2003; Watanabe e cols., 2003; 2005; 2005b).

Em adição ao papel bem estabelecido como regulador traducional, a PKR também está envolvida na transdução de sinais. A primeira indicação veio da observação que a inibição da PKR com o nucleosídeo 2-aminopurina interfere com a resposta desencadeada pelo IFN (Sekellick e cols., 2000).

Além do seu papel na resposta ao RNA, tem se tornado claro que a PKR é ativada por vários ativadores diferentes, como estímulos pró-inflamatórios, fatores de crescimento, citocinas e estresse oxidativo (Tan e Katze, 1999), desempenhando assim um papel crucial na inflamação, crescimento celular, diferenciação, proliferação e indução de apoptose em diferentes linhagens de células (Koromilas e cols., 1992; Lengyel, 1993; Meurs e cols., 1993).

A PKR integra e transmite sinais não apenas para o eIF-2 α e a maquinaria de tradução, mas também para vários outros fatores como STAT (*signal transducer and activator of transcription*), IRF-1 (*interferon regulatory factor-1*), p53, JNK (*Jun N-terminal Kinase*), p38, bem como para o fator de transcrição NF- κ B (Verma e cols., 1995; Williams, 1999; 2001).

Apesar de bem caracterizada pela sua função na resposta antiviral, a PKR possui também implicações na regulação da transcrição, diferenciação celular, transdução de sinal e supressão de tumor (Vorburger e cols., 2004; Watanabe e cols., 2005a, Garcia e cols., 2006).

Os trabalhos pioneiros sobre a participação da PKR no controle da proliferação celular revelaram que a PKR atua como supressor de tumor (Koromilas e cols., 1992; Meurs e cols., 1993). Estes autores utilizaram mutantes da PKR de

células NIH 3T3 e observaram que ocorria o desenvolvimento tumoral somente quando as células injetadas nos camundongos possuíam mutantes inativos da PKR.

Donze e cols. (1995) demonstraram que a inibição da fosforilação da subunidade α do fator de iniciação eIF-2 pela PKR resulta na transformação maligna das células NIH 3T3. Verificou-se ainda que mutantes da PKR com deleção do domínio I de ligação com o RNA, bem como no domínio catalítico desta proteína quinase, também induzem transformação maligna em células NIH 3T3 (Barber e cols., 1995).

É importante salientar que os resultados obtidos com animais transgênicos, nos quais a expressão da PKR estava abolida, não confirmam que esta proteína quinase atua como supressor de tumor (Yang e cols., 1995; Abraham e cols., 1999). Além disso, linhagens primárias de fibroblastos derivados de camundongos *knockout* para o gene da PKR crescem mais lentamente do que aqueles derivados de animais normais. Estes dados sugerem que a PKR é necessária para a própria proliferação celular, uma vez que a inibição da PKR impede a passagem da fase G1 para fase S durante o ciclo celular (Zamanian-Daryoush e cols., 1999).

Observou-se também um nível aumentado da PKR em vários tipos de tumores humanos, levantando a questão da classificação da PKR como gene supressor de tumor (Haines e cols., 1992; 1993; 1996; 1998). Os resultados indicam que o papel desta quinase aparentemente varia de acordo com o tipo de câncer envolvido (Kim e cols., 2000).

Foi demonstrado que células de carcinoma de mama apresentam elevados níveis protéicos bem como elevada atividade da PKR e níveis elevados do fator eIF2 α fosforilado quando comparado com células não transformadas. Verificou-se ainda que o nível do RNAm da PKR é 3 a 8 vezes maior nas células transformadas e

que esse aumento é devido ao aumento da transcrição pelo promotor da PKR. Todas essas observações indicam que a PKR não age como supressor de tumor em câncer de mama, mas sim, sugere um papel positivo no controle do crescimento celular. Além disso, foi também demonstrado que o nível do inibidor p58 é muito maior em células não transformadas do que nas células de carcinoma de mama (Kim e cols., 2000; Nussbaum e cols., 2003). Especula-se que, uma vez aumentada, a PKR poderia ativar proto-oncogenes bem como vias que são necessárias para indução ou manutenção do crescimento celular (Kim e cols., 2000)

As várias vias de transdução de sinal estão constitutivamente ativas nas células transformadas e tem-se especulado que a PKR em altos níveis ou ativada é responsável pela ativação do STAT-3 que é essencial para a proliferação celular em células de carcinoma de mama (Nussbaum e cols., 2003).

Kim e cols. (2002) demonstraram que culturas de células de melanoma apresentam elevada expressão da PKR bem como autofosforilação quando comparadas com melanócitos normais. A análise do tumor revelou uma expressão muito aumentada dos níveis do RNAm e da proteína PKR em metástase de linfonodo quando comparado aos tumores primários bem como uma maior quantidade do eIF2 α fosforilado em células de melanoma do que em melanócitos, sugerindo uma maior atividade da PKR nas células tumorais (Kim e cols., 2002). Uma atividade aumentada da PKR também foi detectada em câncer de colón, carcinoma de tireóide e carcinoma hepático no qual foi observado que tumores pouco diferenciados e que apresentam menores níveis da PKR apresentam maior índice de apoptose do que as células de carcinoma hepático bem diferenciadas com elevados níveis da proteína, resultados estes que não sugerem correlação direta

entre níveis da PKR e a indução da apoptose (Haines cols., 1992; 1993b; 1996; 1998; Shimada e cols., 1998; Singh e cols., 1995; Terada e cols., 2000).

Em resumo, os dados da literatura sobre a participação da PKR no fenômeno da transformação maligna são controversos, pois sugerem que a PKR poderia atuar tanto como supressor de tumor quanto como regulador positivo da proliferação celular. Fica evidente, portanto, que a relação PKR e câncer deve ser investigada com novas metodologias disponíveis para se estudar a função gênica.

1.4 RNAs reguladores

Um dos principais paradigmas da biologia molecular era de que os genes são principalmente codificadores de proteínas. De acordo com o dogma central da biologia molecular, a informação genética armazenada no DNA é transcrita em RNA mensageiro (RNAm) e este posteriormente traduzido em proteínas nos ribossomos com a participação dos RNA transportadores (RNAt), indicando que os genes são sinônimos de proteínas e assim o genoma seria quase inteiramente traduzido em proteínas. Esta conclusão é essencialmente correta para os procariotos, modelos dos experimentos iniciais de expressão gênica onde as exceções são genes que codificam os RNAs estruturais (RNAs ribossômicos e RNAs transportadores) necessários para a síntese protéica, e um pequeno número de genes que não codificam proteínas e estão envolvidos com funções regulatórias e que ocupam não mais de 1% do genoma (Wassarman e cols., 1999; Mattick, 2001).

Uma das maiores surpresas da história da biologia molecular foi a descoberta, na década de 70, que muitos genes em eucariotos são fragmentados, apresentando seqüências não codificadoras (íntrons) entre as seqüências codificadoras de proteínas (exons), sendo que as primeiras eram retiradas antes da tradução pelo processo denominado *splicing*. Além disso, a descoberta das propriedades catalíticas do RNA há mais de 20 anos, sugeriu que as funções do RNA vão muito além deste papel passivo na expressão de genes que codificam proteínas (Szymanski e Barciszewski, 2002).

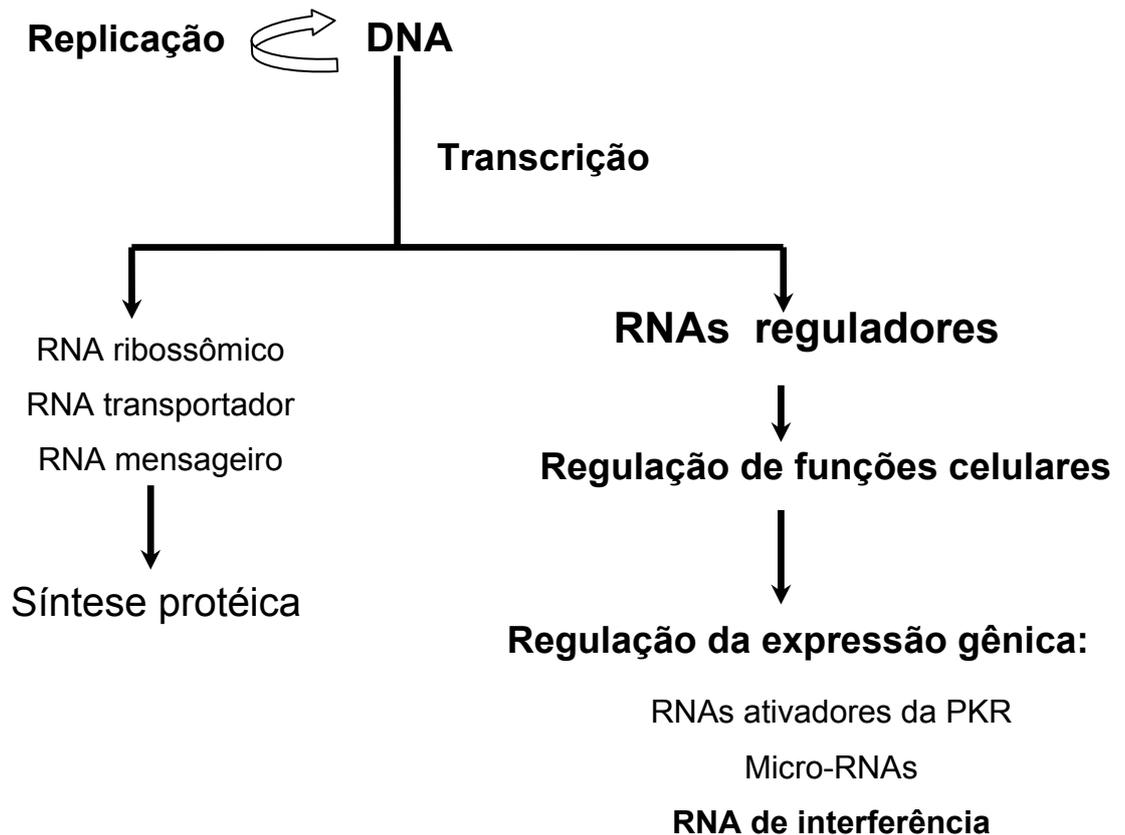
Nas análises das seqüências genômicas, os genes que são transcritos em RNA não codificadores foram freqüentemente ignorados. Entretanto, o seqüenciamento do genoma humano e de vários eucariotos mostrou que quanto maior a complexidade do organismo menor é a porcentagem de genes que

codificam proteínas. É estimado que cerca de 98% dos transcritos do genoma humano não codificam proteínas (Mattick, 2001; Mattick e Gagen, 2001).

Apesar do conceito de que os RNAs intrônicos não eram funcionais, sendo simplesmente degradados e reciclados após o *splicing*, uma outra possibilidade tem se fortalecido nos últimos anos, na qual os RNAs intrônicos seriam ativos e formariam uma grande rede regulatória nas células eucarióticas (Mattick, 1994; Mattick e Gagen, 2001; Mattick, 2004).

O conceito de RNA regulador, que emergiu de forma convincente somente na década de 90, representou um avanço extraordinário para a compreensão dos eventos moleculares envolvidos na modulação da atividade de células eucarióticas através de RNA. Nos últimos anos, foram descritos vários tipos de RNA que não participam do processo de biossíntese de proteínas e por esse motivo têm sido classificados como RNAs reguladores. Uma característica importante dos RNAs reguladores é que essas moléculas não são traduzidas e, portanto, o produto do gene é o RNA, o qual atua diretamente na regulação de importantes funções celulares, entre as quais podemos salientar a regulação da expressão gênica. Por esse motivo, os RNAs reguladores são também denominados de transcritos não codificadores de proteínas (*non-coding* RNAs, ncRNA) (Eddy, 2001; Erdmann e cols., 2001a; 2001b; Szymanski e Barciszewski, 2002). Os ncRNAs estão envolvidos em vários processos incluindo regulação transcricional, pós-transcricional, replicação cromossômica, *imprinting* genômico, processamento do RNA, *splicing* alternativo, estabilidade e tradução do mRNA e degradação protéica (Mattick e Gagen, 2001; Mattick, 2004).

Os principais RNAs envolvidos na regulação da expressão gênica em células eucarióticas podem atuar tanto em nível transcricional (RNAs ativadores da PKR) como em nível pós-transcricional (micro-RNA e RNA de interferência):



Há vários anos o nosso laboratório tem investigado a presença de RNAs reguladores em linfócitos e macrófagos ativados. Os resultados do laboratório demonstraram, pela primeira vez, a existência de ncRNAs que regulam a expressão gênica em nível de transcrição e cujos efeitos são mediados pela PKR através da ativação do fator de transcrição NF- κ B (De Lucca e cols., 2002; Watanabe e cols., 2003, 2005). Por esse motivo, esses riboreguladores foram denominados de RNAs ativadores da PKR.

Recentemente, têm sido descritos RNAs reguladores de baixo peso molecular (21-22 nucleotídeos) que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional, os quais foram denominados de micro-RNAs (miRNAs) (Lee e cols., 1993; Lagos-Quintana e cols., 2001; 2003; Lau e cols., 2001; Lee e Ambros, 2001; Ambros, 2004). Os miRNAs fazem parte de uma grande família de genes não codificadores de proteínas e que são altamente conservados. Estimativas indicam a existência de cerca de 500 genes de miRNAs que corresponde aproximadamente a 1% dos genes humanos preditos, o que permite classificá-los como uma classe abundante de ncRNAs (Ambros e cols., 2003a; 2003b; Lim e cols., 2003; Bentwich e cols., 2005).

No final da década de 1990, foi descrito um fenômeno de silenciamento gênico pós-transcricional seqüência específico mediado por dsRNA de seqüência homóloga a do gene alvo, fenômeno este que foi denominado RNA de interferência (RNAi) (Fire e cols., 1998).

1.5 RNA de Interferência

O RNAi constitui uma promissora ferramenta que permite o estudo da genômica funcional através da degradação do RNA mensageiro específico para o gene de interesse com a grande vantagem de ser um processo natural das células.

O silenciamento gênico pós-transcricional mediado por dsRNA é um mecanismo de defesa celular conservado durante a evolução para controlar a expressão de genes estranhos exógenos em protistas, fungos filamentosos, plantas e animais (Fire, 1999; Bass, 2000; Cogoni e Macino, 2000; Hammond e cols., 2001; Sharp e cols., 2001; Tuschl, 2001; Waterhouse e cols., 2001).

A primeira observação de que transgenes poderiam induzir a degradação do RNA mensageiro de maneira seqüência específica foi feita na década de 1990 a partir de genes envolvidos na pigmentação de petúnias, fenômeno denominado co-supressão (Napoli e cols., 1990; Van de krol e cols., 1990).

O fenômeno de silenciamento denominado *quelling* foi descrito posteriormente por Cogoni e cols. (1996; 1997; 1997a) no fungo *Neurospora crassa*.

Entretanto, o principal avanço na história do silenciamento gênico foi a descoberta de tal fenômeno no nematóide *Caenorhabditis elegans* (Fire e cols., 1998). Esses autores observaram o dsRNA era mais efetivo no mecanismo de silenciamento do que a fita anti-senso e a senso estudadas separadamente. A introdução de fitas simples purificadas em animais adultos produziu um efeito pequeno enquanto a mistura das duas fitas (dsRNA) levou à uma interferência potente e específica na expressão gênica. Esta interferência no genoma de *C.elegans* pode ser induzida pela introdução do dsRNA em qualquer região do animal (Fire e cols., 1998), introdução na alimentação através da *Escherichia coli*

(Timmons e Fire, 1998) ou simplesmente submetendo-o à uma solução contendo dsRNA. Apenas uma pequena quantidade de dsRNA foi necessária para tal efeito, sugerindo que possa haver um componente catalítico ou de amplificação no processo de interferência (Fire e cols., 1998). Este novo fenômeno foi então denominado RNA de interferência (RNAi).

Estes dsRNA foram inicialmente detectados em tecidos vegetais que apresentaram silenciamento gênico induzido por vírus ou transgene (Hamilton e Baulcombe, 1999), posteriormente em embriões de moscas, vermes (Parrish e cols., 2000; Yang e cols., 2000) e em extratos de células Schneider-2 (S2) de *Drosophila melanogaster* que foram transfectadas com dsRNA (Hammond e cols., 2000).

O processamento das moléculas longas de dsRNA em RNAs de 21-23 nucleotídeos foi inicialmente estudada *in vitro* a partir de extratos de embriões de *D. melanogaster* (Zamore e cols., 2000) e posteriormente em extratos de células S2 (Bernstein e cols., 2001). No caso do lisado de embrião, observou-se que o RNAm alvo foi clivado em fragmentos de 21 nucleotídeos (Zamore e cols., 2000) e que dsRNAs sintéticos com 21 e 22 nucleotídeos adicionados ao lisado foram capazes de uma degradação eficiente do RNAm, enquanto dsRNAs de 30 nucleotídeos foram ineficazes (Elbashir e cols., 2001b). Outra contribuição importante deste trabalho foi a demonstração de que o fenômeno da degradação do RNAm é dependente da seqüência do siRNA.

Apesar do RNAi ter sido descrito em uma variedade de eucariotos incluindo plantas, protistas, fungos filamentosos e animais invertebrados e vertebrados (Carthew e cols., 2001; Hammond e cols., 2001; Tuschl, 2001; Waterhouse e cols., 2001; Zamore, 2002), apenas recentemente foi possível silenciar genes humanos

em cultura de células somáticas (Elbashir e cols., 2001b). A detecção do RNAi em células somáticas de mamíferos tem sido dificultada pela presença de um mecanismo dependente de dsRNA que leva à supressão da expressão gênica de maneira não específica (Clemens e Elia, 1997; Stark e cols., 1998; Kumar e Carmichael, 1998; Geiss e cols., 2001). A introdução de dsRNA longos em células de mamíferos desencadeia um vigoroso e inespecífico bloqueio da transcrição e tradução. O dsRNA é um potente indutor da síntese de IFN e da indução de duas enzimas, a PKR, a qual leva a uma posterior fosforilação e inativação do fator eIF2 α , e da 2'-5' oligoadenilato sintetase, cujos produtos ativam a ribonuclease RNase L. Esses três fatores levam à interrupção da síntese protéica e apoptose celular (Williams, 1997).

Uma importante característica do mecanismo do RNAi é o processamento do dsRNA em segmentos curtos de dsRNA, de 21 a 25 nucleotídeos (Elbashir e cols., 2001a) e que foram denominados de siRNAs (*small interfering RNAs*).

A caracterização bioquímica mostrou que os siRNAs são dsRNA de 21 a 23 nucleotídeos com 2 ou 3 nucleotídeos não pareados na extremidade 3' (*overhang*), grupos fosfato e hidroxila nas extremidades 5' e 3' respectivamente (Elbashir e cols., 2001a). Esta estrutura é característica de um padrão de quebra enzimática do tipo RNase III, o qual permitiu a identificação da família Dicer de enzimas RNase III altamente conservadas e que atuam na quebra das duplas fitas de RNA. Esta enzima foi caracterizada a partir de extratos preparados de células de insetos (Bernstein e cols., 2001), embriões de *C. elegans* (Ketting e cols., 2001) e cultura de células de mamíferos (Billy e cols., 2001). Nas células de mamíferos, foi demonstrado que a Dicer localiza-se no citoplasma, o que reforça a evidência de que o RNAi é um processo predominantemente citoplasmático (Billy e cols., 2001). A

Dicer tem um domínio de helicase RNA na parte N-terminal, um domínio PAZ (proteínas piwi, argonaute e zwiille) (Cerutti e cols., 2000; Bernstein e cols., 2001), dois domínios RNase III e um sítio de ligação para o dsRNA na porção C-terminal. Várias evidências genéticas e bioquímicas estão aprimorando a compreensão da maneira pela qual os dsRNA poderiam levar à degradação de RNAs mensageiros homólogos (Hannon, 2002; McManus e Sharp, 2002; Zamore e cols., 2002).

No primeiro passo, a enzima Dicer cliva moléculas longas de dsRNA para produzir siRNAs. A Dicer interage com a proteína TAR, ligante de RNA (TRBP) que direciona os siRNAs produzidos facilitando a incorporação destes em um complexo multiprotéico de silenciamento induzido por RNA (RISC), cujo principal componente foi identificado como sendo membro da família das proteínas Argonauta (Hammond e cols., 2001a).

Verificou-se ainda que o siRNA precisa ser fosforilado na extremidade 5' para entrar no RISC (Nykanen e cols., 2001), sendo que os siRNAs que não possuem grupo fosfato são rapidamente fosforilados por uma quinase endógena (Schwarz e cols., 2002). Os siRNAs incorporados ao RISC são, por sua vez, clivados pela Argonauta-2 de forma a liberar uma das fitas (fita *passenger*) e gerar assim o RISC ativado com a fita simples de RNA guia que determina o reconhecimento do RNAm alvo através do pareamento de bases. O fator determinante na escolha da fita que permanecerá ligada ao RISC ativo é a estabilidade termodinâmica das extremidades das fitas do siRNA. A fita cuja extremidade 5' possuir maior estabilidade termodinâmica se ligará por sua vez ao domínio PIWI da Argonauta-2. A extremidade 5' não pareada da fita guia, seqüência *seed*, é pareada com a extremidade 3' do RNAm alvo guiando o RISC para o alvo correto (Martinez e Patkaniowska, 2002, Schwarz e cols., 2002, Aagaard e John, 2007). Assim, ocorre o

pareamento perfeito da fita guia do siRNA e do RNAm alvo, resultando na clivagem do RNA mensageiro homólogo em um processo dependente de ATP (Nykanen e cols., 2001). O RNA mensageiro é então clivado em um único sítio no centro da dupla fita de siRNA e mRNA, a 10 nucleotídeos da extremidade 5' do siRNA (Elbashir e cols., 2001b) (Figura E). Os produtos da clivagem do mRNA alvo são rapidamente degradados pois eles não têm a estabilidade que é conferida pelo CAP ou pela cauda poli (A). O pareamento parcial pode em certos casos reprimir a o processo de tradução ou desestabilizar os transcritos.

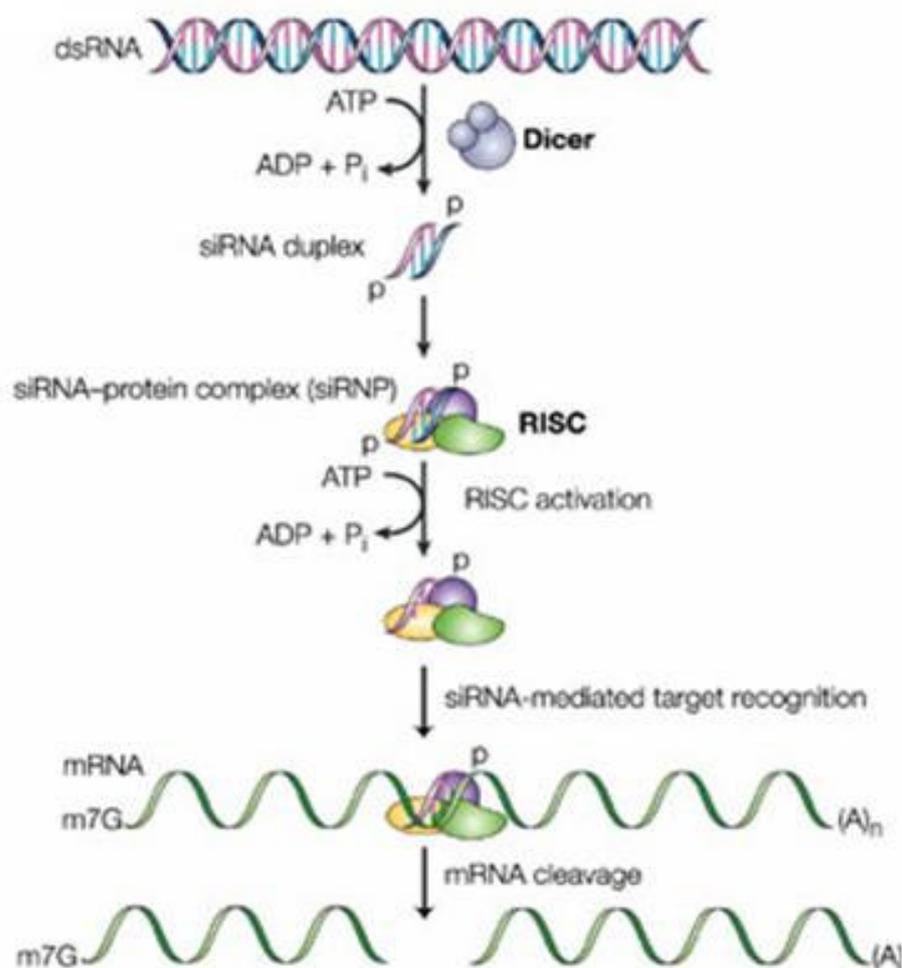


Figura E. Mecanismo de ação do RNA de interferência. Fonte: Sharp PA; Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003.

O delineamento do siRNA para o silenciamento gênico requer conhecimento exato da seqüência alvo no RNAm. As seqüências intrônicas contidas no pré-RNAm não devem ser selecionadas como alvo uma vez que o RNAm que sofre um *splicing* incompleto é retido no núcleo e se acredita que o silenciamento através do RNAi ocorra predominantemente, senão exclusivamente, no citoplasma (Elbashir e cols., 2002). Um aspecto fundamental da degradação do RNAm alvo é que esse fenômeno depende da seqüência do siRNA. Entretanto, nem todas as posições do siRNA contribuem da mesma maneira para o processo de reconhecimento da seqüência alvo (Elbashir e cols., 2001b). Foi observado que as mutações no centro do siRNA são muito críticas e essencialmente abolem a degradação da seqüência alvo. Em contraste, o último nucleotídeo da extremidade 3' do siRNA não contribui para o reconhecimento. Elbashir e cols. (2001a) demonstraram que a eficiência dos siRNAs também depende do número de nucleotídeos não pareados na extremidade 3'. Verificou-se ainda que os siRNAs com quatro a seis nucleotídeos *overhang* foram incapazes de mediar o efeito de interferência bem como siRNAs com dois ou mais nucleotídeos não pareados na extremidade 5'. Os siRNAs que apresentam dois ou três nucleotídeos não pareados na extremidade 3' foram os mais eficazes na degradação do mRNA alvo. Verificou-se que a eficiência da transfecção, concentração do siRNA, estrutura secundária do siRNA e do RNAm alvo também influenciam o processo de silenciamento gênico (Pancoska e Moravek, 2004).

O silenciamento gênico pode ser induzido pela administração de siRNA diretamente no sistema a ser estudado, dsRNA de cadeia longa, ou vetores de expressão (plasmidial ou viral) que permitem a expressão intracelular de shRNA, o qual é posteriormente processado em siRNAs ativos dentro da célula, resultando em um silenciamento gênico mais duradouro (Paddison e cols., 2002; Brummelkamp e

cols., 2002). É importante salientar que a entrada do RNA na célula é o maior obstáculo para o uso clínico do RNAi.

A otimização da administração sistêmica envolve a estabilização do siRNA, o alcance do tecido desejado e a garantia da captação do siRNA pela célula alvo.

Vetores virais têm sido muito empregados uma vez que garantem uma alta eficiência de transfecção devido sua habilidade de infectar as células alvo e assim transportar o material genético para dentro das células. Entretanto vetores virais apresentam riscos devido ao seu potencial oncogênico e seus efeitos inflamatórios e imunogênicos (Lehrman, 1999; Liu e Muruve, 2003).

A meia vida dos siRNAs não modificados *in vivo* é muito curta, variando de segundos a minutos (Soutschek e cols., 2004). Isto se dá principalmente devido à sua rápida eliminação através da filtração glomerular em decorrência do seu pequeno tamanho (aproximadamente 7kDa). Além disso, também podem ser degradados por RNases que presentes em grandes quantidades no soro, apresentando uma meia vida de aproximadamente 5 a 60 minutos. Observou-se que a meia vida dos siRNAs circulantes pode ser prolongada à dias se a eles forem ligados à outras moléculas ou partículas que não sejam filtradas pelo rim (Soutschek e cols., 2004; Layzer e cols., 2004; Schiffelers e cols., 2004) ou através de modificações químicas na estrutura do siRNA e pela proteção das extremidades, o que os torna resistentes à degradação pelas RNases sem perda aparente da eficiência no processo de silenciamento gênico (Braasch e cols., 2003; Sioud e cols., 2007).

Outras alterações que visam direcionar o RNAi para tecidos ou células específicos incluem conjugação do siRNA com a molécula de colesterol, fusão com anticorpos, fusão com nanopartículas de ciclodextrina (Aagaard e Rossi, 2007).

Apesar da grande expectativa, especificidade e potência do RNAi, alguns fatores como estabilidade, administração do siRNA, os efeitos inespecíficos, a saturação da maquinaria do RNAi, a inibição incompleta do gene alvo e a duração do efeito devem ser consideradas a fim de se otimizar o uso dessa promissora ferramenta tanto na pesquisa básica como na pesquisa clínica (Uprichard e cols., 2005).

A inibição do crescimento e progressão tumoral é um dos principais desafios da medicina. Apesar do significativo progresso no desenvolvimento de terapias contra o câncer, estas são efetivas em apenas um pequeno número de casos. Uma vez que se trata de uma doença complexa, agentes que interferem com apenas uma via oncogênica apresentam baixa eficácia devido aos diversos mecanismos de resistência.

Nos últimos anos, várias proteínas que levam ao câncer foram descobertas. Estas proteínas representam alvos potenciais para uma terapia seletiva, com menos efeitos colaterais do que a quimioterapia. Assim, várias moléculas pequenas e anticorpos que têm como alvo oncoproteínas estão sendo desenvolvidos, mas estas drogas têm sido eficazes em apenas alguns casos (Friedrich e cols., 2004).

Uma outra abordagem atraente para o tratamento de câncer é o uso de RNA. Essas moléculas podem levar à inibição de genes específicos de um certo tipo de câncer, resultando em menos efeitos colaterais uma vez que podem silenciar proteínas mutadas ou expressas preferencialmente em um tipo de câncer (Friedrich e cols., 2004).

Nesse contexto, o primeiro método a ser empregado para a inibição específica da expressão gênica foi o uso de oligonucleotídeos anti-senso no final da década de 70 (Zamecnik e Stephenson, 1978). Após sua introdução na célula, o

RNA anti-senso, bem como os oligodesoxinucleotídeos anti-senso, são capazes de hibridizar com o RNAm alvo através do pareamento das bases nitrogenadas levando à degradação da dupla fita RNA-DNA através da RNase H e conseqüentemente à inibição da tradução do RNAm alvo. Efeitos inibitórios no crescimento celular e tumorigênese foram obtidos utilizando RNA anti-senso para silenciar vários genes tais como a proteína anti-apoptótica Bcl-2, telomerase, IGF-IR, VEGF e EGFR (Reed e cols., 1990; Oku e cols., 1998; Scotlandi e cols., 2002). Estes efeitos inibitórios, no entanto, ocorriam também em células normais, levando assim a efeitos colaterais indesejados, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias que permitissem a administração do RNA anti-senso apenas nas células tumorais.

No início dos anos 80 a descoberta das ribozimas veio expandir as estratégias baseadas em uso de RNA (Cech, 1981; Guerrier-Takada e cols., 1983). As ribozimas são RNAs que catalizam reações químicas sem a presença de qualquer cofator protéico, apresentando um domínio catalítico que é flanqueado por seqüências complementares ao RNA alvo. O mecanismo de silenciamento envolve ligação da ribozima ao RNA através do pareamento das bases nitrogenadas, reconhecimento da porção fosfodiéster carregada negativamente e a quebra da fita de RNA (Nellen e Sczakiel, 1996). Entretanto, a atividade das ribozimas *in vivo* depende do nível de expressão das ribozimas nas células, da sua especificidade, estabilidade intracelular, co-localização com o alvo, acessibilidade ao sítio de ligação, fatores estes que limitaram a aplicação das ribozimas *in vivo* e, portanto, o seu uso clínico.

A descoberta do RNAi e, posteriormente, da existência de uma maquinaria intracelular apropriada para o mecanismo de ação de dsRNA, tornou o RNAi a mais potente tecnologia anti-senso descoberta até agora, uma vez que a concentração de

RNAi necessária para silenciar o gene alvo é cerca de cem a mil vezes menor que a concentração do oligonucleotídeo anti-senso direcionado para o mesmo alvo (Kretschmer-Kazemi e cols., 2003; Kobayashi e cols., 2004). Assim, o RNAi vem sendo muito estudado tanto como uma ferramenta extremamente poderosa na área da genômica funcional, quanto como um método potencial para desenvolvimento de terapias altamente específicas baseadas em silenciamento gênico seqüência específica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal do presente estudo foi investigar o papel da PKR e do receptor de quimiocina CXCR4 sobre o crescimento tumoral e o potencial metastático das células de melanoma B16-F10 no modelo de melanoma murino através da tecnologia do RNA de interferência.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o silenciamento dos genes da PKR e do receptor CXCR4 através da transfecção das células B16-F10 com os plasmídeos shRNA anti-PKR e shRNA anti-CXR4, respectivamente. As análises da degradação dos RNA mensageiros da PKR e do CXCR4, bem como os níveis das proteínas PKR e CXCR4 foram realizadas por RT-PCR semi-quantitativo e Western blot, respectivamente.
- Estudar os efeitos do silenciamento dos genes da PKR e do CXCR4 sobre o desenvolvimento do melanoma B16-F10 e a colonização pulmonar através de injeções subcutânea e endovenosa das células B16-F10 transfectadas com os plasmídeos shRNA anti-PKR e shRNA anti-CXR4 em camundongos C57BL/6.
- Investigar o efeito da injeção intratumoral dos plasmídeos shRNA anti-PKR e shRNA anti-CXR4 sobre o desenvolvimento do melanoma subcutâneo em camundongos C57BL/6.

- Verificar o efeito da injeção endovenosa do plasmídeo shRNA anti-CXCR4 associado com o agente transfectante policatiónico jetPEI™ sobre a colonização pulmonar das células de melanoma B16-F10.

3. Material e Métodos

3.1 Cultura de células de melanoma B16-F10

Células de melanoma B16 clone F10, cedidas gentilmente pelo professor Dr. Roy Edward Larson da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco) (1,039g RPMI, 0,26g HEPES, 0,2g Bicarbonato de Sódio *q.s.p.* 100mL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 2mM L-glutamina (Invitrogen) e 1% penicilina/streptomicina (100 unidades/mL) (Gibco). Após 48 horas, as células foram destacadas com solução de EDTA 10mM em 10mL de meio RPMI. As células foram recolhidas, contadas, ressuspensas em meio RPMI puro e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera saturada de água e 5% de CO₂.

3.2 Análise da viabilidade celular

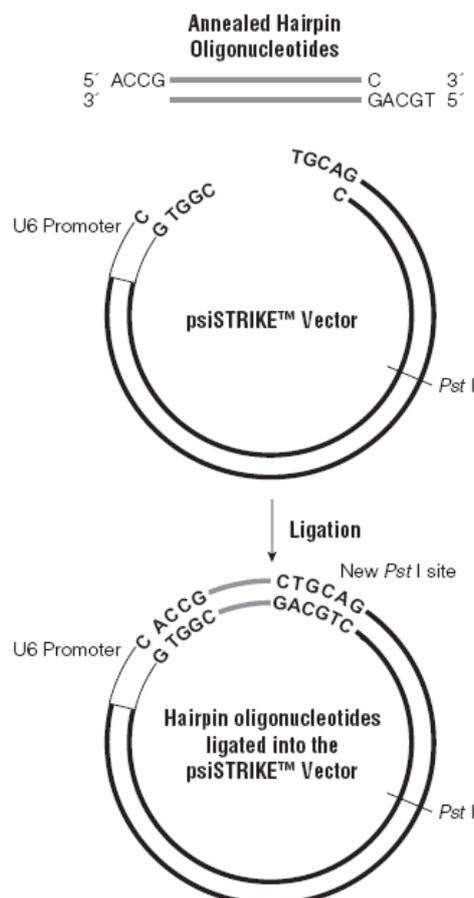
A viabilidade celular foi avaliada com a utilização do corante Azul de Trypan (Kruse e Patterson, 1973), onde a porcentagem de células viáveis pode ser determinada por exclusão da população de células mortas que são coradas pelo Azul de Trypan. As células foram ressuspensas em PBS (0,8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄). Quatro partes do corante 0,2% foram misturadas com uma parte de NaCl 4,25%. Para uma parte da solução de Azul de Trypan-NaCl adicionou-se uma parte da suspensão celular. Foram contadas 100 células no quadrante central da câmara de Neubauer. Finalmente, a porcentagem de células viáveis foi determinada pela relação entre o número de células viáveis pelo número de células viáveis mais células mortas multiplicado por 100.

3.3 Delineamento do shRNA (*short hairpin RNA*)

Três pares de oligonucleotídeos foram selecionados para diferentes regiões do cDNA da PKR murina (GenBank accession N°. M93567) correspondendo aos nucleotídeos 24-42 (shRNA anti-PKR-1), 320-338 (shRNA anti-PKR-2) e 998-1016 (shRNA anti-PKR-3) e dois pares de oligonucleotídeos correspondendo aos nucleotídeos 85-103 (shRNA anti-CXCR4-1) e 409-427 (shRNA anti-CXCR4-2) do cDNA do receptor de quimiocina CXCR4 (GenBank, Accession number BC031665). Cada shRNA contém uma fita senso de 19 nucleotídeos seguidos de um espaçador curto (**AAGTTCTCT**), a fita anti-senso e o sinal de terminação (**TTTTT**) para RNA polymerase III. As seqüências dos oligonucleotídeos sintetizados foram: shRNA anti-PKR-1: 5'- ACCGACGGAGGGCGAATAGATTT**AAGTTCTCT** AAATCTATTCGCCCT CCGTCTTTTTTC-3'; shRNA anti-PKR-2: 5'-ACCGAAACGCTGCAGCCAAATTA**AAGTTCTCTTAATTTGGCTGCAGCGTTTCTTTTTTC**-3'); shRNA anti-PKR-3: 5'-ACCGC AATCACGTCAACATTA**AAGTTCTCTAATGTTGACGTGATTGAGTCTTTTTTC** -3'; shRNA anti-CXCR4-1: 5'- ACCGCGATCAGTGTGAGTATATA**AAGTTCTCTT** ATATA CTCACACTGATCGCTTTTTTC-3'; shRNA anti-CXCR4-2: 5'- ACCGGTAAGGCT GTCCATATCAT**AAGTTCTCTATGATATGGACAGCCTTACCTTTTTTC**.

O delineamento dos oligonucleotídeos foi feito com auxílio do programa "Target Finder and Design Tool" disponível no website da Dharmacon (<http://www.dharmacon.com>), considerando-se a estrutura secundária tanto do shRNA como do cDNA da PKR e do CXCR4, a região de anelamento do oligonucleotídeo com o cDNA alvo, bem como outros critérios descritos por Elbashir e cols. (2001). As seqüências determinadas foram posteriormente analisadas pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) com o objetivo de se confirmar que o RNAm da PKR e o RNAm do receptor CXCR4

constituem os únicos alvos do shRNA anti-PKR e do shRNA anti-CXCR4, respectivamente. Como vetor de expressão utilizamos o psiSTRIKE U6 Hairpin Cloning System (Promega), um plasmídeo linearizado contendo o promotor eucariótico U6 reconhecido pela RNA polimerase III, o que permite a clonagem dos shRNAs e sua expressão em células de mamíferos. Utilizamos, como controle, um shRNA que não apresenta homologia com o RNAm da PKR ou do CXCR4 e cuja seqüência não esteja presente no genoma de camundongo. O shRNA controle é: 5'-ACCGAAGCGC TGCCGCGACGTTG **AAGTTCTCTCAACG** TCGCG GCAGCGCTTCTTTTTC-3'. A confirmação da clonagem de todos os shRNAs foi feita por digestão com *Pst* I (Promega). Os dois oligonucleotídeos (senso e antisenso) de cada shRNA foram pareados a fim de formar o inserto de DNA dupla fita, cujas terminações são complementares à extremidade do vetor psiSTRIKE U6 Hairpin Cloning System de acordo com o seguinte esquema:



3.4 Preparo das células competentes

A cepa DH5- α F' de *Escherichia coli* foi utilizada para transformação por choque térmico, com a finalidade de multiplicar a quantidade de plasmídeos.

As bactérias foram inoculadas em 3mL de Meio Luria-Bertani (LB - 1% Triptona, 0,5% Extrato de Levedura, 0,06% NaCl, 0,02% KCl), a partir do seu estoque e cultivadas por 12-24 horas a 37°C sob agitação. Uma alíquota de 2,5mL desta cultura foi inoculada em 50mL de LB e cultivada por 1,5 a 2,5 horas a 37°C, até que fosse atingida uma absorvância entre 0,4–0,5 em 550nm. A cultura foi então colocada em banho de gelo por 5 minutos, as células foram recolhidas por centrifugação (9000 \times g por 5 minutos a 4°C) e ressuspensas em 125mL de tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,5, contendo CaCl₂ 50mM. Esta mistura foi incubada em banho de gelo por 15 minutos, as células foram recolhidas por centrifugação, ressuspensas em 17,5mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5, contendo CaCl₂ 50mM e glicerol 15% (v/v), divididas em alíquotas de 200 μ L e mantidas a - 80° C.

3.5 Pareamento dos oligonucleotídeos

As fitas senso e antisenso de cada shRNA foram sintetizados separadamente e posteriormente diluídos em água milliQ Nuclease-Free para uma concentração final de 1 μ g/ μ L. A seguir, 2 μ L de cada fita (2 μ g) foram misturados e diluídos em tampão de anelamento para uma concentração final de 40ng/ μ L. A mistura foi então aquecida a 90°C durante 3 minutos e em seguida transferida para banho-maria a 37°C e incubada por 15 minutos. Os oligos anelados foram utilizados imediatamente para ligação no vetor psiTRIKE.

3.6 Clonagem

Os oligonucleotídeos pareados (5 μ L) foram diluídos em 45 μ L de água *nuclease-free* para uma concentração final de 4ng/ μ L. Cada oligonucleotídeo pareado foi então ligado *overnight* pela ação da enzima T₄ DNA ligase ao plasmídeo psiSTRIKE U6 Hairpin Cloning Systems (Tabela 1) fornecido na sua forma linearizada e assim não sendo assim necessária nenhuma manipulação prévia do vetor.

Tabela 1. Protocolo da reação de ligação do shRNA ao vetor psiSTRIKE

Reagentes	Ligação do inserto (PKR, CXCR4 ou controle)	Controle negativo
Tampão de ligação 2X	5 μ L	5 μ L
Vetor psiTRIKE (50ng/ μ L)	1 μ L	1 μ L
T4 DNA ligase (3 unidades/ μ L)	1 μ L	1 μ L
Água Nuclease-Free	2 μ L	3 μ L
Oligonucleotídeos anelados (4ng/ μ L)	1 μ L	---

Posteriormente, a reação de ligação (10 μ L) foi adicionada à 50 μ L de células de *E.coli* competentes, as quais foram incubadas em banho seco a 42°C por 45-50 segundos sem agitação e então imediatamente colocadas em banho de gelo por 2 minutos, a fim de submeter as células a um choque térmico necessário para abertura dos poros das bactérias e incorporação do DNA plasmidial. A seguir, foram adicionados às bactérias 950 μ L de meio LB líquido e os tubos incubados a 37°C por uma hora e meia sob agitação de 150rpm. Após este intervalo de tempo, uma alíquota de 50 μ L da cultura foi plaqueada em meio LB sólido (1% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, 0,06% NaCl, 0,02% KCl, 1,5% Ágar) acrescido de ampicilina

(50 μ g/mL), e incubadas por 18 horas a 37°C. Após este período as células transformadas foram transferidas para tubos falcon estéreis contendo 3mL de LB e 3 μ L de ampicilina (50 μ g/mL), tendo sido mantidas sob agitação a 37°C por cerca de 16 horas até atingirem uma absorbância de 0,4-0,5 em comprimento de onda de 550nm.

3.7 Extração de DNA plasmidial

Após o crescimento das bactérias selecionadas foi realizada a extração do DNA plasmidial com o kit FlexiPrep (Amersham). O método emprega o procedimento padrão de lise celular alcalina, incluindo tratamento com RNase e precipitação com isopropanol. O DNA plasmidial foi subseqüentemente purificado através da resina Sephaglas FP de acordo com as instruções do fabricante.

3.8 Digestão de DNA plasmidial

O controle da ligação foi feito mediante a digestão com a enzima de restrição *Pst* I (Tabela 2). A inserção do oligonucleotídeo no vetor psiSTRIKE cria um segundo sítio de restrição dessa enzima, permitindo que a digestão resulte em dois fragmentos (959bp e 2299bp) facilmente visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídeo.

Tabela 2. Protocolo da reação de digestão do DNA plasmidial

Reagentes	Quantidade
DNA	1 μ g
Tampão	1 μ L
<i>Pst</i> I	1 μ L
Água milliQ	<i>q.s.p</i> 10 μ L

3.9 Preparo do complexo lipofectamina-shRNA

Antes da transfecção, 30µg de cada shRNA e 30µL de lipofectamina 2000 foram diluídos separadamente em 750µL de meio RPMI sem soro fetal bovino e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir foram misturados e incubados à temperatura ambiente por 20 minutos para formação do complexo lipofectamina-shRNA. O meio de cultura foi então removido e o complexo lipofectamina-shRNA foi adicionado à cultura. A eficiência da transfecção foi avaliada por meio do plasmídeo pEGFP (Invitrogen) que expressa GFP (*green fluorescent protein*).

3.10 Transfecção de células de melanoma B16-F10

Células de melanoma B16-F10 foram plaqueadas em garrafas de cultura de 75cm² (7 x 10⁵ células/garrafa). As células foram incubadas *overnight* e ao atingirem uma confluência de cerca de 70-80% as células tumorais foram transfectadas com 30µg de DNA plasmidial expressando shRNA específicos para regiões diferentes do RNA mensageiro da PKR (shRNA anti-PKR-1, shRNA anti-PKR-2 ou shRNA anti-PKR-3), shRNA específicos para CXCR4 (shRNA anti-CXCR4-1 ou shRNA anti-CXCR4-2) ou shRNA controle e 30µL de lipofectamina 2000 (Invitrogen) por 5 horas. Cloroquina foi adicionado ao meio (2mg/mL), droga que inibe a acidificação dos endossomos, aumenta a eficiência da transfecção e inibe a ativação da resta imune inata. A seguir, as células foram lavadas com PBS, ressuspendidas em meio RPMI puro sendo feita extração de RNA de uma parte da cultura (tempo de 5 horas) e a outra parte cultivadas até completar 24 ou 48 horas. Após estes períodos de incubação, as células tumorais transfectadas foram utilizadas para a extração de RNA e preparo de extratos celulares para a análise da

expressão da PKR e CXCR4 por RT-PCR semi-quantitativo e dos níveis de proteína por Western Blot, respectivamente.

3.11 Extração de RNA

Após os intervalos de tempos determinados de 5, 24 e 48 horas de transfecção, foi extraído o RNA celular total com Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Foi adicionado ao precipitado de células clorofórmio para desproteinização e após centrifugação, o RNA celular presente na fase aquosa foi transferido para um microtubo de 1,5mL estéril RNase-free, precipitado com isopropanol, centrifugado à 10000rpm em temperatura de 5°C durante 10 minutos e posteriormente lavado com etanol 70%.

3.12 Dosagem de RNA

O RNA utilizado nos ensaios foi seco em corrente de nitrogênio gasoso para retirar o excesso de etanol 70%. As concentrações de RNA foram determinadas por espectrofotometria em um comprimento de onda de 260nm (uma unidade de absorbância à 260nm equivale à 40µg de RNA/mL). Foram também realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 220 e 280nm. Foram utilizadas nos experimentos, as preparações de RNA que apresentaram relações de absorbância $220/260 = 0,65 - 0,80$ e $260/280 = 1,9 - 2,0$, pois são consideradas livres de fenol e de proteínas, respectivamente (White e De Lucca, 1977). A integridade das preparações de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% na presença de brometo de etídeo. As amostras íntegras foram utilizadas posteriormente para RT-PCR semi-quantitativo.

3.13 Eletroforese de RNA

Um micrograma de RNA foi ressuspendido em 5 μ L de água DEPC (dietilpirocarbonato) e então diluído em solução de amostra (Tabela 3) na proporção de 1:1 (v/v). A amostra foi então aquecida por 2 minutos em banho seco à 95°C e em seguida colocada em banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente foi acrescentado 1,5 μ L de tampão de aplicação da amostra (Tabela 4), 0,5 μ L de brometo de etídeo (1mg/mL) e a seguir aplicado em gel de agarose desnaturante 1% (15,5mL de água milliQ, 4,5mL de formaldeído 12,3M, 5,0mL de tampão MOPS (Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico) (5X) (Tabela 5) .

Tabela 3. Composição da solução da amostra

Reagentes	Volume (μ L)
Tampão MOPS 5X	100
Formaldeído	200
Formamida	500

Tabela 4. Composição do Tampão de Aplicação da amostra

Reagentes	Volume (μ L)
MOPS 5x	320
Formamida	720
Formaldeído	260
Glicerol 80%	100
Água Destilada	20
Azul de Bromofenol	80

Tabela 5. Composição do Tampão MOPS 5X (pH7)

Reagentes	Volume (mL)
MOPS	20,6
NaOAc 50mM	800
EDTA 0,5M	10
Água milliQ	1000
NaOH 2N	<i>q.s.p.</i> pH 7,0

3.14 Reação de transcrição reversa

A partir de uma quantidade inicial de 1,2 μ g de RNA total foi realizada reação de transcrição reversa em volume de reação de 25 μ L. As condições do RT foram 5 minutos de denaturação a 65°C, 60 minutos a 37°C e 5 minutos a 75°C em termociclador (PCR-Sprint ThermoHybaid). A reação foi feita com 0,5 μ g de oligonucleotídeo iniciador Oligo d(T) (Invitrogen), 1 unidade da enzima transcriptase reversa MMLV, 1 unidade de inibidor de RNase (Invitrogen), 1 unidade de DNase (Invitrogen), 5 μ L tampão 5x e 4 μ L MgCl₂ (Promega).

3.15 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Com o objetivo de analisar a degradação do RNAm da PKR e CXCR4 foi feito RT-PCR semiquantitativa a partir das amostras de RNA obtidas das células B16-F10 transfectadas com shRNA anti-PKR-2, shRNA anti-CXCR4 ou shRNA controle, usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os gene de interesse.

Primeiramente, foram utilizado oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene constitutivo da β -actina, a fim de avaliar a qualidade da amostra. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram delineados com base na seqüência armazenada no GenBank (Accession number BC014861), cujas seqüências são: 5'-TGGAAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' (senso) e 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAA CAGTCCG-3' (antisenso). As condições de PCR para a β -actina foram: um ciclo de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e finalmente 1 ciclo de 10 minutos de alongamento a 72°C em termociclador (PCR-Sprint Hybaid).

A próxima etapa foi investigar a degradação do RNA mensageiro da PKR (GenBank, Accession number BC014861) tendo sido utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: 5'-GTGGACATCTTTGCTTTGGGCCTT-3' (senso) e 5'-TGTTCTCCAT TCAGCCAAGGTCT-3' (anti-senso). As condições de PCR para PKR foram: um ciclo de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 67°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e finalmente 1 ciclo de 10 minutos de alongamento a 72°C.

Para avaliar a degradação do RNA mensageiro do receptor CXCR4 (GenBank, Accession number BC031665) foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: 5'-ACAGGTACATCTGTGACCGCCTTT-3' (senso) e 5'-TGCT CTCGAAGTCACATCCTTGCT-3' (anti-senso).

As condições de PCR para CXCR4 foram: um ciclo de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e finalmente 1 ciclo de 10 minutos de alongamento a 72°C.

3.16 Eletroforese de DNA

Os produtos de PCR da β -actina (364bp), PKR (290bp) e CXCR4 (291bp) foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (89mM Tris, 89mM Ácido bórico, 2mM EDTA) com brometo de etídeo durante 1 hora à 100V.

3.17 Obtenção de extrato de células de melanoma B16-F10

As células B16-F10 incubadas em RPMI contendo 10% de soro fetal foram recolhidas, lavadas e lisadas, em banho de gelo, com tampão A (Tris-HCl 20mM, pH 7,6, contendo KCl 50mM, NaCl 400mM, 2-mercaptoetanol 5mM, Triton X-100 1%, EDTA 1mM, fenilmetilsulfonilfluoreto 0,2 mM, aprotinina (100 unidades/mL) e 20% de glicerol (v/v)). A seguir, o lisado foi centrifugado a 12.000 χ g durante 20 minutos à 4°C e o sobrenadante recolhido e mantido à -70°C.

3.18 Solubilização de proteína transmembrana

Uma vez que o receptor de quimiocina CXCR4 é uma proteína transmembrana, foi necessária a solubilização da proteína do precipitado obtido após centrifugação.

As células B16-F10 foram destacadas com 10mM de EDTA em RPMI sem soro fetal bovino e centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos. A seguir o precipitado foi ressuspenso em 300 μ L de PBS gelado com 2% PMSF, 0,1% de aprotinina e 0,1% de leupepsina e 1% de Triton. A amostra foi incubada em banho de gelo por 20

minutos sob agitação constante. Posteriormente foi centrifugada por 20 minutos à 12000 rpm na temperatura de 4°C e a proteína solubilizada dosada pelo método de Cadman (1979).

3.19 Dosagem de proteína

A dosagem de proteína dos extratos obtidos a partir das células tumorais B16-F10 transfectadas com shRNA controle, shRNA específico para PKR, bem como das células não submetidas a transfecção, foi feita pelo método de Lowry . Os extratos obtidos com o tampão A foram diluídos na proporção de 1:50 em um volume final de 200µL. A seguir foi acrescentado 1000µL de solução A (Tabela 6). A amostra foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e então adicionado 100µL de Folin Ciocalteau na proporção de 1:1. Após incubação por 30 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 660 nm.

Tabela 6. Composição da Solução A do método de Lowry

<i>Reagentes</i>	<i>Volume</i>
Na ₂ CO ₃ 2% em NaOH 0,1N	50mL
CuSO ₄ 1%	500µL
Tartarato de Sódio e Potássio 1%	500µL

Dosagem de proteína com detergente

O extrato solubilizado com detergente contendo a proteína CXCR4 foi dosado pelo método de Cadman (1979). Foram misturados 350µL de amostra (diluída 1:50 em água milliQ) com 500µL de solução A, composto por volumes iguais das soluções A1, A2, A3, A4 (Tabela 7). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir foram adicionados 250µL de SDS 20% e a amostra foi agitada. Posteriormente adicionou-se 50µL do reagente de Folin Ciocalteu diluído 1:1 e após agitar bem a amostra foi incubada por mais 15 minutos à temperatura ambiente. Ao final desse tempo as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500nm.

Tabela 7. Composição da Solução A do método de Cadman

	Reagentes	Concentração
A1	Na ₂ EDTA	0,234g <i>q.s.p</i> 250mL
A2	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.157g <i>q.s.p</i> 250mL
A3	Na ₂ CO ₃	8%
A4	NaOH	0,4M

3.20 Eletroforese de proteína

Trinta microgramas dos extratos das células B16-F10 foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 10% (Tabela 8 e 9), corado com Comassie Blue (Comassie 0,25%, Metanol 50%, Ácido Acético 7%) e descorado com solução descorante (Ácido Acético 10%, Etanol 30%) a fim de se confirmar a integridade das amostras controle e transfectadas.

Tabela 8. Protocolo utilizado no preparo do Gel de Empilhamento

Reagentes	Volume (μL)
Tampão Tris-HCl pH6,8 - 0,5M	1000
Acilamida-Bis 30%/0,8%	665
Água milliQ	2210
SDS 4%	100
Temed	5
Persulfato	20

Tabela 9. Protocolo utilizado no preparo do Gel de Separação (10%- com SDS)

Reagentes	Volume (μL)
Tampão Tris-HCl pH8,8 2,25mM	1500
Acilamida-bis 30%/0,8%	3000
SDS 40%	225
Água milliQ	4237
Temed	3,75
Persulfato	37,5

3.21 Transferência

Para a imunodeteção da PKR total, PKR fosforilada, CXCR4, β -actina e I- κ B β , foi realizada, após eletroforese, a transferência do extrato para membrana de nitrocelulose (Amersham) durante 4 horas à 35V (Tabela 10).

Tabela 10. Composição do Tampão de Transferência

Reagentes	Quantidade
Tris	3,94g
Glicina	18,8g
SDS 10%	13mL
Etanol	240mL
Água destilada	<i>q.s.p.</i> 1300mL

3.22 Imunodeteção da PKR total, PKR fosforilada (PKR-P), I- κ B β e CXCR4

As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 10% em TBS (20mM Tris, 500mM NaCl)-Tween 20 (0,05%) *overnight* à temperatura ambiente e então lavadas com TBS-Tween 20. As membranas foram posteriormente incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-PKR (1:300), anticorpo policlonal de coelho anti-I- κ B β (1:300), anticorpo policlonal de coelho anti-CXCR4 (1:250) (Santa Cruz Biotecnologia) ou anticorpo policlonal de coelho anti-PKR [pT⁴⁵¹] (1:1000) (BioSource) diluídos em TBS-Tween 20 (0,05%) durante 90 minutos à temperatura ambiente e então lavadas 3 vezes com TBS-Tween 20 (0,05%) por 10 minutos cada. Adicionou-se anticorpo anti-IgG de camundongo ou anti-coelho conjugado com peroxidase (Santa Cruz) na diluição de 1:500 (CXCR4), 1:1000 (I- κ B β), 1:2000 (PKR), 1:20000(PKR-pT⁴⁵¹) por 1 hora sob agitação, seguida de 3 lavagens com TBS-Tween 20 (0,05%) por 10 minutos cada. As membranas foram incubadas com as soluções do kit ECL (Amersham) por 5 minutos e acondicionadas em cassette (Kodak) em presença de Hiperfilm (Amersham), que após a sensibilização foi revelado em processador X-Omatic. A quantificação das bandas da PKR e CXCR4 referentes ao PCR e Western Blot foi feita utilizando o software ImageQuant versão, 3.3 e os resultados foram expressos em termos de porcentagem. O nível da proteína

PKR e CXCR4 nas células B16-F10 incubadas com meio foi considerado 100%. Resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos e as bandas são representativas de um experimento.

3.23 Imunodeteccção da β -actina

Western Blot de um segundo gel com concentrações idênticas das amostras foi realizado utilizando-se anticorpo anti β -actina e a deteccção foi feita como descrito para PKR. Para deteccção da β -actina foi utilizado anticorpo primário anti- β -actina (Santa Cruz) na diluição de 1:400 e anti-IgG de camundongo (Promega) conjugado com peroxidase na diluição de 1:2500.

3.24 Animais

Foram utilizados camundongos machos isogênicos C57BL/6 (20-25g) obtidos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. O desenvolvimento do presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (certificado No. 062/2006) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

3.25 Modelo de tumor subcutâneo

As células B16-F10 cultivadas em meio RPMI e transfectadas com vetor psiSTRIKE shRNA anti-PKR-2, shRNA anti-CXCR4-1 ou controle foram inoculadas, pela via subcutânea, em camundongos C57BL/6 (4×10^5 células/animal). Após 14 dias, os camundongos C57BL/6 foram sacrificados por deslocamento cervical e o tumor removido e pesado em balança analítica Sartorius supermicro, modelo S4, Goettingen, Germany.

3.26 Injeção intratumoral dos plasmídeos shRNA anti-PKR e shRNA anti-CXCR4

As células B16-F10 provenientes da cultura foram inoculadas, pela via subcutânea, em camundongos C57BL/6 (4×10^5 células/animal). Após 7 dias da inoculação das células os camundongos receberam uma dose única intratumoral de 2µg dos plasmídeos shRNA anti-PKR-2, shRNA anti-CXCR4-1 ou shRNA controle. Após 14 dias da inoculação das células B16-F10, os camundongos C57BL/6 foram sacrificados por deslocamento cervical e o tumor removido e pesado.

3.27 Modelo de Colonização Pulmonar

As células B16-F10 foram injetadas via retro-orbital em camundongos C57BL/6 (10^5 células/animal). Estes animais foram separados randomicamente em grupo controle (tratado com shRNA não específico), grupo tratado com shRNA específico para o gene da PKR ou com shRNA específico para o gene do CXCR4, sendo 10 animais por grupo. Os camundongos foram sacrificados 21 dias após a injeção de células tumorais e os nódulos pulmonares contados com auxílio de uma lupa de dissecação.

3.28 Administração endovenosa do plasmídeo shRNA anti-CXCR4

As células B16-F10 foram injetadas por via retro-orbital em camundongos C57BL/6 (10^5 células/animal). Estes animais foram separados randomicamente em grupos de 10 animais. Dez microgramas do plasmídeo psiSTRIKE (shRNA controle, shRNA anti-PKR-2 ou shRNA anti-CXCR4-1) foram diluídos em solução de glicose 10% na proporção 1:1 e a seguir misturados com jetPEI™ (Polyplus Transfection) na proporção de 1:1 e incubados à temperatura ambiente por 20 minutos (Boussif e

cols., 1995). O plasmídeo foi então injetado por via retro-orbital nos camundongos C57BL/6 12 horas após a inoculação das células B16-F10. Os camundongos foram sacrificados 21 dias após a injeção de células tumorais e os nódulos pulmonares contados com auxílio de uma lupa de dissecção.

3.29 Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o teste-*t* de Student. A diferença com valor de $p < 0,05$ foi considerada significativa.

4. Resultados

4.1 Identificação da PKR e do CXCR4 em células de melanoma B16-F10

A primeira etapa deste trabalho foi a identificação da expressão da PKR e do receptor CXCR4 em células de melanoma murino B16-F10 através da análise da expressão gênica por RT-PCR. A integridade das preparações de RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1%. A figura 1 mostra o perfil eletroforético das amostras íntegras com os picos característicos do RNA ribossômico 28S e RNA ribossômico 18S.

Uma vez confirmada a integridade da amostra, utilizamos a técnica de RT-PCR semi-quantitativo a fim de detectar o RNA mensageiro referente a PKR, CXCR4 e β -actina, que foi utilizada como controle da integridade do RNA e para posterior normalização dos resultados. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo (Figura 2).

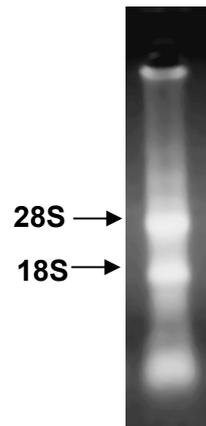


Figura 1: Integridade das amostras de RNA obtido de células de melanoma B16-F10. O RNA (1 μ g) foi submetido à eletroforese em gel de agarose desnaturante 1% na presença de brometo de etídeo por 1 hora a 100V. Em seguida foi realizada a transiluminação com luz ultravioleta e fotodocumentação.

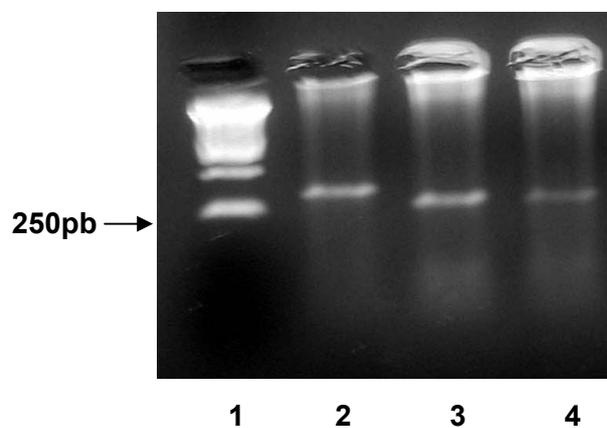


Figura 2: Expressão dos genes da PKR e CXCR4 em células de melanoma B16-F10 através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo. (1) Marcador molecular de 250pb, (2) β -actina (364pb), (3) CXCR4 (291pb), (4) PKR (290pb).

4.2 Extração de DNA plasmidial

Depois do anelamento dos oligonucleotídeos senso e anti-senso de cada shRNA, clonagem e transformação das cepas DH5- α F' de *Escherichia coli* competentes, foi realizada a extração do DNA plasmidial através de lise celular alcalina e precipitação com isopropanol. O controle da ligação do DNA no vetor psiSTRIKE foi feito mediante a digestão com a enzima de restrição *Pst* I (Figura 3).

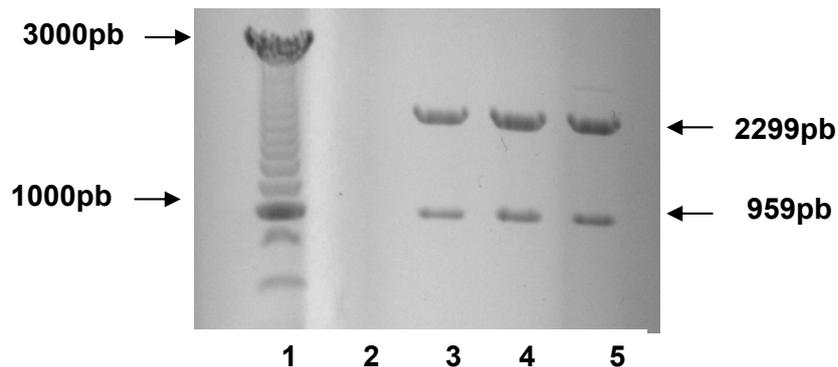


Figura 3: Controle da ligação dos shRNAs no vetor psiSTRIKE através da digestão do DNA plasmidial. Amostras de DNA plasmidial (1 μ g) extraídas com o kit flexiprep foram incubadas *overnigh* a 37°C com a enzima *Pst* I e então submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo por 50 minutos à 100V. (1) Marcador molecular de 100 pb, (2) controle negativo da reação de ligação, (3) shRNA controle, (4) shRNA anti-PKR-2, (5) shRNA anti-CXCR4-1.

4.3 Transfecção de células de melanoma B16-F10

Após obtenção das amostras de DNA plasmidial expressando os shRNAs específicos para PKR e CXCR4 foi feita a transfecção das células de melanoma B16-F10.

Com o objetivo de analisar o possível silenciamento gênico induzido pelos shRNAs específicos para PKR (shRNA anti-PKR-1, anti-PKR-2, anti-PKR-3) e CXCR4 (shRNA anti-CXCR4-1, anti-CXCR4-2) ao final de cada intervalo de tempo (5, 24 ou 48 horas) as células foram submetidas à extração de RNA pelo método do Trizol e preparo de extratos celulares com tampão A para a análise da expressão da PKR e CXCR4 por RT-PCR semi-quantitativo e Western Blot respectivamente. Uma alíquota das amostras de RNA foi submetida à eletroforese para confirmar sua integridade depois do processo de transfecção (Figura 4).

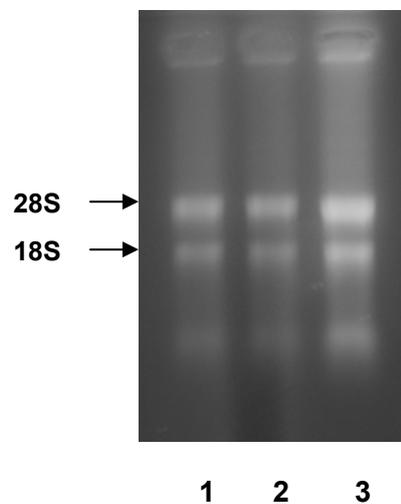


Figura 4: Integridade das amostras de RNA obtidos das células de melanoma B16-F10 transfectadas. Amostras de RNA (1µg) das células de melanoma B16-F10 transfectadas com shRNA controle (1) shRNA anti-PKR-2 (2) e shRNA anti-CXCR4-1 (3) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose desnatante 1% na presença de brometo de etídeo por 1 hora a 100V. Em seguida foi realizada a transiluminação com luz ultravioleta e fotodocumentação.

4.4 Análise do silenciamento gênico da PKR por RT-PCR semi-quantitativo

A expressão do gene da PKR das células transfectadas com os plasmídeos shRNA anti-PKR-1, shRNA anti-PKR-2, shRNA anti-PKR3 ou shRNA controle foi avaliada pelo método de transcrição reversa utilizando-se o primer oligo d(T). O cDNA obtido foi então utilizado na reação de PCR. A integridade das amostras foi ainda comprovada através da análise da expressão do gene constitutivo β -actina, utilizada posteriormente para normalização dos resultados.

Nossos resultados mostraram que apenas o vetor shRNA anti-PKR-2 reduziu significativamente a expressão da PKR *in vitro*. A figura 5A indica uma redução da expressão do RNA mensageiro da PKR de cerca de 58% após 5 horas de transfecção quando comparada com as células transfectadas com o shRNA controle, reduzindo para cerca de 82% após 24 horas (Figura 6 A) e 98% depois de 48 horas de transfecção com o shRNA anti-PKR-2 (Figura 7 A). O RT-PCR das células transfectadas com shRNA controle não apresentou variação significativa no nível da do RNAm da PKR (Figura 5 B, 6 B e 7 B respectivamente).

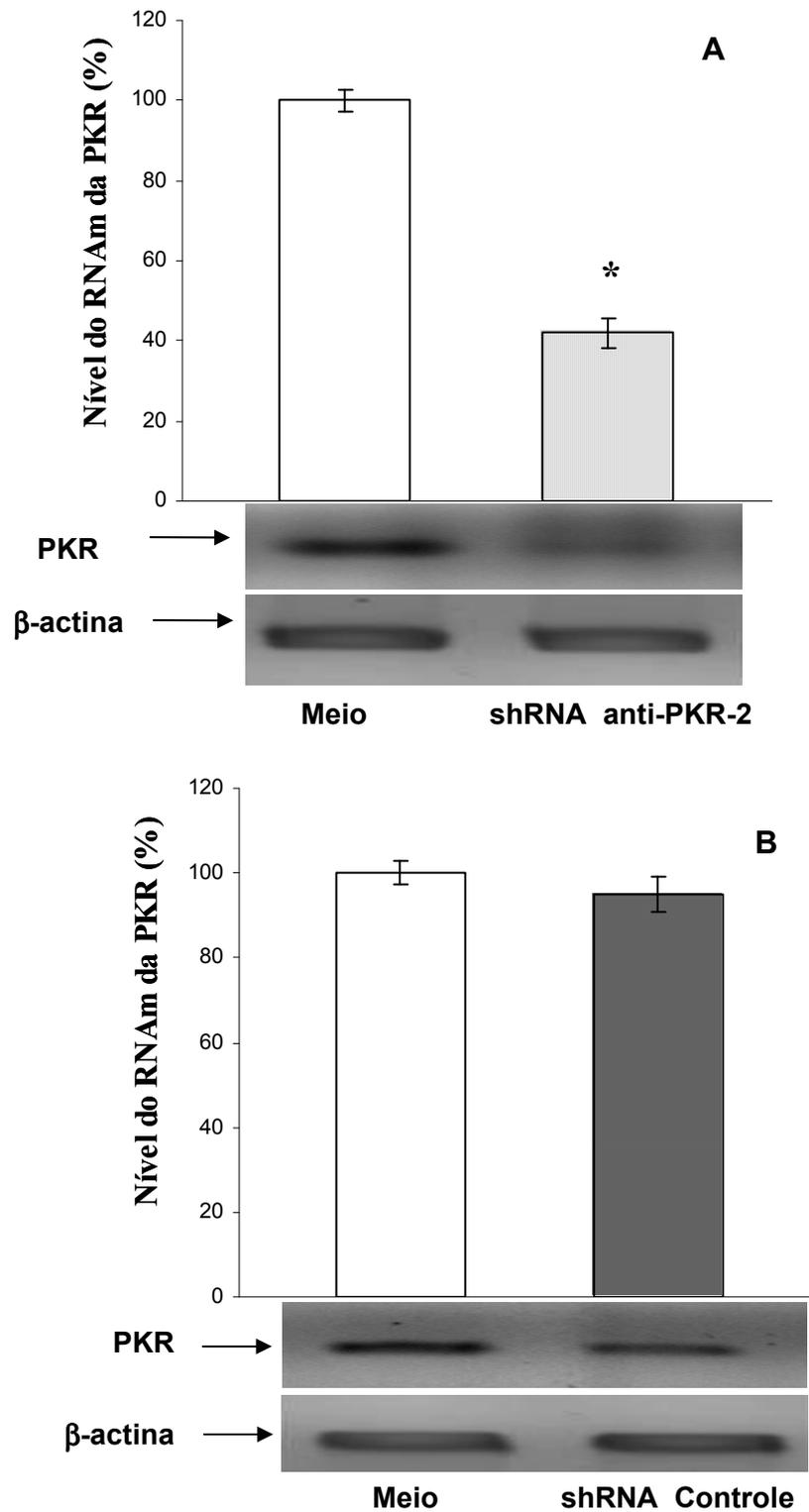


Figura 5: Redução da expressão do RNAm da PKR em células de melanoma B16-F10 após 5 horas de transfecção. Células foram transfectadas com auxílio de lipofectamina 2000 e 30µg do vetor psiSTRIKE expressando (A) shRNA anti PKR-2 ou (B) shRNA controle. Os produtos de RT-PCR referentes ao RNA mensageiro da PKR (290 pb) e β-actina (364 pb) foram obtidos 5 horas após transfecção e foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo. O RNAm da β-actina foi usado como controle. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ (teste-*t* de Student).

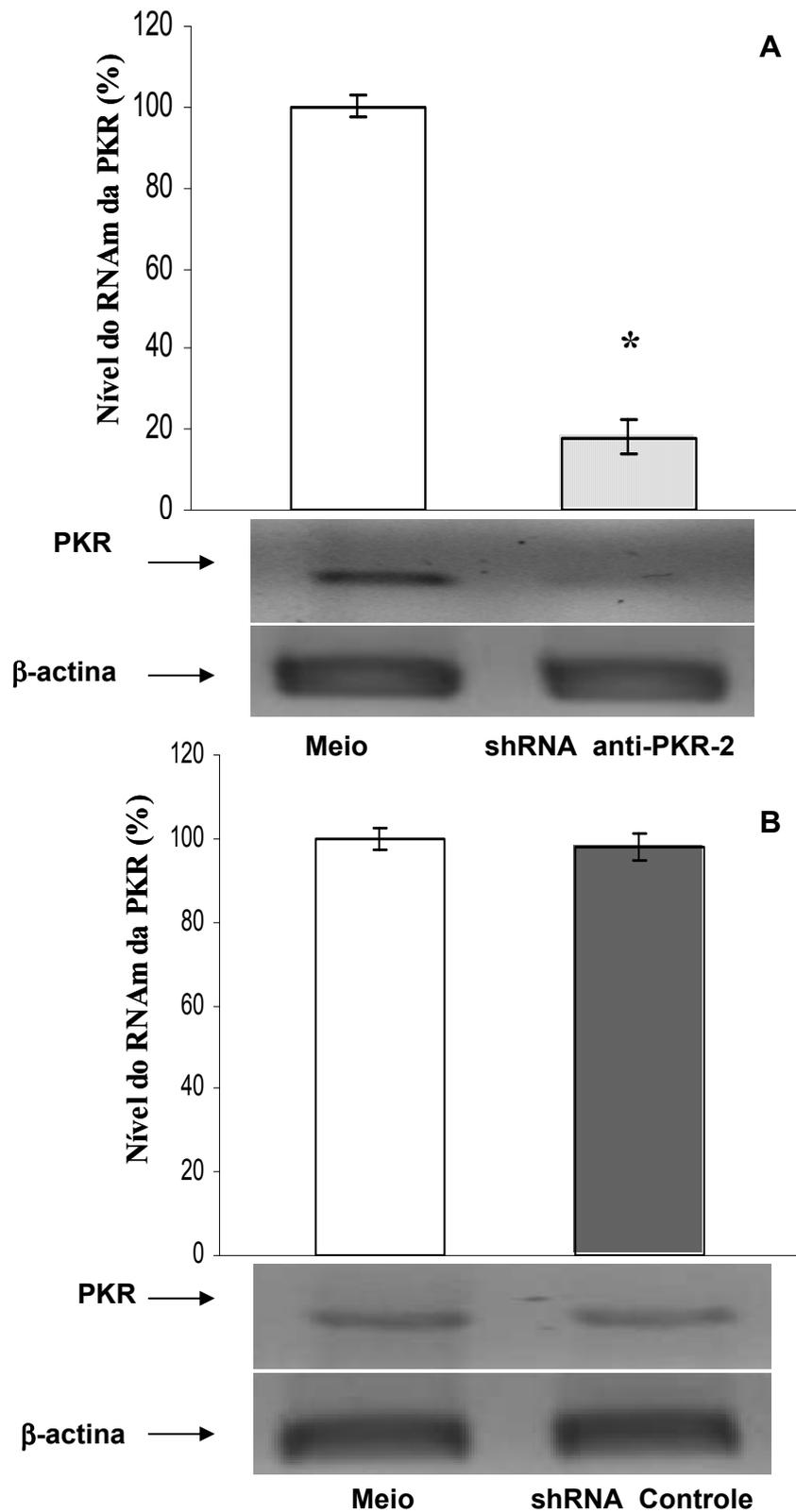


Figura 6: Redução da expressão do RNAm da PKR em células de melanoma B16-F10 após 24 horas de transfecção. (A) shRNA anti-PKR-2, (B) shRNA controle. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes.* $p < 0,001$ (teste- t de Student).

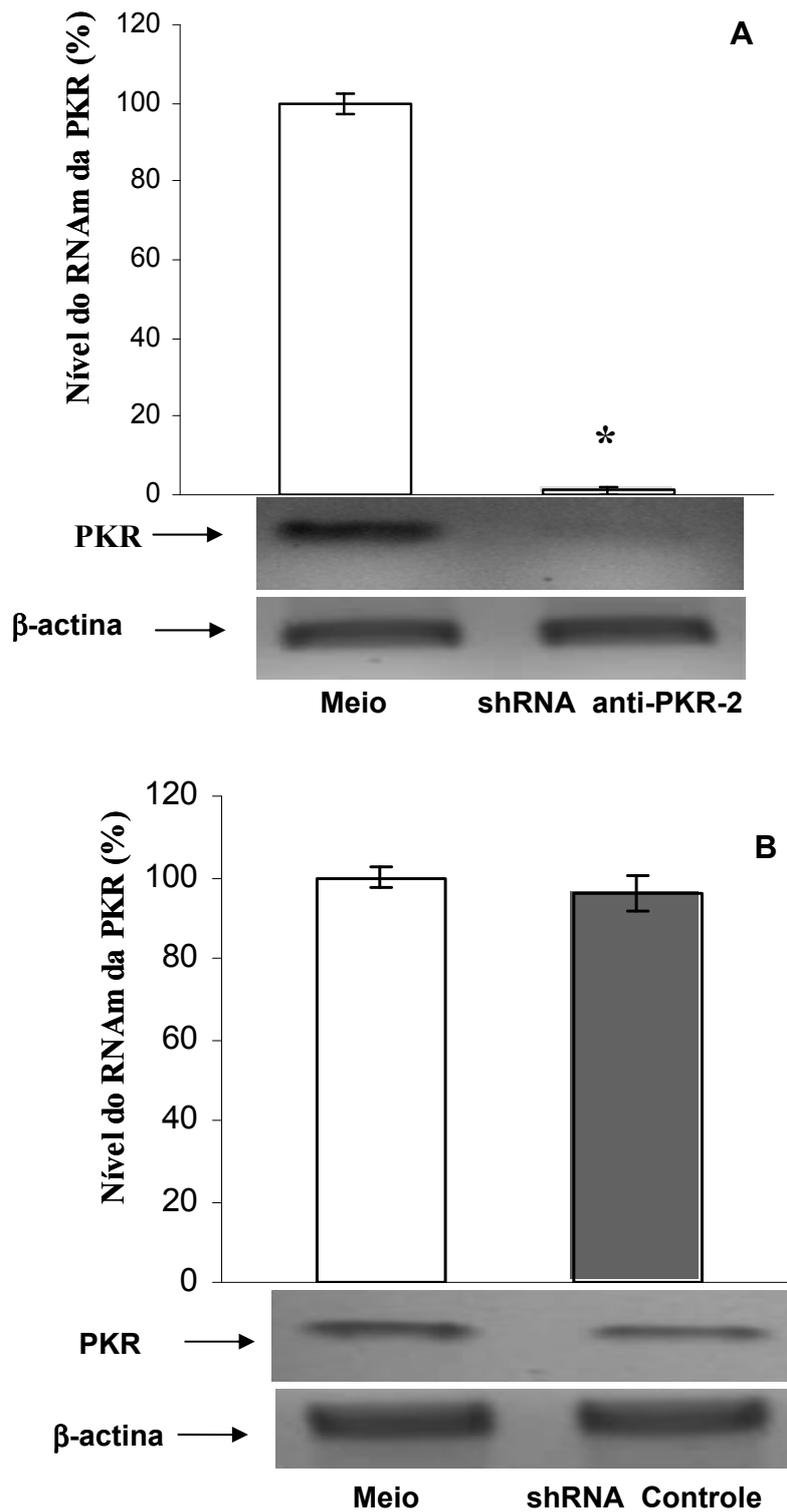


Figura 7: Redução da expressão do RNAm da PKR em células de melanoma B16-F10 após 48 horas de transfecção. (A) shRNA anti-PKR-2, (B) shRNA controle. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,001$ (teste- t de Student).

4.5 Análise do silenciamento da expressão da PKR por Western Blot

Além de analisar o efeito do silenciamento gênico da PKR por RT-PCR semi-quantitativo, foi feito extrato celular total das células transfectadas com vetor expressando shRNAs específicos para PKR (shRNA anti-PKR-1, anti-PKR-2 ou anti-PKR-3) ou shRNA controle ao final de cada intervalo de tempo (5, 24 ou 48 horas). Trinta microgramas do extrato celular foram primeiramente aplicado a um gel de acrilamida 10% a fim de se confirmar a integridade da amostra. Um segundo gel foi posteriormente aplicado a partir do qual foi feita a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (Amersham) e detecção por Western Blot.

A análise do Western Blot mostrou uma redução de 39,4% no nível da proteína PKR nas células B16-F10 transfectadas com o plasmídeo expressando shRNA anti-PKR-2 depois de 24 horas de transfecção e à 98% após 48 horas de transfecção (Figura 8 A). O Western Blot das células transfectadas com shRNA controle não apresentou variação significativa no nível da proteína PKR (Figuras 8 B). A transfecção com o vetor expressando shRNA anti-PKR-1 e anti-PKR-3 não apresentou efeito significativo na expressão do RNA mensageiro da PKR nem no nível da proteína. Western Blot de um segundo gel com concentrações idênticas das amostras foi realizado utilizando-se anticorpo anti β -actina e a detecção foi feita como descrito para PKR.

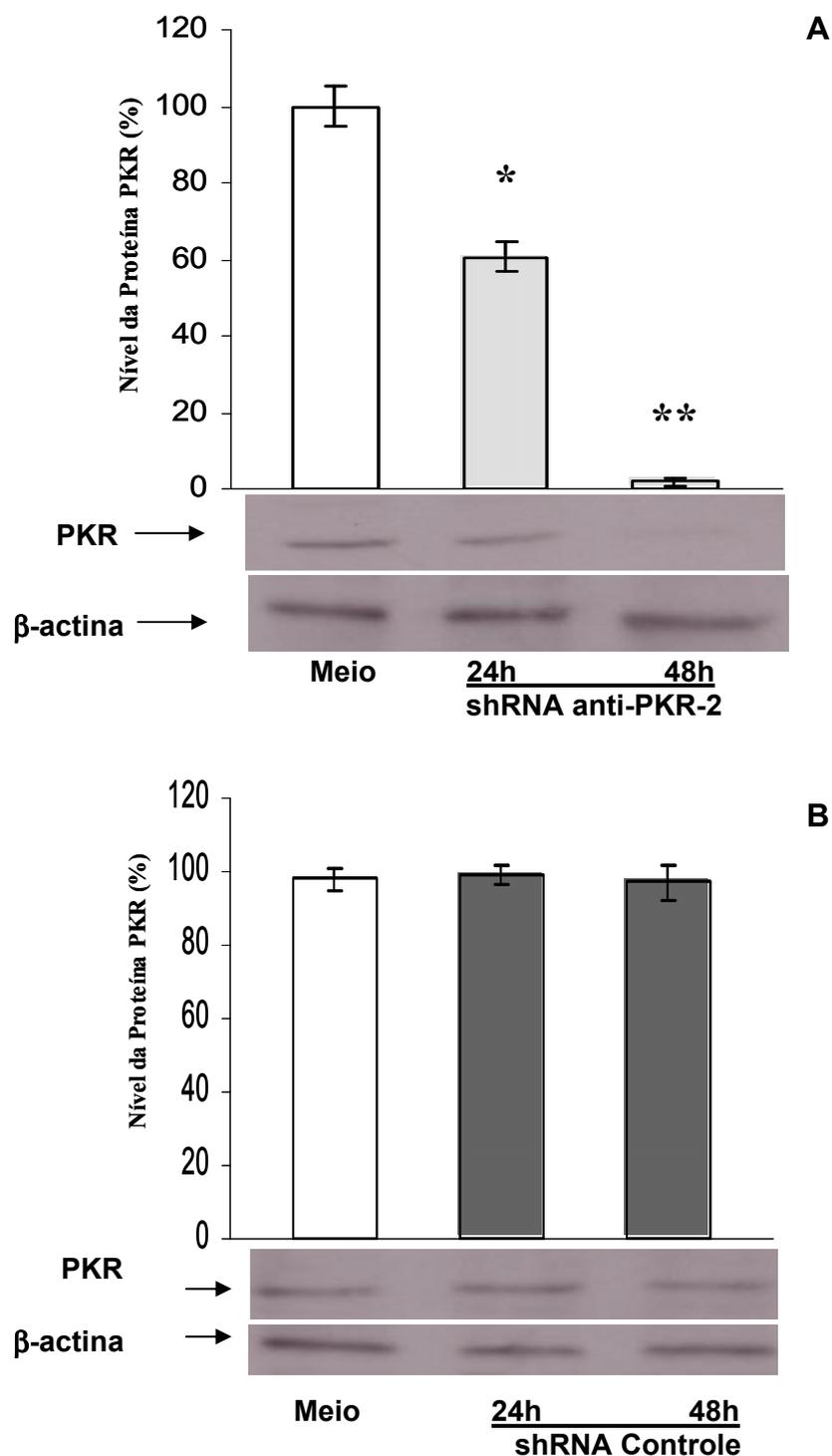


Figura 8: Nível da proteína PKR nas células melanoma B16-F10 transfectadas com o vetor shRNA anti-PKR-2. (A) Nível da proteína PKR nas células de melanoma B16-F10 após 24h e 48h de transfecção com shRNA específico para PKR (shRNA anti-PKR-2) ou **(B)** shRNA controle. A β -actina foi usada como controle. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (teste- t de Student).

4.6 Efeito do silenciamento da expressão da PKR sobre o desenvolvimento tumoral

Baseado nos nossos resultados *in vitro* da diminuição significativa do RNA mensageiro e dos níveis da proteína PKR, o plasmídeo shRNA anti-PKR-2 foi selecionado para os experimentos *in vivo*. As células B16-F10 (4×10^5 células/animal) transfectadas com o plasmídeo por 5 horas foram inoculadas via subcutânea em camundongos C57BL/6. A análise do peso tumoral indicou uma redução de 86% no crescimento tumoral dos animais inoculados com as células transfectadas com shRNA anti-PKR-2 quando comparado aos animais inoculados com as células transfectadas com shRNA controle (Figura 9).

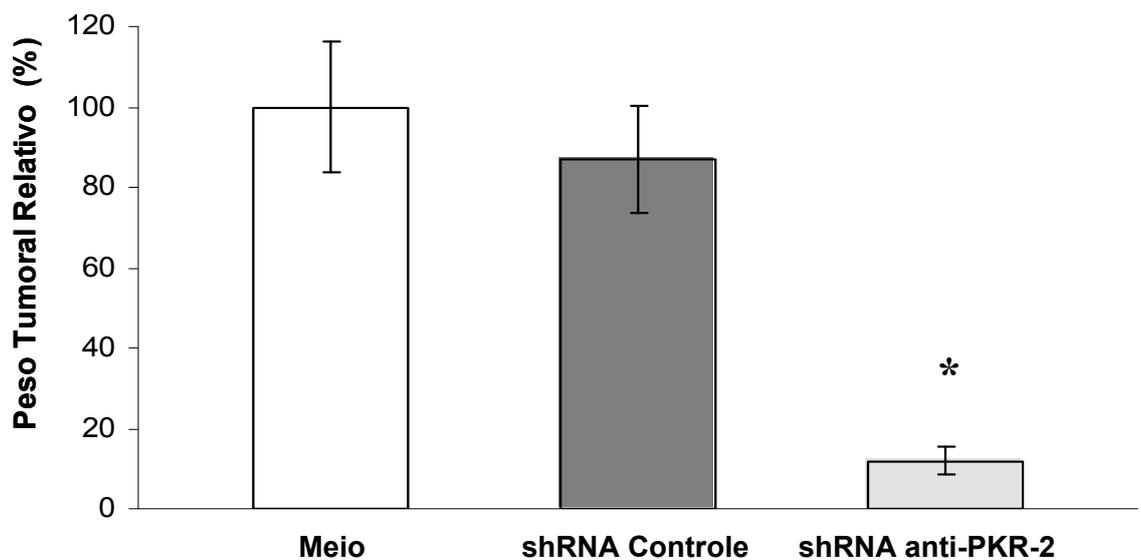


Figura 9: Efeito da transfecção das células de melanoma B16-F10 com o plasmídeo shRNA PKR-2 sobre o desenvolvimento tumoral. As células B16-F10 transfectadas em cultura com plasmídeo psiSTRIKE por 5 horas foram inoculadas, pela via subcutânea, em camundongos C57BL/6 (4×10^5 células/animal). Após 14 dias, os camundongos C57BL/6 foram sacrificados por deslocamento cervical e os tumores foram removidos e pesados. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ (teste-*t* de Student).

4.7 Injeção intratumoral do plasmídeo shRNA anti-PKR-2

Com base nos resultados da inoculação das células B16-F10 transfectadas o próximo passo foi avaliar a injeção intratumoral do plasmídeo expressando o shRNA anti-PKR-2 ou controle. Uma única dose (2 μ g) do plasmídeo foi injetada no tumor após o sétimo dia da inoculação via subcutânea das células B16-F10 (4x10⁵ células/animal). Após 14 dias da inoculação das células B16-F10, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e o tumor removido e pesado. A figura 13 mostra a redução significativa de cerca de 82% do peso tumoral após injeção de uma dose única do plasmídeo intratumoral.

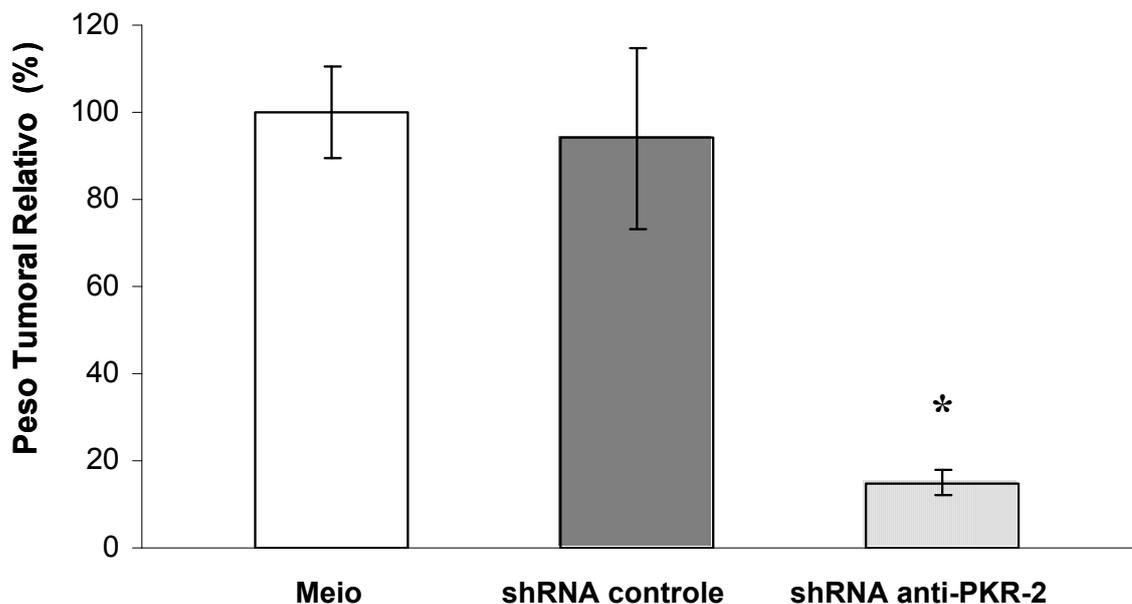


Figura 10: Efeito da injeção intratumoral do plasmídeo psiSTRIKE shRNA PKR-2 sobre o desenvolvimento do tumor subcutâneo em camundongos C57BL/6. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ (teste- t de Student).

4.8 Efeito do silenciamento da expressão da PKR sobre o potencial metastático das células de melanoma B16-F10

Após análise da influência das células B16-F10 transfectadas no desenvolvimento do tumor primário, as células transfectadas durante 5 horas com shRNA anti-PKR-2 ou shRNA controle foram inoculadas via retro-orbital em camundongos C57BL/6 a fim de se avaliar o efeito do silenciamento do gene da PKR no modelo de colonização pulmonar.

A figura 11 mostra que o número de nódulos metastáticos foi reduzido (cerca 95%) em camundongos transfectados com shRNA anti-PKR-2 quando comparado com animais inoculados com células incubadas apenas com meio RPMI ou transfectadas com shRNA controle. Resultados similares foram obtidos com células transfectadas com shRNA anti-PKR-2 durante 5 horas e então lavadas com PBS e mantidas em cultura por 24 e 48 horas.

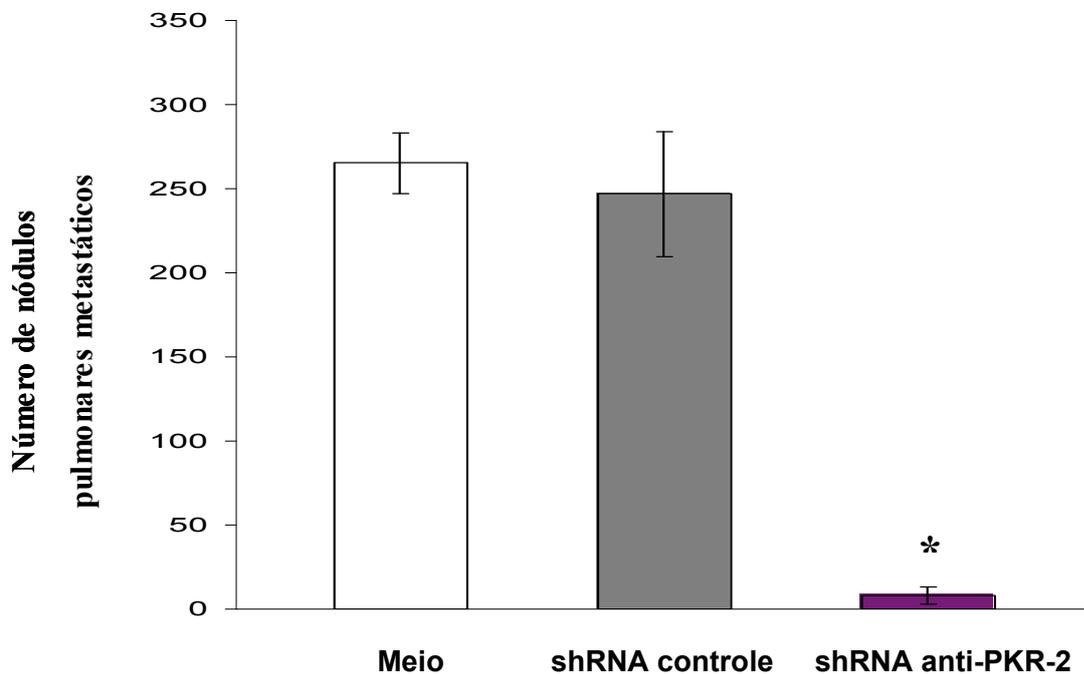


Figura 11: Efeito da transfecção das células de melanoma B16-F10 com o plasmídeo shRNA anti-PKR-2 sobre o seu potencial metastático pulmonar em camundongos C57BL/6. As células foram cultivadas em meio RPMI e transfectadas com shRNA anti-PKR-2 específico ou shRNA controle por 5 horas. Foram utilizados 10 camundongos por grupo. Cada animal recebeu 10^5 células melanoma B16-F10 incubadas com RPMI, shRNA específico para PKR ou shRNA controle. Os animais foram sacrificados no vigésimo primeiro dia e os nódulos pulmonares foram contados sob microscópio de disseção. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,001$ (teste- t de Student).

4.9 Efeito do silenciamento da expressão da PKR sobre a degradação do I- κ B β

A fim de tentar propor um mecanismo que permita explicar o efeito significativo do silenciamento da PKR no desenvolvimento do tumor primário e na diminuição do potencial metastático das células de melanoma B16-F10, avaliamos a fosforilação da PKR, e conseqüentemente sua ativação nos extratos das células transfectadas com shRNA anti-PKR-2 ou shRNA controle por 24 e 48 horas. A figura 12 mostra que as células transfectadas com shRNA anti-PKR-2 não apresentaram atividade da PKR mas níveis aumentados do inibidor I- κ B β ao passo que as células transfectadas com vetor expressando shRNA controle apresentaram alta atividade da PKR e ausência o inibidor I- κ B β .

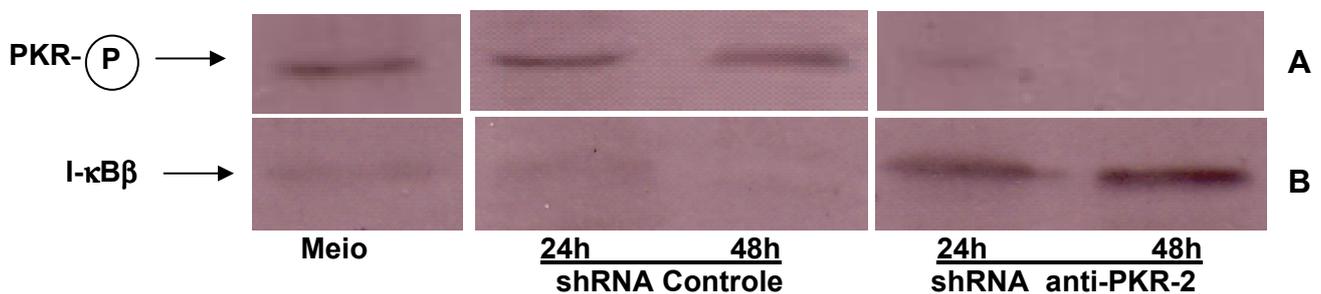


Figura 12: Níveis da PKR ativada (fosforilada) e do I- κ B β em células de melanoma B16-F10 transfectadas com plasmídeo shRNA anti-PKR-2. As células tumorais foram transfectadas com shRNA anti-PKR-2 por 24 horas ou 48 horas e os níveis da PKR autofosforilada (ativada) e do inibidor I- κ B β foram determinados por Western Blot. **(A)** Nível da PKR ativada em células tumorais após 24 e 48 horas de transfecção com shRNA anti-PKR-2. **(B)** Nível do inibidor I- κ B β em células tumorais após 24 e 48 horas de transfecção com shRNA controle.

4.10 Análise do silenciamento da expressão do receptor de quimiocina CXCR4 através de RT-PCR semi-quantitativo

A estratégia de silenciamento do CXCR4 foi a mesma utilizada para a PKR. Assim, depois de detectada a expressão do receptor de quimiocinas nas células B16-F10 foram empregados dois shRNAs para diferentes regiões do cDNA do CXCR4 (shRNA anti-CXCR4-1 e shRNA anti-CXCR4-2) a fim de tentar silenciar o gene alvo. As células foram transfectadas com shRNA anti-CXCR4-1, anti-CXCR4-2 ou shRNA controle e ao final de 5, 24 ou 48 horas foi feita extração de RNA para posterior análise da redução da expressão através de RT-PCR semi-quantitativo. A β -actina foi utilizada como controle da integridade da amostra e para posterior normalização dos dados obtidos.

Nossos resultados mostraram que apenas o vetor expressando shRNA anti-CXCR4-1 reduziu significativamente a expressão da PKR *in vitro*. A Figura 13 A indica uma redução de cerca de 35% na expressão do RNAm do CXCR4 após 5 horas de transfecção, tendo reduzido 52% após 24 horas (Figura 14 A) e 81% depois de 48 horas de transfecção com o shRNA anti-CXCR4-1 (Figura 15 B). O RT-PCR das células transfectadas com shRNA controle não apresentou variação significativa no nível da do RNAm do CXCR4 (Figura 13 B, 14 B e 15 B respectivamente).

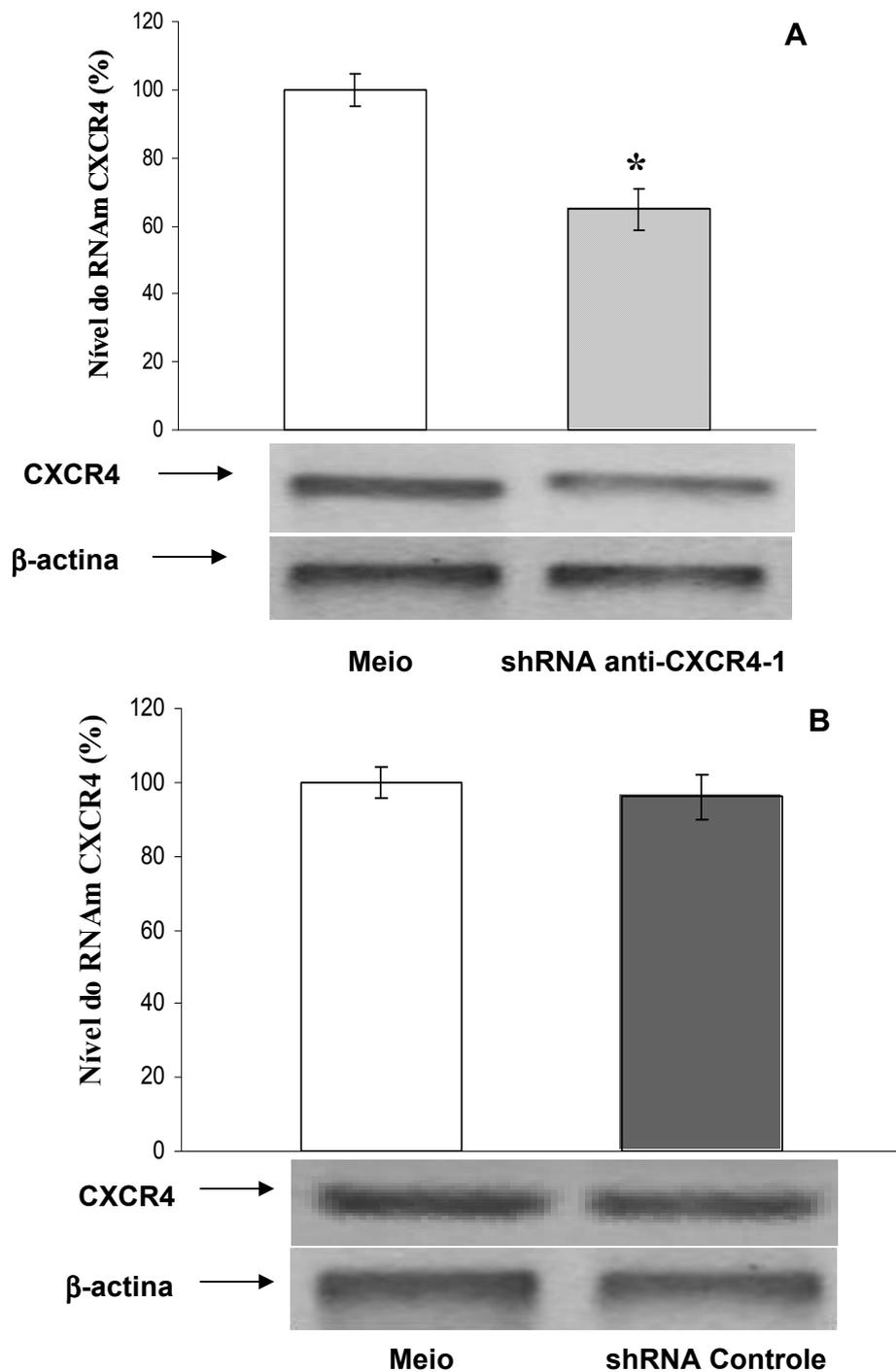


Figura 13: Redução da expressão do RNAm do CXCR4 em células de melanoma B16-F10 após 5 horas de transfecção. Células foram transfectadas com 30µg do vetor psiSTRIKE expressando (A) shRNA anti-CXCR4-1 ou (B) shRNA controle e 30µL de lipofectamina 2000. Produtos de RT-PCR referentes ao RNA mensageiro do CXCR4 (291pb) e β -actina (364pb) foram obtidos 5 horas após transfecção e foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo. RNA mensageiro da β -actina foi usado como controle. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ (teste- t de Student).

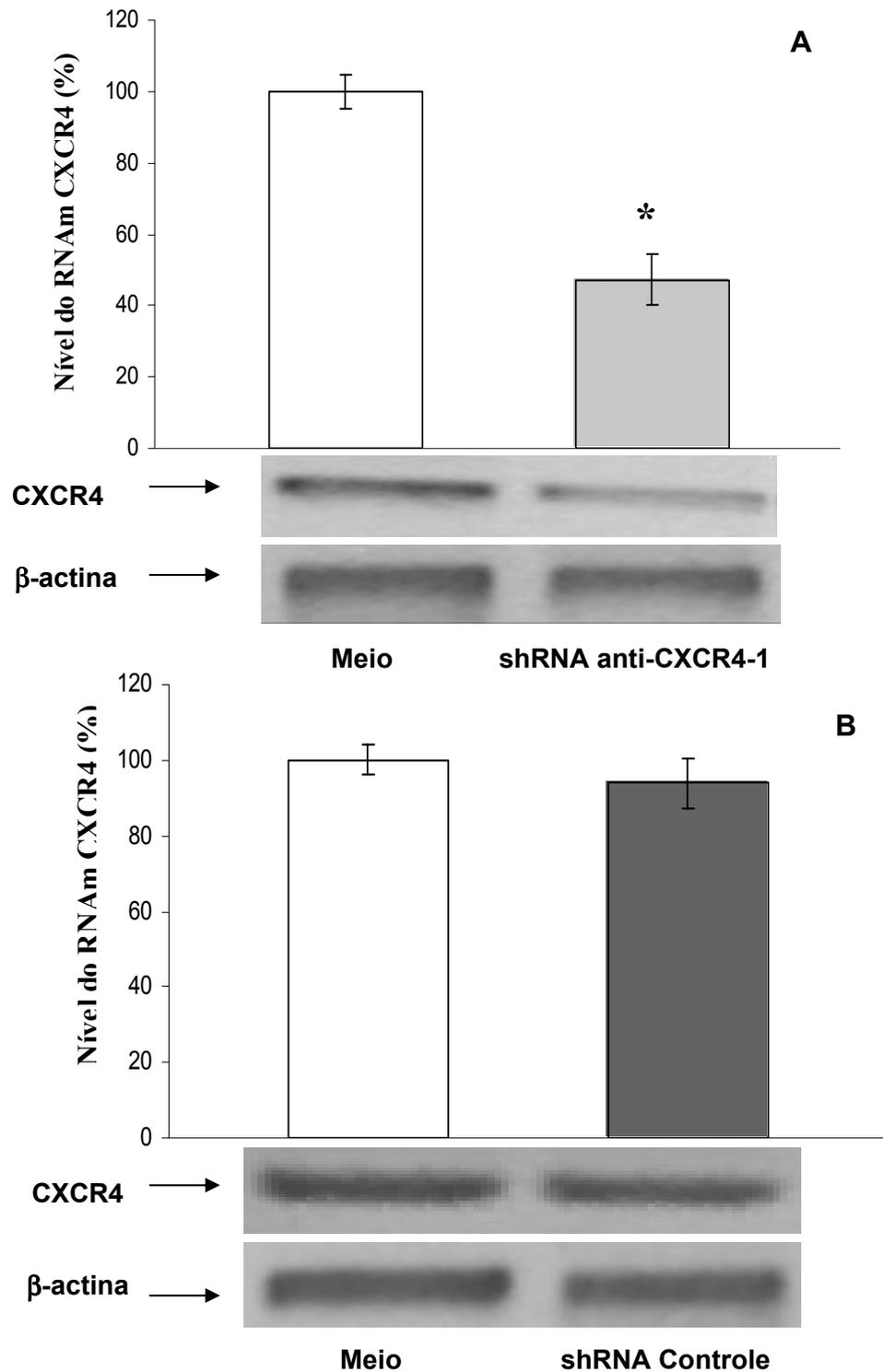


Figura 14: Redução da expressão do RNAm do CXCR4 em células de melanoma B16-F10 após 24 horas de transfecção. (A) shRNA anti-CXCR4-1 ou (B) shRNA controle. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ (teste- t de Student).

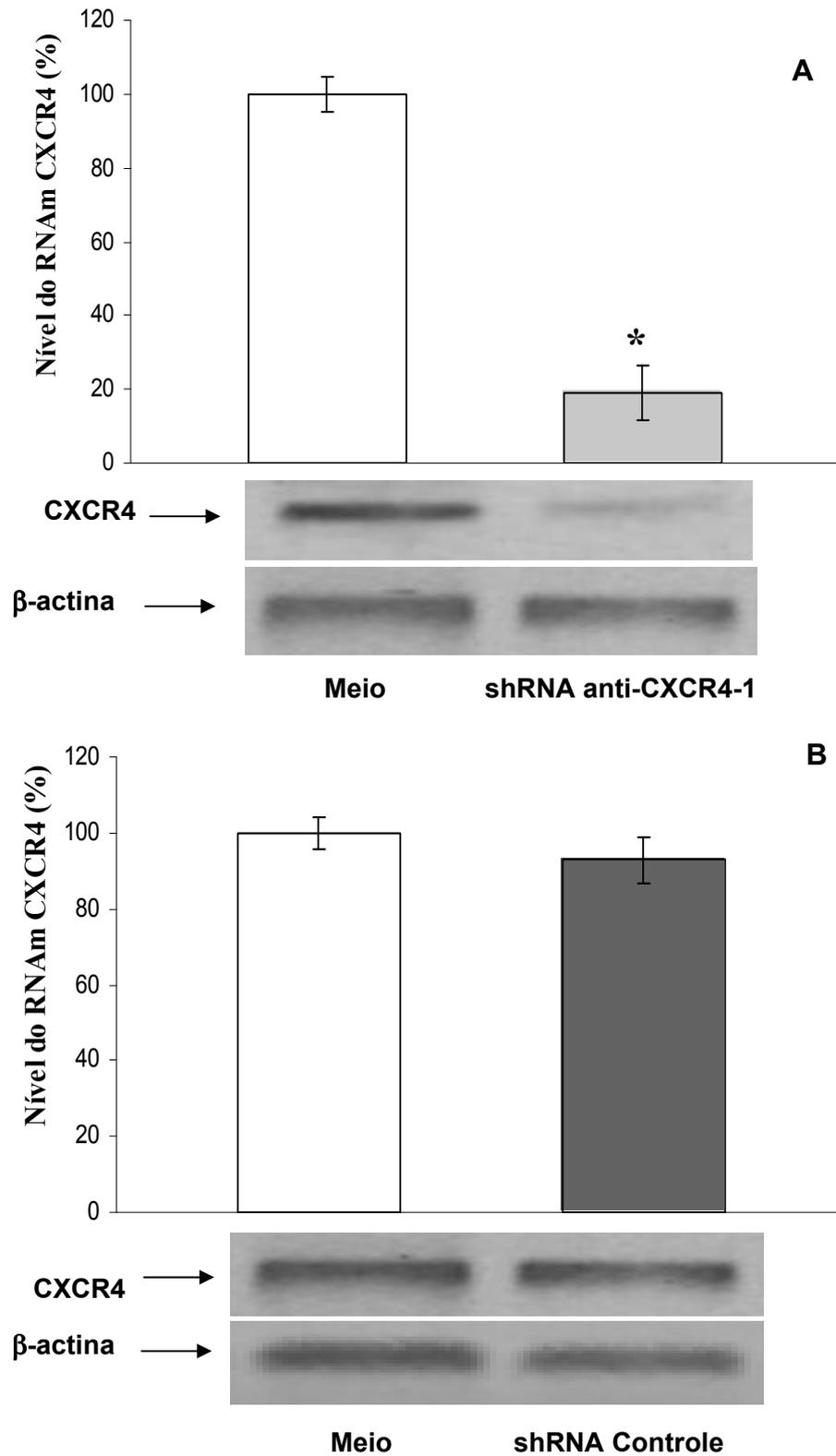


Figura 15: Redução da expressão do RNAm do CXCR4 em células de melanoma B16-F10 após 48 horas de transfecção. (A) shRNA anti-CXCR4-1 ou (B) shRNA controle. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,001$ (teste- t de Student).

4.11 Análise do silenciamento da expressão do CXCR4 por Western Blot

Depois da análise do silenciamento através do RT-PCR analisamos o nível da proteína a partir dos extratos obtidos das células B16-F10 transfectadas com shRNAs específicos para CXCR4 (shRNA anti-CXCR4-1 ou shRNA anti-CXCR4-2) ou shRNA controle. A análise do Western Blot mostrou que houve uma redução de 24% no nível da proteína CXCR4 nas células B16-F10 transfectadas com o plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 depois de 24 horas e uma redução de 68% após 48 horas de transfecção (Figura 16).

O Western Blot obtido com o extrato das células transfectadas com shRNA controle não apresentou variação significativa no nível da proteína PKR (Figuras 16 B) e a transfecção com o vetor shRNA anti-CXCR4-2 não apresentou efeito significativo na expressão do RNAm da PKR nem no nível da proteína.

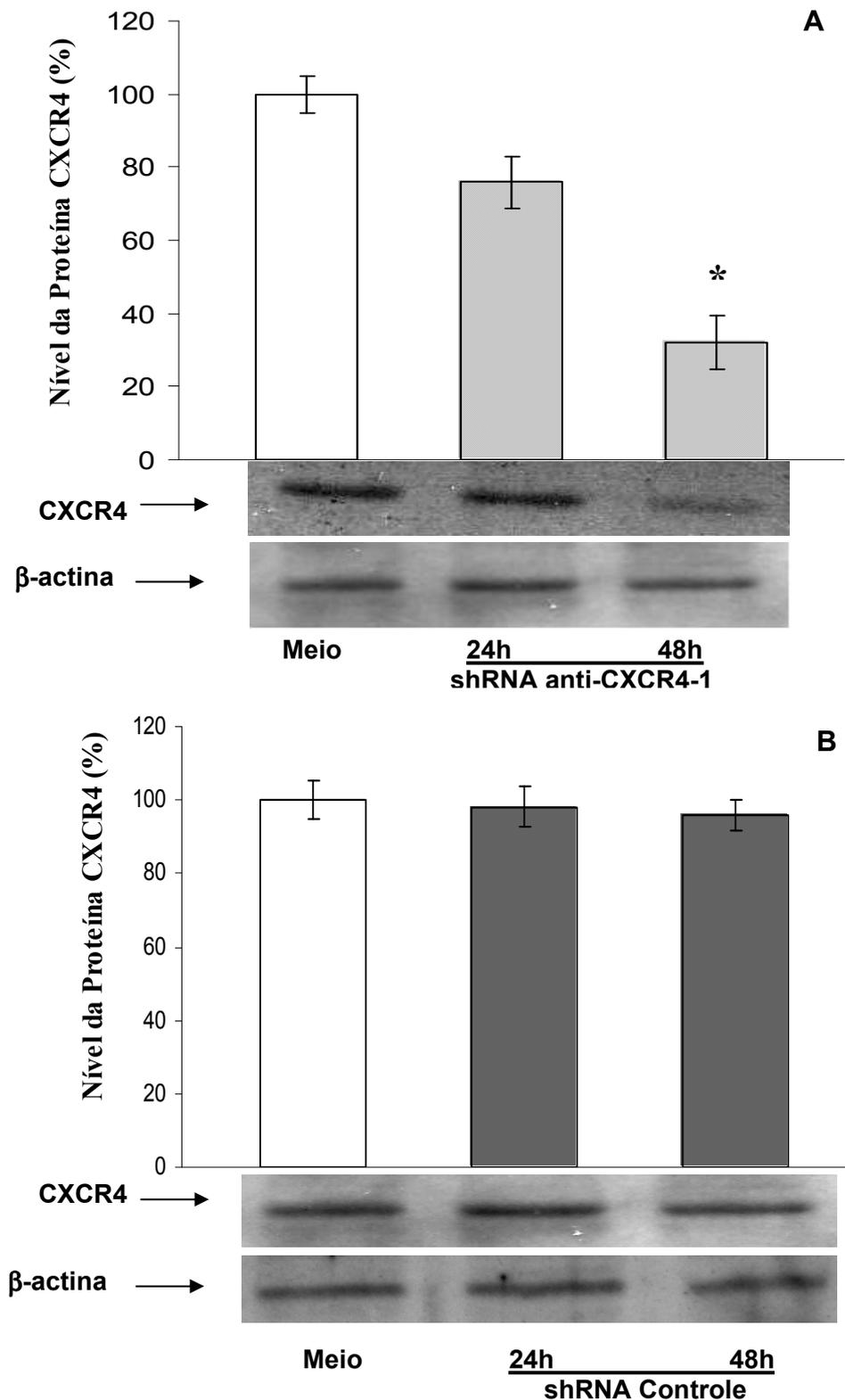


Figura 16: Nível da proteína CXCR4 nas células melanoma B16-F10 transfectadas com o vetor shRNA anti-CXCR4-1. (A) Nível da proteína CXCR4 nas células de melanoma B16-F10 após 24h e 48h de transfecção com shRNA específico para CXCR4 ou (B) shRNA controle. A β -actina foi usada como controle. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ (teste- t de Student).

4.12 Efeito do silenciamento da expressão do CXCR4 sobre o desenvolvimento tumoral

Depois de realizados os ensaios *in vitro* e selecionado o shRNA que eficientemente silenciou o gene do receptor CXCR4, foram feitos ensaios *in vivo* a fim de avaliar a participação do CXCR4 no crescimento do tumor primário bem como no padrão preferencial de metástase das células de melanoma B16-F10, clássico modelo de colonização pulmonar.

Com essa finalidade, injetamos as células transfectadas com o shRNA anti-CXCR4-1 via subcutânea e avaliamos o peso tumoral após 14 dias da inoculação das células. A figura 17 mostra uma redução significativa de 66% no crescimento do tumor subcutâneo. Posteriormente células B16-F10 não transfectadas foram inoculadas e após 7 dias uma única dose do plasmídeo expressando CXCR4-1 ou shRNA controle foi inoculado via intratumoral levando à uma redução de 70% no crescimento tumoral (Figura 18).

Quando inoculadas por via retro-orbital, as células transfectadas mostraram uma redução muito significativa na formação de nódulos metastáticos, de aproximadamente 94% como mostrado na figura 19.

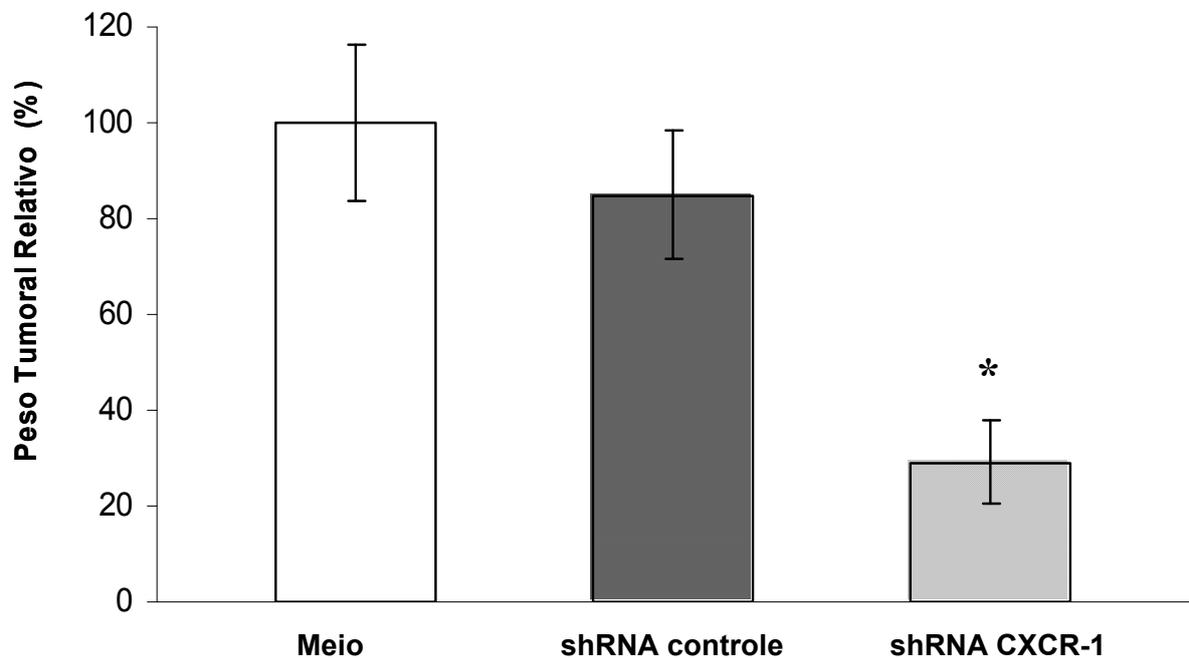


Figura 17: Efeito da transfeccção das células B16-F10 com o plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 sobre o desenvolvimento do tumor subcutâneo em camundongos C57BL/6. As células B16-F10 transfectadas em cultura com plasmídeo psiSTRIKE por 5 horas, foram inoculadas, pela via subcutânea, em camundongos C57BL/6 (4×10^5 células/animal). Após 14 dias, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e o tumor removido e pesado. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,001$; * $p < 0,01$ (teste- t de Student).

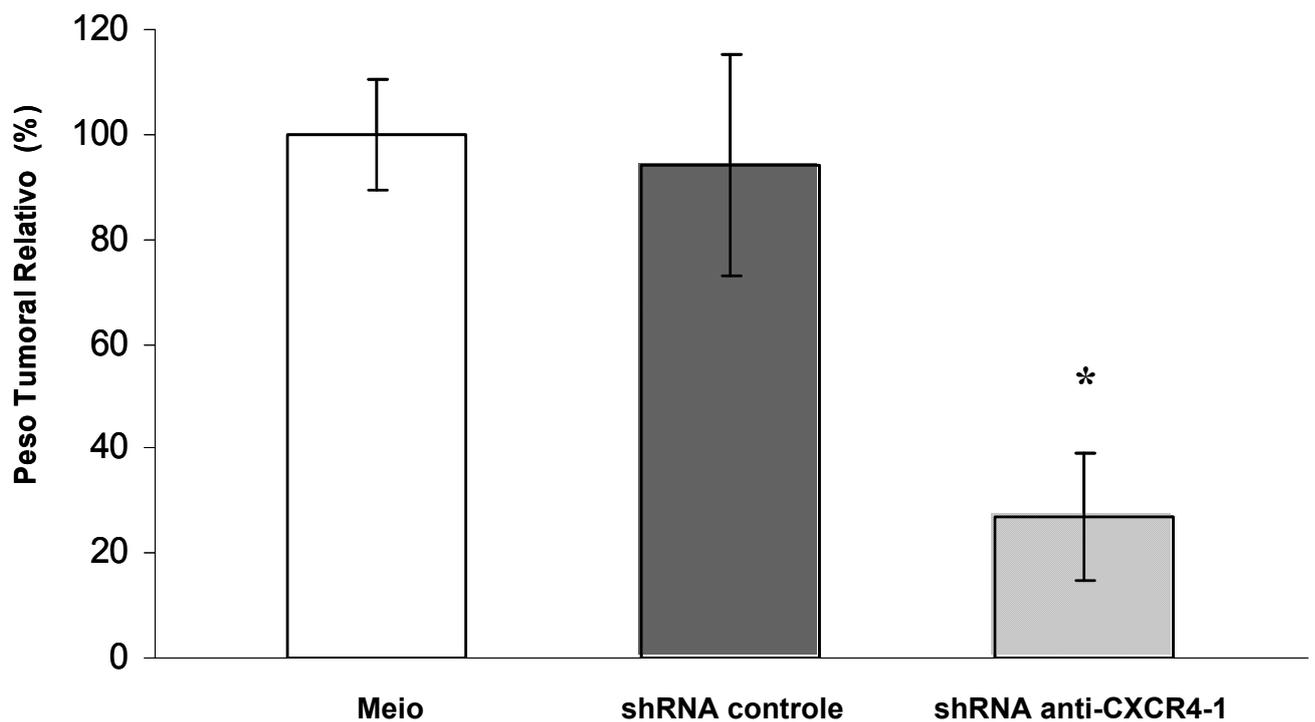


Figura 18: Efeito da injeção intratumoral do plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 sobre o desenvolvimento do tumor subcutâneo em camundongos C57BL/6. Uma única dose (2 μ g) do plasmídeo foi injetada no tumor após o sétimo dia da inoculação via subcutânea das células B16-F10 (4×10^5 células/animal). Após 14 dias da inoculação das células B16-F10, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e o tumor removido e pesado. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0.001$; * $p < 0.01$ (teste- t de Student).

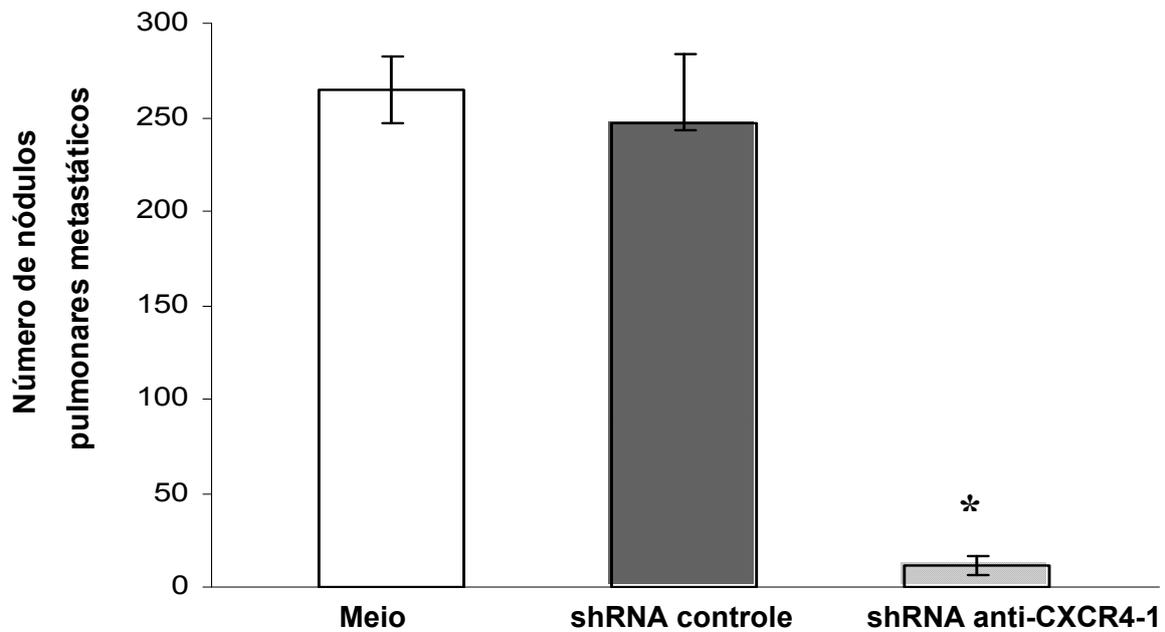


Figura 19: Efeito da transfeccção das células B16-F10 com o plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 sobre o seu potencial metastático em camundongos C57BL/6. As células foram cultivadas em meio RPMI e transfectadas com shRNA específico para CXCR4-1 ou shRNA controle por 5 horas. Foram utilizados 10 camundongos por grupo. Cada animal recebeu 10^5 células melanoma B16-F10 incubadas com RPMI, shRNA anti-CXCR4-1 ou shRNA controle. Animais foram sacrificados no vigésimo primeiro dia e os nódulos pulmonares metastáticos foram contados sob microscópio de disseccção. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,001$; * $p < 0,001$ (teste- t de Student).

4.13 Administração endovenosa do plasmídeo psiSTRIKE em camundongos C57BL/6

As células B16-F10 foram injetadas, por via retro-orbital, em camundongos C57BL/6 (10^5 células/animal). Estes animais foram separados randomicamente em grupos de 10 animais. Dez microgramas do plasmídeo psiSTRIKE (shRNA controle, ou shRNA anti-CXCR4-1) foram diluídos em solução de glicose 10% na proporção 1:1 e a seguir misturados com jetPEI™ (na proporção de 1:1) e incubados à temperatura ambiente por 20 minutos. Os plasmídeos foram então injetados em dose única endovenosamente nos camundongos C57BL/6 12 horas após a inoculação das células B16-F10. Os camundongos foram sacrificados 21 dias após a injeção de células tumorais e os nódulos pulmonares contados com auxílio de um microscópio de dissecação.

A figura 20 mostra uma redução significativa (49%) no número de nódulos pulmonares metastáticos nos animais que receberam a dose única do plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 quando comparado com animais os que receberam plasmídeo expressando shRNA controle.

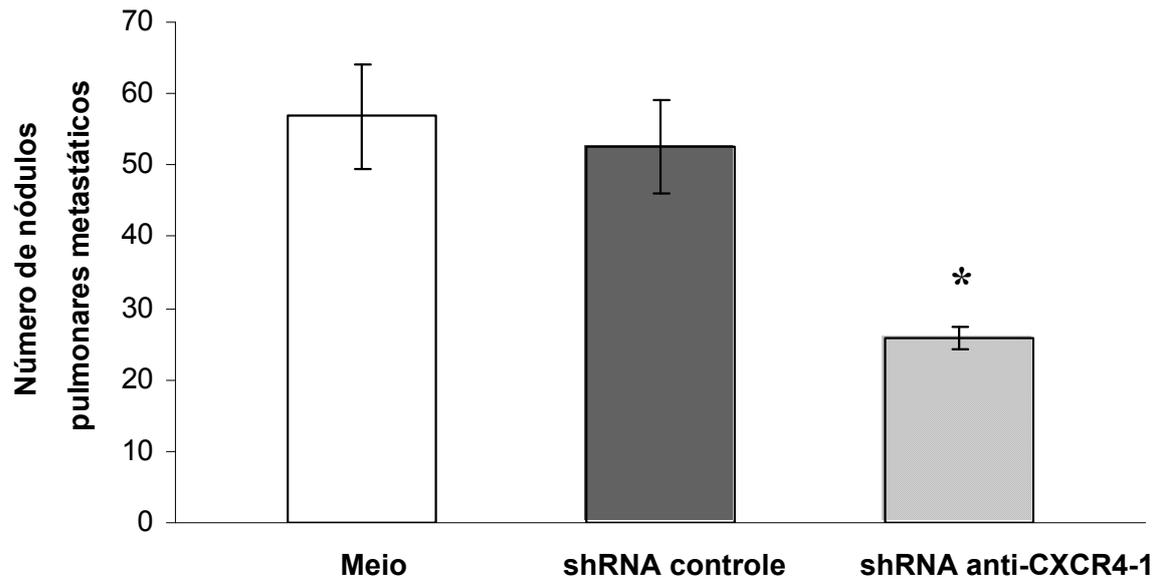


Figura 20: Efeito da administração endovenosa do plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 sobre o número de nódulos pulmonares em camundongos C57BL/6. As células B16-F10 foram injetadas, por via endovenosa, em camundongos C57BL/6 (10^5 células/animal). Estes animais foram separados randomicamente em grupos de 10 animais. O plasmídeo shRNA controle ou shRNA anti-CXCR4-1 ($10\mu\text{g}$) foram diluídos em solução de glicose 10% e a seguir misturados com jetPEI™. O plasmídeo foi então injetado endovenosamente 12 horas após a inoculação das células B16-F10 nos camundongos C57BL/6. Os camundongos foram sacrificados 21 dias após a injeção de células tumorais e os nódulos pulmonares contados com auxílio de uma lupa de dissecação. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados mostrados nessa figura são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,001$; * $p < 0,01$ (teste- t de Student).

5. Discussão

No presente trabalho, utilizamos o RNAi como ferramenta bioquímica para avaliar o papel exercido pela PKR nas células de melanoma B16-F10 durante o crescimento do tumor primário e na colonização pulmonar em camundongos isogênicos.

O RNAi pode ser administrado como siRNA diretamente no sistema a ser estudado ou através de vetores de expressão, plasmidial e viral, que induzem a expressão de shRNAs na célula alvo por um período relativamente longo de tempo. Uma vez que o principal objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do silenciamento gênico *in vivo* em experimentos que variariam de 14 a 21 dias, optamos pelo emprego de um vetor de expressão plasmidial que contém o promotor eucariótico U6 o qual permite a expressão do short-hairpin na célula de melanoma B16-F10. Os cassetes de expressão foram preparados e a seguir foi examinada a capacidade de três shRNAs específicos para PKR em reduzir a expressão da PKR *in vitro*. Assim, as células tumorais foram transfectadas durante 5, 24 ou 48 horas com o plasmídeo expressando shRNA anti-PKR-1, shRNA anti-PKR-2, shRNA anti-PKR3 ou shRNA controle e lipofectamina 2000. A lipofectamina é uma formulação de lipossomos, os quais são vesículas que possuem um compartimento polar limitado por uma camada bilipídica que permitem a fusão do lipossomo com a membrana da célula alvo, permitindo assim a entrada da matéria polar, no caso DNA plasmidial, que estava na porção interna do lipossomo (Li e Szoka, 2007).

Após a transfecção, a integridade dos RNAs foi monitorada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante (Figura 4) e o silenciamento do gene da PKR foi monitorado por RT-PCR semi-quantitativo e Western blot. Os nossos resultados mostraram que apenas o shRNA PKR-2 reduziu significativamente a expressão do RNAm da PKR nas células de melanoma B16-F10 nos ensaios *in vitro*.

A redução foi de 58% após 5 horas de transfecção (Figura 5 A), 82% após 24 horas (Figura 6 A) e 98% depois de 48 horas de transfecção (Figura 7A).

Os resultados do Western blot mostraram uma redução significativa de 39,4% no nível da proteína PKR nas células B16-F10 transfectadas com o plasmídeo expressando shRNA anti-PKR-2 depois de 24 horas de transfecção e de 98% após 48 horas de transfecção (Figura 8).

As transfecções com os shRNAs anti-PKR-1 e anti-PKR-3 não foram eficazes em silenciar a expressão da PKR. É possível que a estrutura secundária do RNAm da PKR nas regiões complementares aos shRNAs anti-PKR-1 e anti-PKR-3 não permitiu um silenciamento eficaz como já foi descrito em trabalhos anteriores que a eficiência do silenciamento é dependente da localização da região alvo no RNA mensageiro. O shRNA também pode não ser efetivo apesar do delineamento criterioso e da incorporação eficiente do siRNA no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) uma vez que o complexo não é capaz de interagir com regiões do RNAm ligadas à proteínas (Cullen, 2006).

Com base nos resultados obtidos *in vitro*, o plasmídeo shRNA anti-PKR-2 foi selecionado para a realização dos experimentos *in vivo*. A fim de se analisar o efeito do silenciamento da expressão da PKR no desenvolvimento do tumor subcutâneo, as células B16-F10 transfectadas foram inoculadas via subcutânea em camundongos isogênicos C57/BL6. Após 14 dias, os camundongos foram sacrificados e os tumores foram pesados mostrando uma redução significativa de cerca de 86% no peso tumoral quando comparado com animais inoculados com células transfectadas com plasmídeo expressando shRNA controle (Figura 9).

A administração intratumoral do RNAi é uma abordagem atrativa para validação funcional de genes que induzem a tumorigênese (Behlke, 2006; Xie e

cols., 2006). Assim, analisamos o efeito da injeção intratumoral do plasmídeo psiSTRIKE expressando o shRNA anti-PKR-2 no desenvolvimento do tumor subcutâneo em camundongos C57BL/6. Uma única dose do plasmídeo foi injetada no tumor após o 7^o dia da inoculação via subcutânea das células B16-F10, o que levou à uma redução significativa de cerca de 82% do peso tumoral (Figura 10).

A célula B16 clone F10 é uma linhagem celular derivada do melanoma B16 que se mostrou altamente metastática para os pulmões quando injetada via retro-orbital em camundongos C57BL/6 (Fidler, 1970; 1975; 1990). Este modelo de metástase experimental apresenta algumas vantagens uma vez que surgiu espontaneamente em camundongos isogênicos como ocorre no melanoma humano, além da cultura apresentar rápido crescimento *in vitro* e o alto teor de melanina dos nódulos metastáticos permitir a fácil visualização e a contagem dos nódulos na lupa de dissecação. A fim de se avaliar o efeito do silenciamento do gene da PKR sobre o potencial metastático das células B16-F10 no modelo de metástase experimental, as células transfectadas com o plasmídeo shRNA anti-PKR-2 foram inoculadas via retro-orbital em camundongos C57BL/6. Após 21 dias da inoculação os animais foram sacrificados e os resultados mostram que animais inoculados com esse clone apresentaram uma redução drástica de 95% no número de nódulos metastáticos pulmonares (Figura 11).

Estudos recentes revelam que o RNAi é capaz que ativar a PKR com subsequente ativação da resposta via interferon, levando à uma inibição inespecífica da síntese protéica (Carlson e cols., 2003; Moss e Taylor, 2003; Sledz e cols., 2003). Entretanto, a possibilidade dos efeitos observados neste projeto resultarem a ativação inespecífica da PKR foi descartada uma vez que mostramos que ocorre o silenciamento da expressão da PKR nas células B16-F10 transfectadas com

plasmídeo que expressa o shRNA anti-PKR-2, além de mostrar que células transfectadas com esse plasmídeo apresentaram redução da PKR ativada quando comparadas com as células transfectadas com shRNA controle e com as células não transfectadas.

Estudos recentes mostraram que siRNAs são capazes de ativar a imunidade inata e que essa ativação não depende da seqüência destes RNAs reguladores. O complexo siRNA lipossomo são internalizados via endocitose e dentro dos endossomos as moléculas de RNA podem se ligar aos receptores TLRs (*Toll-like receptors*), em particular ao TLR7 presente nas células dendríticas e o TLR8 em monócitos, levando à ativação do fator de transcrição NF- κ B e IRF-7 (*interferon regulatory factor-7*), sendo que essas vias de sinalização levam à produção de citocinas pró-inflamatórias. Uma vez que a internalização do RNA e maturação do endossomo é uma condição necessária para ativação da resposta imune, utilizamos no processo de transfecção a droga cloroquina, que leva à neutralização do endossomo e desestabilização da membrana, inibindo assim a sua maturação (Sioud e cols., 2007). É importante salientar que já foi demonstrado que a utilização dessa droga bloqueia a ativação da resposta imune sem, no entanto, interferir com a via do RNAi (Sioud, 2007).

É fato conhecido que a fosforilação dos inibidores I- κ Bs constitui uma etapa essencial para a ativação do fator de transcrição NF- κ B. A PKR tem se mostrado um importante regulador da família dos fatores de transcrição NF- κ B e foi sugerido que essa modulação seria feita pela fosforilação do I- κ B diretamente pela PKR (Zamanian-Daryoush e cols., 2000). Kumar e cols. (1994) demonstraram que a ela é capaz de fosforilar o I- κ B α *in vitro* e, conseqüentemente, ativar o NF- κ B.

O fator de transcrição NF- κ B foi inicialmente descrito em 1986 como um fator nuclear necessário para a transcrição da cadeia leve (κ) das imunoglobulinas em células B e, por esse motivo, foi denominado de fator nuclear κ B (Sen e Baltimore, 1986). O NF- κ B é um dímero de proteínas da família *rel*. Cada membro da família contém 300 aminoácidos conservados na região N-terminal conhecidos como domínio de homologia *rel* (RHD). Nos humanos, esta família inclui NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB, c-Rel e as proteínas p100 and p105. O mecanismo que regula a ativação do NF- κ B é sua retenção citoplasmática mediada pela interação com moléculas inibidoras da família do I κ B (Verma, 1995).

Neste contexto é importante notar que a PKR pode ainda ativar o fator de transcrição NF- κ B através do complexo IKK. As proteínas I κ B são fosforiladas pelo complexo IKK em dois resíduos de serina em resposta a uma variedade de estímulos, o que culmina com a degradação pela via ubiquitina proteassoma (Roff e cols., 1996). Este evento permite a translocação do NF κ B do citoplasma para o núcleo, onde ele regula a transcrição gênica. Desde a descoberta do NF- κ B, sítios a ele responsivos (sítios κ B) foram identificados em promotores e *enhancers* de numerosos genes e, portanto, os sítios κ B constituem um importante componente na indução da expressão de muitas proteínas, incluindo seqüências Ig- κ , moléculas de adesão, citocinas e receptores de citocinas, matriz metaloproteinases, fatores angiogênicos, protooncogenes como *c-myc* e ciclina D1 entre outros, os quais estão envolvidos na regulação da resposta de fase aguda, inflamação, ativação de linfócitos, crescimento celular, diferenciação e apoptose (Ghosh e cols., 1998).

Com base nos dados de literatura, formulamos a hipótese de trabalho segundo a qual os efeitos da PKR no nosso modelo de metástase experimental

podem ser mediados pela ativação do NF- κ B através da degradação do seu inibidor I κ B β . Para testar essa hipótese, investigamos os níveis da PKR ativa (fosforilada) e de I κ B β nas células de melanoma B16-F10 transfectadas com plasmídeo PKR-2 ou shRNA controle. Os nossos resultados demonstraram que as células de melanoma B16-F10 não transfectadas apresentam níveis elevados da PKR ativada e níveis praticamente ausentes do inibidor I κ B β . Por outro lado, o silenciamento da PKR nas células transfectadas com shRNA PKR-2 resultou na redução dos níveis da PKR ativada (fosforilada), o que foi acompanhado por um aumento nos níveis de I κ B β (Figura 12). Já foi demonstrado que o I κ B β não é rapidamente re-sintetizado após degradação o que tem sido implicado em uma ativação persistente do NF- κ B, o que estaria de acordo com níveis elevados do NF- κ B elevado em vários tipos de tumores humanos, entre eles câncer de mama, linfoma de células B, mieloma múltiplo, melanoma, câncer de próstata, ovário e pulmão (Biswas e cols., 2000; Huang e cols., 2000a; 2000b; Jones e cols., 2000; Davis e cols., 2001; Hideshima e cols., 2002; 2001)

O diagrama abaixo (Figura 21) mostra os possíveis eventos moleculares envolvidos na redução do crescimento tumoral, bem como do número de nódulos pulmonares metastáticos em camundongos injetados com células de melanoma B16-F10 transfectadas com plasmídeo shRNA anti-PKR.

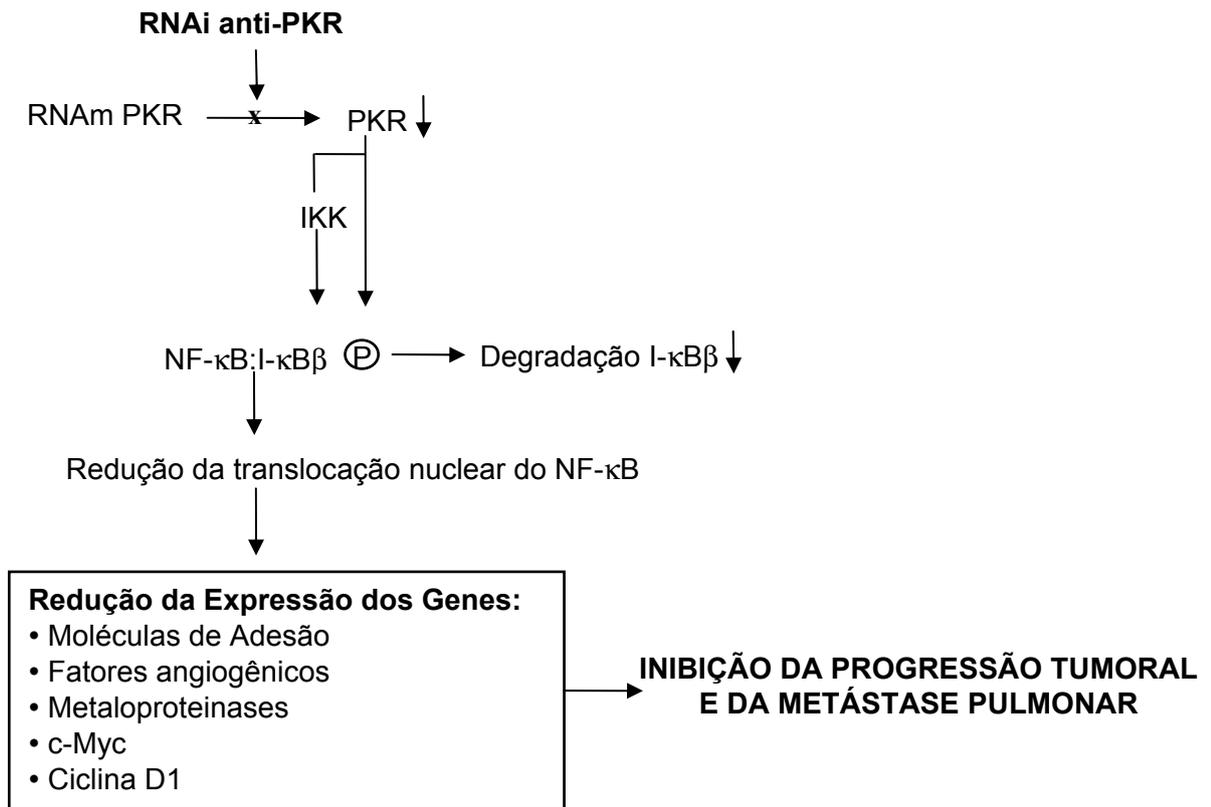


Figura 21: Diagrama de possíveis eventos moleculares envolvidos na redução dos nódulos pulmonares metastáticos em camundongos injetados com células de melanoma B16-F10 transfectadas com plasmídeo psiSTRIKE shRNA anti-PKR. As seguintes abreviações foram utilizadas: PKR = Proteína quinase dependente de RNA; NF-κB= Fator nuclear – kappa B; I-κB = inibidor de NF-κB; IKK= I-κB quinase.

Nossos resultados indicam que o silenciamento transitório da PKR foi eficiente em inibir tanto o crescimento do tumor primário como a formação de nódulos pulmonares metastáticos, sugerindo que a PKR exerce um papel crítico nos primeiros estágios deste fenômeno. Assim, investigações adicionais serão necessárias para se determinar o efeito do silenciamento da PKR na proliferação celular, sobrevivência e capacidade de formação de colônias. Estes estudos poderão contribuir para confirmar nossa hipótese de trabalho e classificar a PKR como um novo alvo para o tratamento de câncer com a tecnologia do RNA de interferência especialmente em tumores que a expressão da PKR esteja aumentada e que apresentem alvo potencial metastático como o melanoma humano e o câncer de mama.

As estratégias atuais para se estudar o envolvimento do CXCR4 em câncer são baseadas no bloqueio do receptor na superfície das células tumorais com antagonistas ou anticorpos específicos. No presente estudo, o RNA de interferência foi usado para inibir a expressão do CXCR4 nas células de melanoma B16-F10, o que permite avaliar a participação deste receptor no desenvolvimento do tumor primário, bem como na colonização pulmonar.

Com o objetivo de silenciar a expressão do CXCR4 na superfície das células B16-F10 de melanoma murino, utilizamos um vetor plasmidial que expressa shRNAs específicos para o receptor. Assim, dois shRNAs específicos para diferentes posições do RNAm CXCR4 murino (shRNA anti-CXC4-1 e shRNA anti-CXCR4-2) foram delineadas e clonadas no plasmídeo psiSTRIKE que possui o promotor U6, levando à expressão dos shRNAs pela RNA polimerase III. Como controle, foi utilizado um shRNA cuja seqüência não é encontrada no genoma do camundongo.

Os nossos resultados mostraram que apenas o shRNA anti-CXCR4-1 reduziu significativamente a expressão do RNAm do CXCR4. A análise da expressão por RT-PCR semi-quantitativo mostrou uma redução de cerca de 35% na expressão do RNA mensageiro do CXCR4 após 5 horas de transfecção (Figura 13 A), tendo reduzido 52% após 24 horas (Figura 14 A) e 81% depois de 48 horas de transfecção com o shRNA anti-CXCR4-1 (Figura 15 A). O RT-PCR das células transfectadas com shRNA controle não apresentou variação significativa no nível da do RNAm do CXCR4 (Figura 13 B, 14 B e 15 B, respectivamente). As análises de Western blot confirmaram uma redução de 24% no nível da proteína CXCR4 nas células B16-F10 transfectadas com o plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 depois de 24 horas e uma redução de 68% após 48 horas de transfecção (Figura 16), indicando uma redução da proteína CXCR4 nas células tumorais, o que é compatível com a redução da expressão do RNAm deste receptor.

Com o objetivo de se determinar os efeitos do silenciamento do CXCR4 sobre o crescimento do tumor primário, avaliamos a taxa de crescimento das células transfectadas por 5 horas com o shRNA anti-CXCR4-1 após a injeção das células através das vias subcutânea em camundongos isogênicos C56/BL6. Os animais inoculados com as células transfectadas com o plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 apresentaram uma redução significativa (65%) no crescimento tumoral (Figura 17) quando comparados aos camundongos inoculados com células não transfectadas ou transfectadas com plasmídeo expressando shRNA controle.

É importante salientar que os nossos resultados estão de acordo com dados recentes da literatura que mostram a importância da sinalização SDF-1/CXCR4 no microambiente tumoral. Assim, os dados da literatura demonstraram que células de câncer de próstata transfectadas com CXCR4 e injetadas via subcutânea levaram a

um maior crescimento tumoral com aumento da densidade vascular e invasão da musculatura quando comparadas com células não transfectadas com este receptor de quimiocina (Kukreja e cols., 2005; Engl e cols., 2006). Allinen e cols. (2004) propuseram que o SDF-1 no microambiente do tumor atuaria de modo a promover a proliferação, migração e invasão de células de câncer de mama.

A expressão do receptor CXCR4 nas células de melanoma podem contribuir para motilidade celular durante invasão, bem como para regulação da proliferação e sobrevivência celular (Robledo., 2001).

A ativação de RhoA e Rac, moléculas chave na regulação da organização do citoesqueleto por Mig e SDF1- α , pode representar um mecanismo que contribui para a migração e invasão das células do melanoma (Hall., 1998; Kaibuchi e cols., 1999; Robledo e cols., 2001). A fosforilação de MAP (*mitogen activated protein*) quinases p44/42 e p38 está também aumentada em células de melanoma por Mig e SDF1- α , podendo estar relacionada ao controle da proliferação de células de melanoma, sobrevivência e apoptose (Nebreda e Porras, 2000). O SDF1- α também induz a secreção de metaloproteinases e de seus inibidores tissulares pela medula óssea, podendo também contribuir para invasão tecidual (Janowska-Wieczorek e cols., 2000; Lane e cols., 2000).

Uma vez visto que as células de melanoma B16-F10 com reduzida expressão de CXCR4 apresentaram uma diminuição significativa no crescimento tumoral, decidimos investigar a possibilidade de se utilizar o vetor shRNA anti-CXCR4 no tratamento do tumor primário. Desta maneira, depois de 7 dias da inoculação das células B16-F10 não transfectadas, injetamos via intratumoral uma única dose (2 μ g) do plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 e avaliamos o peso tumoral após 7 dias da administração do plasmídeo. Os nossos resultados mostraram uma redução

significativa (70%) no crescimento tumoral, o que não foi observado nos animais que receberam apenas meio ou o plasmídeo contendo o shRNA controle (Figura 18). Estes dados confirmam a importância da sinalização SDF-1/CXCR4 no início do desenvolvimento tumoral, sugerindo que o tratamento do tumor primário com shRNA anti-CXCR4 pode ser uma estratégia clínica viável para o controle do crescimento tumoral.

A seguir, avaliamos se a redução significativa do CXCR4 em células transfectadas com plasmídeo expressando shRNA anti-CXCR4-1 poderia reduzir o potencial metastático deste clone de melanoma. Verificamos que os camundongos inoculados com as células transfectadas com plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 apresentaram uma redução de 94% no número de nódulos pulmonares quando comparados com o número de nódulos metastáticos observado em camundongos inoculados com as células incubadas com meio ou transfectadas com plasmídeo shRNA controle (Figura 19). Este resultado pode ser considerado relevante, pois demonstra claramente que o receptor CXCR4 está envolvido no processo de metástase observado no modelo de melanoma murino.

É importante salientar que trabalhos anteriores demonstraram que células B16 transfectadas com CXCR4 humano apresentaram um aumento de 10 vezes na metástase pulmonar depois da injeção endovenosa desses clones e aumento da adesão dessas células nas células endoteliais dos vasos da derme e pulmão (Murakami e cols., 2002). Liang e cols. (2004) também demonstraram redução significativa da metástase pulmonar em camundongos SCID injetados com células de câncer de mama humano após tratamento dos animais com peptídeo sintético anti-CXCR4.

Dados da literatura demonstraram que células de câncer de mama humana, MDA-MB-231, transfectadas com siRNA anti-CXCR4 não se mostraram invasivas nos ensaios de invasão *in vitro*, ao passo que células que expressavam o receptor foram altamente invasivas em resposta à estimulação com o ligante SDF-1, demonstrando a importância do CXCR4 na migração celular (Chen e cols., 2003; Lapteva e cols., 2005).

Lapteva e cols. (2005) verificaram ainda que não houve crescimento tumoral em animais SCID inoculados com células MDA-MB-231 transfectadas com siRNA anti-CXCR4 sendo que animais inoculados com células não transfectadas desenvolveram tumor no intervalo de 3 semanas. Esses autores avaliaram também o surgimento de metástases pulmonares, tendo mostrado o aparecimento de nódulos pulmonares metastáticos apenas nos animais inoculados com células MDA-MB-231 não transfectadas com siRNA.

Assim, os nossos resultados estão de acordo com dados da literatura que indicam uma importante participação deste receptor na indução de metástase, principalmente na colonização pulmonar, pois o pulmão expressa quantidades significativas do ligante SDF-1 (Nagasawa e cols., 1999).

O método que utiliza moléculas sintéticas de polietilenoimina linear (PEI) tem demonstrado alta eficiência na administração *in vivo* de siRNAs ou shRNAs (Hassani e cols., 2005; Urban-Klein e cols., 2005; Dif e cols., 2006). O PEI possui grupamentos amino protonados que interagem com o DNA e são assim capazes de interagir com a superfície aniônica dos proteoglicanos da superfície celular e entrar na célula por endocitose. O contínuo influxo de prótons leva à alteração da osmolaridade e conseqüente ruptura do endossomo, o que permite um mecanismo de escape das partículas de DNA para o citoplasma (Kichler, 2004).

Com o objetivo de se testar o efeito do PEI em nosso modelo de metástase experimental, células de melanoma B16-F10 não transfectadas foram injetadas, por via retro-orbital, em camundongos C57BL/6 (10^5 células/animal) e 12 horas após a injeção das células, 10 μ g do plasmídeo psiSTRIKE (shRNA controle ou shRNA anti-CXCR4-1) foram diluídos em solução de glicose jetPEI™ e injetados em dose única endovenosamente nos camundongos C57BL/6. A figura 20 mostra redução de 48,9% no número de nódulos pulmonares metastáticos nos animais que receberam a dose única do plasmídeo shRNA anti-CXCR4-1 quando comparado com animais que receberam plasmídeo expressando shRNA controle. Estes dados reforçam os nossos resultados anteriores que mostraram uma redução da colonização pulmonar das células B16-F10 transfectadas com shRNA–anti-CXCR4-1, sugerindo ainda uma papel crítico deste receptor durante os estágios iniciais da colonização pulmonar.

Murakami e cols. (2003) demonstraram que a administração intraperitoneal do peptídeo inibidor de CXCR4 (T22) em células tumorais somente nos dois primeiros dias da inoculação das células B16 transfectadas com CXCR4, foi tão efetiva quanto a administração da droga durante os 14 dias do crescimento tumoral, o que sugere um papel crítico do receptor CXCR4 nas fases iniciais do desenvolvimento tumoral.

Várias evidências sugerem que a β 1 integrina expressa por células de melanoma contribuem para adesão, invasão, motilidade e desenvolvimento de metástases (4, 24–26 papaer integrina). Cardones e cols. (2003) demonstraram que a ativação do CXCR4 aumenta a afinidade da integrina por VCAM-1, estimulando assim a adesão das células B16 à matriz extracelular, levando ao aumento da formação de metástases e colonização pulmonar.

Todos esses resultados indicam que o silenciamento precoce do CXCR4 pode reduzir significativamente a formação de metástases, sendo que tratamentos

tardios com inibidores de CXCR4 ou SDF-1 podem não bloquear efetivamente o surgimento de metástases, uma vez que as células tumorais podem se tornar independentes dessas vias de sinalização. Assim, terapias anti-CXCR4 podem ser efetivas no período de estabelecimento das metástases, podendo não ser eficazes no caso de metástases já estabelecidas.

Estes resultados sugerem que o receptor de quimiocinas CXCR4 exerce um papel fundamental no crescimento do tumor primário e principalmente na colonização pulmonar pelas células de melanoma B16-F10 desde que a redução de 68% deste receptor levou à redução de 94% no número de nódulos pulmonares, sugerindo também que o tratamento do tumor primário com shRNA pode ser uma estratégia clínica viável na prevenção de metástases.

5.1 Considerações Finais

O presente trabalho demonstrou que a tecnologia do RNAi pode ser aplicada, com êxito, nas células de melanoma B16-F10 para se estudar a função dos genes da PKR e do receptor CXCR4. A estratégia de se utilizar um plasmídeo de expressão transitória dos shRNA anti-PKR e shRNA anti-CXR-4 permitiu verificar que a PKR e o receptor CXCR4 desempenham um papel crítico nas fases iniciais do desenvolvimento do melanoma murino e na colonização pulmonar das células de melanoma B16-F10 em camundongos C57BL/6.

Os resultados obtidos não são compatíveis com o conceito de que a PKR atua como um supressor de tumor pelo menos no modelo de melanoma murino e sugerem que a PKR exerce um papel positivo na proliferação celular, o qual seria mediado pelo fator de transcrição NF- κ B. O presente estudo mostrou que o silenciamento dos genes da PKR e do receptor CXCR4 reduz significativamente a progressão tumoral, bem como produz uma diminuição drástica do potencial metastático das células de melanoma B16-F10. Assim, os genes da PKR e do receptor CXCR4 seriam alvos potenciais para o tratamento de câncer com a tecnologia do RNAi, especialmente em tumores que apresentam um aumento da expressão da PKR e do receptor CXCR4 e um elevado potencial metastático como observado nos casos de melanoma humano e de câncer de mama.

6. Conclusões

As principais conclusões obtidas a partir dos resultados deste trabalho foram:

- Os genes da PKR e do CXCR4 das células de melanoma B16-F10 foram silenciados através do uso da tecnologia do RNA de interferência.
- O silenciamento dos genes da PKR e do CXCR4 reduziu significativamente o desenvolvimento do melanoma B16-F10 subcutâneo e a colonização pulmonar das células de melanoma B16-F10 em camundongos C57BL/6.
- A injeção intratumoral dos plasmídeos shRNA anti-PKR e shRNA anti-CXR4 reduziu significativamente o desenvolvimento do melanoma subcutâneo em camundongos C57BL/6.
- A injeção endovenosa do plasmídeo shRNA anti-CXCR4, associado com o agente transfectante policatiônico jetPEI™, foi capaz de reduzir significativamente a colonização pulmonar das células de melanoma B16-F10 camundongos C57BL/6.

7. Referências Bibliográficas

Aagaard L and John JR. RNAi therapeutics :Principles, prospects and challenges. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 59(2-3):75-86, 2007.

Abraham N, Stojdl DF, Duncan PI, Méthot N, Ishii T, Dubé M, Vanderhyden BC, Atkins HL, Gray DA, McBurney MW, Koromilas AE, Brown EG, Sonenberg N, Bell JC. Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. **J. Biol. Chem.**, 274(9):5953-5962, 1999.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Oct 1, 2007. (doi:10.1016/j.critrevonc.2007.07.004).

Allinen M, Beroukhi R, Cai L et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. **Cancer Cell**; 6:17–32, 2004.

Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Hedí SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation. **RNA**, 9(3):277-279, 2003a.

Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. **Curr. Biol.**, 13(10):807-818, 2003b.

Ambros V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, 431(7600):350-355, 2004.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol.**, 55:97–179, 1994.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. **Annu. Rev. Immunol.**, 15:675–705, 1997.

Balachandran S, Roberts PC, Brown LE, Truong H, Pattnaik AK, Archer DR, Barber G N. Essential role for the dsRNA dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. **Immunity**, 13:129–141, 2000.

Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. **Semin. Cancer Biol.**, 14:171–179, 2004.

Balkwill F and Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, 357(9255):539-545, 2001.

Barber GN, Edelhoff S, Katze MG and Disteché CM. Chromosomal assignment of the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) to human chromosome 2p21-p22 and mouse chromosome 17 E2. **Genomics**, 16:765–767, 1993.

Barber GN, Wambach M, Thompson S, Jagus R, Katze MG. Mutants of the RNA-dependent protein kinase (PKR) lacking double-stranded RNA binding domain I can act as transdominant inhibitors and induce malignant transformation. **Mol. Cell. Biol.**, 15:3138-3146, 1995.

Bass BL. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. **Cell**, 101(3): 235-238, 2000.

Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. **Mol. Ther.**, 13(4):644-670, 2006. Review.

Ben-Baruch A. Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. **Clin. Exp. Metastasis**, Sep 21, 2007. (DOI: 10.1007/s10585-007-9097-3).

Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. **Nat. Genet.**, 37(7):766-770, 2005.

Bernstein E, Caud YA, Hammond S M, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, 409: 363-366, 2001.

Bertolini MC, De Lucca FL. The protective effect of the 4-5S immune RNA against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Trop. Med. Parasit.**, 36:131-134, 1985.

Bertolini MC, De Lucca FL. In vivo transfer of delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi*, antigens with polysomal immune RNA. **Trop. Med. Parasit.**, 37(2): 107-109, 1986a.

Bertolini MC, De Lucca FL. Poly (A)-containing RNA from the spleens of mice with Chaga's disease triggers in vitro macrophage resistance to *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.**, 33(1): 81-84, 1986b.

Bhargava M, Shanmugam GM. Uptake of non-viral nucleated acids by mammalian cells. in: **Progress Nucleic Acids Res. Mol. Biol.**, Academic Press, New York, vol. II, 103, 1971.

Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 98:14428-14433, 2001.

Biswas DK, Cruz AP, Gansberger E and Pardee AB. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: a major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 97: 8542-8547, 2000.

Bommer U, Borovjagin AV, Greagg MA, Jeffrey IW, Russell P, Laing KG, Lee M, Clemens MJ. The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. **RNA**, 8:478-496, 2002.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92(16):7297-7301, 1995.

Braasch DA, Jensen S, Liu Y, Kaur K. RNA Interference in Mammalian Cells by Chemically-Modified RNA. **Biochemistry**, 42:7967-7975, 2003.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. **Science**, 296(5567):550-553, 2002.

Cadman E, Bostwick JR, Eichberg J. Determination of protein by a modified Lowry procedure in the presence of some commonly used detergents. **Anal. Biochem.**, 96(1):21-23, 1979.

Cardones AR, Murakami T, Hwang ST. CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via beta(1) integrin. **Cancer Res.**, 63(20):6751-6757, 2003.

Carlson CB, Stephens OM, Beal PA. Recognition of double-stranded RNA by proteins and small molecules. **Biopolymers**, 70(1):86-102, 2003. Review.

Carthew RW. Gene silencing by double-stranded RNA. **Curr. Opin. Cell. Bio.**, 2:244-248, 2001. Review.

Cech TR. Nobel lecture. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from Tetrahymena. **Biosci. Rep.**, 10(3):239-261, 1990. Review

Cerutti L, Mian N, Bateman A. Domain in gene silencing and cell differentiation proteins: The novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. **Trends Biochem. Sci.**, 25: 481-482, 2000.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat. Rev. Cancer**, 2:563-572, 2002.

Chen Y, Stamatoyannopoulos G, Song CZ. Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. **Cancer Res.**, 63: 4801-4804, 2003.

Clemens MJ, Safer B, Merrick WC, Anderson WF, London IM. Inhibition of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates by double-stranded RNA and oxidized glutathione: indirect mode of action on polypeptide chain initiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 72:1286-1290, 1975.

Clemens MJ. Regulation of eukaryotic protein synthesis by kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2. **Mol. Biol. Reports**, 19:201-210, 1994.

Clemens MJ, Laing KG, Jeffrey IW, Schofield A, Sharp TV, Elia A, Matys V, James MC, Tilleray VJ. Regulation of the interferon-inducible eIF-2 alpha protein kinase by small RNAs. **Biochimie**, 76(8):770-778, 1994. Review.

Clemens MJ. PKR: protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int. J. Biochem.* **Cell. Biol.**, 29(7):945-949, 1997. Review.

Clemens MJ, Elia A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. **J. Interferon Cytokine Res.**, 17(9), 503-524, 1997. Review.

Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G. Transgene silencing of the *ai-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation, **EMBO J.**, 15: 3153-3163, 1996.

Cogoni C e Macino G. Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 94: 10233-102338, 1997.

Cogoni C e Macino G. Conservation of transgene –induced post-transcriptional gene silencing in plants and fungi. **Trends Plant. Sci.**, 2:438-443, 1997a.

Cogoni C e Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, 10 (6):638-643, 2000. Review.

Cullen BR. Induction of stable RNA interference in mammalian cells. **Gene Ther.**, 13(6):503-508, 2006. Review.

Davis S, Watson JC. In vitro activation of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by RNA from the 3' untranslated regions of human alpha-tropomyosin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 93(1): 508-513, 1996.

Davis RE, Brown KD, Siebenlist U and Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. **J. Exp. Med.**, 194:1861-1874, 2001.

De Lucca FL, Bertolini MC, Zini MN. "In vitro" transfer of reactivity to Trypanosoma cruzi antigens from rat cells to human cells with immune RNA. **J. Infect. Dis.**, 145(2): 148-151, 1982.

De Lucca FL, Sales VSF, Souza LR, Watanabe MAE. Evidence for the involvement of the RNA-dependent protein kinase (PKR) in the induction of human cytotoxic T lymphocytes against a synthetic peptide of HIV-1 by regulatory RNA. **Mol. Cell. Biochem.**, 238:19-26, 2002.

De Lucca FL, Sales VSF, Souza LR, Murad JM, Watanabe MAE, Regulatory RNA induces the production of IFN- γ , but not IL-4 in human lymphocytes: role of RNA-dependent protein kinase (PKR) and NF- κ B. **Mol. Cell. Biochem.**, 247:211-217, 2003.

Delgado André N, De Lucca FL. Non-coding transcript in T cells (NTT): Antisense transcript activates PKR and NF-kappaB in human lymphocytes. **Blood Cells Mol. Dis.**, Oct 8; 2007. (DOI:10.1016/j.bcmd.2007.08.005)

Dey M, Cao C, Dar AC, Tamura T, Ozato K, Sicheri F, Dever TE. Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. **Cell**, 122:901-913, 2005.

Dif F, Djediat C, Alegria O, Demeneix B, Levi G. Transfection of multiple pulmonary cell types following intravenous injection of PEI-DNA in normal and CFTR mutant mice. **J. Gene Med.**, 8(1):82-89, 2006.

Donzé O, Jagus R, Koromilas AE, Hershey JW, Sonenberg N. Abrogation of translation initiation factor eIF-2 phosphorylation causes malignant transformation of NIH 3T3 cells. **EMBO J.**, 14(15):3828-3834, 1995.

Dray S, Braun DP. Some perspectives on the transfer of cell-mediated immunity by immune RNA. **Mol. Cell. Biochem.**, 25:(1):15-31, 1979.

Eddy SR. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. **Nat. Rev. Genet.**, 2(12), 919-929, 2001.

Ehrenfeld E, Hunt RT. Double-stranded poliovirus RNA inhibits initiation of protein synthesis by reticulocyte lysates. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 68:1075-1078, 1971.

Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. **EMBO J.**, 20(23):6877-6888, 2001a.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes Dev.**, 15 (2):188-200, 2001b.

Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using *small interfering* RNAs. **Methods**, 26 (2):199-213, 2002.

Engl T, Relja B, Marian D, Blumenberg C, Müller I, Beecken WD, Jones J, Ringel EM, Bereiter-Hahn J, Jonas D, Blaheta RA. CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through alpha5 and beta3 integrins. **Neoplasia**, 8(4):290-301, 2006.

Erdmann VA, Barciszewska MZ, Szymanski M, Hochberg A, De Groot N, Barciszewski, J. The non-coding RNAs as ribo regulators. **Nucleic Acids Res.**, 29: 189-193, 2001a.

Erdmann VA, Barciszewska MZ, Hochberg A, De Groot N, Barciszewski J. Regulatory RNAs. **Cell. Mol. Life Sci.**, 58:960-977, 2001b.

Farrell PJ, Balkow K, Hunt T, Jackson RJ, Trachsel H. Phosphorylation of initiation factor eIF2 ; control of reticulocyte protein synthesis. **Cell**, 11:187-200, 1977.

Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a molecular classification of melanoma. **J.Clin. Oncol.**, 25(12):1606-1620, 2007.

Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. **J. Natl. Cancer Inst.**, 45(4):773-782, 1970.

Fidler IJ. Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to Their Survival *in vivo*. **Cancer Res.**, 35:218-224, 1975.

Fidler IJ. Biology of Cancer Metastasis. **Cancer Magazine**, 23-26, 1990.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas AS, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 391:806-811, 1998.

Fire A. RNA-triggered gene silencing. **Trends Genet.**, 15 (9):358-363, 1999. Review.

Friedrich I, Shir A, Klein S, Levitzki A. RNA molecules as anti-cancer agents. **Semin. Cancer Biol.**, 14(4):223-230, 2004. Review.

Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, Esteban M. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 70(4):1032-1060, 2006. Review.

Geiss G, Jin G, Guo J, Bumgarner R. A comprehensive view of regulation of gene expression by double-stranded RNA-mediated cell signaling. **J. Biol. Chem.**, 276 (32): 30178-30182, 2001.

Ghosh S, May JM, Kopp BE. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, 16:225-260, 1998.

Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. **Cell**, 35:849-857, 1983.

Haines GK3rd , Ghadge G, Thimmappaya B, Radosevich JA. Expression of the protein kinase p-68 recognized by the monoclonal antibody TJ4C4 in human lung neoplasms. **Virchows Arch. B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.**,62(3):151-158, 1992.

Haines GK 3rd, Becker S, Ghadge G, Kies M, Pelzer H, Radosevich JA. Expression of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (p68) in squamous cell carcinoma of the head and neck region. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, 119:1142–1147, 1993.

Haines GK 3rd, Cajulis R, Hayden R, Duda R, Talamonti M, Radosevich JA. Expression of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (p68) in human breast tissues. **Tumour Biol.**, 17(1):5-12, 1996.

Haines GK 3rd, Panos RJ, Bak PM, Brown T, Zielinski M, Leyland J, Radosevich JA. Interferon-responsive protein kinase (p68) and proliferating cell nuclear antigen are inversely distributed in head and neck squamous cell carcinoma. **Tumour Biol.**, 19(1):52-59, 1998.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, 279(5350):509-514, 1998.

Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, 286 (5441):950-952,1999.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, 404(6775): 293-296, 2000.

Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. **Nat. Rev. Genet.**, 2 (2):110-119, 2001. Review.

Hammond SM.; Boetcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. **Science**, 293:834-838, 2001a.

Hannon GJ. RNA interference. **Nature**, 418:244-251, 2002. Review.

Hassani Z, Lemkine GF, Erbacher P, Palmier K, Alfama G, Giovannangeli C, Behr JP, Demeneix BA. Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. **J. Gene. Med.**, 7(2):198-207, 2005.

Hershey JW. Translational control in mammalian cells. **Annu. Rev. Biochem.**, 60:717–755, 1991.

Hideshima T, Chauhan D, Richardson P. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. **J. Biol. Chem.**, 277:16639–16647, 2002.

Hovanessian AG and Galabru J. The double-stranded RNA dependent protein kinase is also activated by heparin. **Eur. J. Biochem.**, 167: 467–473, 1987.

Hsu MY, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. **Differentiation**, 70(9-10):522-536, 2002.

Huang S, Deguzman A, Bucana CD and Fidler IJ. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. **Clin. Cancer Res.**, 6:2573–2581, 2000a.

Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD and Fidler IJ. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. **Cancer Res.**, 60:5334–5339, 2000b.

Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD and Fidler IJ. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. **Oncogene**, 20:4188–4197, 2001.

Hunter T, Hunt T, Jackson RJ, Robertson HD. The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. **J. Biol. Chem.**, 250:409-417, 1975.

Isaacs A and Lindenmann J. Virus interference. I. **The interferon. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, 147(927):258-267, 1957

Jacquemont B and Roizman B. RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. X. Properties of viral symmetric transcripts and of double-stranded RNA prepared from them. **J. Virol.**, 15:707–713, 1975.

Janowska-Wieczorek A, Matsuzaki A, Marquez L. The Hematopoietic Microenvironment: Matrix Metalloproteinases in the Hematopoietic Microenvironment. **Hematology**, 4(6):515-527, 2000.

Jones DR, Broad RM, Madrid LV, Baldwin Jr, Mayo MW. Inhibition of NF-kappaB sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. **Ann. Thorac. Surg.**, 70: 930–936, 2000.

Kaibuchi K, Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M. Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, 11(5):591-596, 1999. Review.

Kasper B, D'Hondt V, Vereecken P, Awada A. Novel treatment strategies for malignant melanoma: a new beginning? **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, 62(1):16-22, 2007. Review.

Kerr IM, Brown RE, Ball LA. Increased sensitivity of cell-free protein synthesis to double-stranded RNA after interferon treatment. **Nature**, 250(461):57-59, 1974.

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes Dev.**, 15: 2654-2659, 2001.

Kichler A. Gene transfer with modified polyethylenimines. **J. Gene Med.**, 6(1):S3-S10, 2004. Review.

Kim SH, Forman AP, Mathews MB, Gunnery S. Human breast cancer cells contain elevated levels and activity of the protein kinase, PKR. **Oncogene**, 19:3086-3094, 2000.

Kim SH, Gunnery S, Choe JK, Mathews MB. Neoplastic progression in melanoma and colon cancer is associated with increased expression and activity of the interferon-inducible protein kinase, PKR. **Oncogene**, 21:8741-8748, 2002.

Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, Hirata K, Miyagishi M, Taira K, Nishikawa M, Takakura Y. Vector-based in vivo RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 308(2):688-693, 2004.

Koizumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K, Saiki I. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. **Cancer Sci.**, 98(11):1652-1658, 2007.

Koromilas AE, Roy S, Barber GN, Katze MG, Sonenberg N. Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible ds RNA-dependent protein kinase, **Science**, 257:1685-1689, 1992.

Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. **Nucleic Acids Res.**, 31(15):4417-4424, 2003.

Kuhen KL, Shen X, Carlisle ER, Richardson AL, Weier HU, Tanaka H, and Samuel CE. Structural organization of the human gene (PKR) encoding an interferon-inducible RNA-dependent protein kinase (PKR) and differences from its mouse homolog. **Genomics**, 36:197–201, 1996.

Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K, Agrawal KC. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. **Cancer Res.**, 65(21):9891-9898, 2005.

Kulbe H, Levinson NR, Balkwill F, Wilson JL. The chemokine network in cancer: much more than directing cell movement. **Int. J. Dev. Biol.**, 48(5-6):489-496, 2004. Review.

Kulbe H, Hagemann T, Szlosarek PW, Balkwill FR, Wilson JL. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. **Cancer Res.**, 65(22):10355-10362, 2005.

Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J, Williams BRG. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF- κ B by phosphorylating I κ B. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, 91:6288-6292, 1994.

Kumar M, Carmichael GG. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62 (4):1415-1434, 1998. Review.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, 294 (5543):853–858, 2001.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. **RNA**, 9(2):175-179, 2003.

Lane WJ, Dias S, Hattori K, Heissig B, Choy M, Rabbany SY, Wood J, Moore MA, Rafii S. Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. **Blood**, 96(13):4152-4159, 2000.

Langland JO, Jin S, Jacobs BL, Roth DA. Identification of plant-encoded analog of PKR, the mammalian double-stranded RNA-dependent protein kinase. **Plant Physiol.**, 108:1259-1267, 1995.

Langland JO, Langland LA.; Browning KS, Roth DA. Phosphorylation of plant eukaryotic initiation factor-2 by the plant-encoded double-stranded RNA-dependent protein kinase, pPKR, and inhibition of protein synthesis invitro. **J. Biol. Chem.**, 271, 4539-4544, 1996.

Langland JO and Jacobs BL. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. **Virology**, 299:133–141, 2002.

Lau N, Lim L, Weinstein E, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 294(5543):858–862, 2001.

Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. **Science**, 271: 981-983, 1996.

Laurent AG, Krust B, Galabru J, Svab J, Hovanessian AG. Monoclonal antibodies to an interferon-induced Mr 68,000 protein and their use for the detection of double-stranded RNA-dependent protein kinase in human cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 82:4341–4345, 1985.

Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. **RNA**, 10(5):766-771, 2004.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, 75(5):843–854, 1993.

Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 294(5543):862–864, 2001.

Lee SB, Melkova Z, Yan W, Williams BR, Hovanessian AG, Esteban M. The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase potently inhibits protein synthesis in cultured cells. **Virology**, 192:380–385, 1993.

Lee SB, Bablanian R, Esteban M. Regulated expression of the interferon-induced protein kinase p68 (PKR) by vaccinia virus recombinants inhibits the replication of vesicular stomatitis virus but not that of poliovirus. **J. Interferon Cytokine Res.**, 16:1073–1078, 1996.

Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. **Nature**, 401(6753):517-518, 1999.

Lengyel P. Tumor-suppressor genes: news about the interferon connection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 90: 5893–5895, 1993.

Li J, Petryshyn RA. Activation of the double-stranded RNA-dependent eIF-2 alpha kinase by cellular RNA from 3T3-F442A cells. **Eur.J. Biochem.**, 195:41-48, 1991.

Li W, Szoka FC Jr. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. **Pharm Res.**, 24(3):438-449, 2007. Review.

Liang Z, Wu T, Lou H, Yu X, Taichman RS, Lau SK, Nie S, Umbreit J, Shim H. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. **Cancer Res.**, 64(12):4302-4308, 2004.

Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. **Science**, 299 (5612):1540, 2003.

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. **Nature**, 284(5751):67-68, 1980.

Liu Q, Muruve DA. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. **Gene Ther.**, 935-940, 2003. Review.

Majumdar R and Maitra U. Regulation of GTP hydrolysis prior to ribosomal AUG selection during eukaryotic translation initiation. **EMBO J.**, 24:3737–3746, 2005.

Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. **Mol. Cell. Biol.**, 12:5238–5248, 1992.

Maran A, and Mathews MB. Characterization of the double-stranded RNA implicated in the inhibition of protein synthesis in cells infected with a mutant adenovirus defective for VA RNA. **Virology**, 164:106–113, 1988.

Martinez JA, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNA guide target RNA cleavage in RNA. **Cell**, 110(5): 563-574, 2002.

Mattick JS. Introns: evolution and function. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, 4:823–831, 1994.

Mattick JS. Non-coding RNAs: the architects of eukariotic complexity. **EMBO reports**, 21(11):986-991, 2001.

Mattick JS, Gagen MJ. The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. **Mol.Biol. Evol.**, 18(9):1611-1630, 2001.

Mattick JS. RNA regulation: a new genetics? **Nat. Rev. Genet.**, 5(4):316-323, 2004. Review.

McManus MT and Sharp PA. Gene silencing in mammals by *small interfering* RNAs. **Nature Rev. Genet.**, 3:737-747, 2002.

McMillan NA, Chun RF, Siderovski DP, Galabru J, Toone WM, Samuel CE, Mak TW, Hovanessian AG, Jeang KT and Williams BRG. HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. **Virology**, 213(2):413-424, 1995.

Meurs EF, Galabru J, Barber GN, Katze MG, Hovanessian AG. Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, 90:232-236, 1993.

Moss EG and Taylor JM. Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system. **Nat. Cell. Biol.**, 5(9):771-772, 2003.

Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Erin Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, 410: 50–56, 2001.

Murad JM, de Souza LR, De Lucca FL. PKR activation by a non-coding RNA expressed in lymphocytes of mice bearing B16 melanoma. **Blood Cells Mol. Dis.**, 37(2):128-133. 2006.

Murakami T, Maki W, Cardones AR, Fang H, Tun Kyi A, Nestle FO, Hwang ST. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. **Cancer Res.**, 62(24):7328-734, 2002.

Murakami T, Cardones AR, Hwang ST. Chemokine receptors and melanoma metastasis. **J. Dermatol. Sci.**, 36(2):71-78, 2004. Review.

Murdoch C and Finn A. Chemokine receptors and their role in infectious diseases. **Blood**, 95:3023–3043, 2000.

Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annu.Ver. Immunol.**,12:593-633, 1994. Review.

Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. **N. Engl. J. Med.**, 345(11):833-5, 2001. Review.

Nagasawa T, Tachibana K, Kawabata K. A CXC chemokine SDF-1/PBSF: a ligand for a HIV coreceptor, CXCR4. **Adv. Immunol.**, 71:211-228, 1999. Review.

Nakajima M, Irimura T, Di Ferrante N, Nicolson GL. Metastatic melanoma cell heparanase. Characterization of heparan sulfate degradation fragments produced by B16 melanoma endoglucuronidase. **J. Biol. Chem.**, 259(4):2283-2290, 1984.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **Plant Cell**, 2:279-289,1990.

Nebreda AR and Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. **Trends Biochem. Sci.**, 25(6):257-60. 2000. Review.

Nellen W, Sczakiel G. In vitro and in vivo action of antisense RNA. **Mol. Biotechnol.**, 6(1):7-15, 1996. Review.

Nicolson GL. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. **Cancer Metastas. Rev.**, 12:325-343, 1993.

Nussbaum JM, Gunnery S, Mathews MB. The 3'-untranslated regions of cytoskeletal muscle mRNAs inhibit translation by activating the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. **Nucleic Acids Res.**, 30:1205-1212, 2002.

Nussbaum JM and Gunnery S. Transcriptional upregulation of interferon-induced protein kinase, PKR, in breast cancer, **Cancer Lett.**, 196:207-216, 2003.

Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and *small interfering* RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell**, 107: 309-321, 2001.

Oku T, Tjuvajev JG, Miyagawa T, Sasajima T, Joshi A, Joshi R, Finn R, Claffey KP, Blasberg RG. Tumor growth modulation by senso and antisense vascular endothelial growth factor gene expression: effects on angiogenesis, vascular permeability, blood volume, blood flow, fluorodeoxyglucose uptake, and proliferation of human melanoma intracerebral xenografts. **Cancer Res.**, 58(18):4185-4192, 1998.

Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 99(3):1443-1448, 2002.

Pancoska P, Moravek Z. Efficient RNA interference depends on global context of the target sequence: quantitative analysis of silencing efficiency using Eulerian graph representation of siRNA. **Nucleic Acids Res.**, 32(4):1469-1479, 2004.

Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. **Mol. Cell.**, 6(5):1077-1087, 2000.

Passos GA Jr, De Lucca FL. In vivo induction of immunological memory to human tumor extract with poly (A)-containing immune RNA. **Cell. Mol. Biol.**, 34(2):157-164, 1988.

Passos GA Jr, De Lucca FL. RNA-mediated transfer of cellular immunity to a synthetic env antigen of the human immunodeficiency virus (HIV-1). **Mol. Cell. Biochem.**, 108:1-8, 1991.

Payne, AS and Cornelius LA. The Role of Chemokines in Melanoma Tumor Growth and Metastasis. **J. Invest. Dermatol.**, 118(6):915-922. 2002.

Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. **Nat. Med.**, 2:1174-1178, 1996.

Proud CG. PKR: a new name and new roles. **Trends. Biochem. Sci.**, 20(6): 241-246, 1995.

Rakoff-Nahoum S. Why Cancer and Inflammation? **Yale J. Biol. Med.**, 79: 123-130, 2006.

Reed JC, Stein C, Subasinghe C, Haldar S, Croce CM, Yum S, Cohen J. Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. **Cancer Res.**, 50(20):6565-6570, 1990.

Roberts WK, Hovanessian A, Brown RE, Clemens MJ, Kerr IM. Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. **Nature**, 264(5585):477-480, 1976.

Robledo MM, Bartolome RA, Longo N, Rodríguez-Frade, JM, Mellado M, Longo I, Teixidó J. Expression of Funcional Chemokine Receptors CXCR3 and CXCR4 on Human Melanoma Cells. **J. Biol. Chem.**, 276(48):45098-45105, 2001.

Roff M, Thompson J, Rodriguez MS, Jacque JM, Baleux F, Arenzana-Seisdedos F, Hay RT. Role of IkappaBalpha ubiquitination in signal-induced activation of NFkappaB in vivo. **J. Biol. Chem.**, 271(13):7844-7850, 1996.

Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. **J. Cell. Physiol.**, 213(3):589-602, 2007.

Sales VSF, Sawan FM, Watanabe MAE, Silva JS, Voltarelli JC, De Lucca FL. *In vitro* transfer of cellular immunity to synthetic peptides of HIV-1 to human lymphocytes with exogenous RNA. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 91:349, 1996.

Samuel CE. The elf-2 α protein kinases, regulators of translation in eukariotics from yeasts to humans. **J. Biol. Chem.**, 268(11): 7603-7606, 1993. Review.

Saunders LR and Barber GN. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. **FASEB J.**, 17(9):961–983, 2003.

Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, Molema g, Lu PY, Scaria PV, Woodle MC. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. **Nucleic Acids Res.**, 32(19):e149, 2004.

Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. **Mol. Cell.**, 10: 537-548, 2002.

Scotlandi K, Maini C, Manara MC, Benini S, Serra M, Cerisano V, Strammiello R, Baldini N, Lollini PL, Nanni P, Nicoletti G, Picci P. Effectiveness of insulin-like growth factor I receptor antisense strategy against Ewing's sarcoma cells. **Cancer Gene Ther.**, 9(3):296-307, 2002.

Seftor RE, Seftor EA, Hendrix MJ. Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. **Cancer Metastasis Rev.**, 18(3):359-375, 1999.

Sekellick MJ, Carra SA, Bowman A, Hopkins DA, Marcus PI. Transient resistance of influenza virus to interferon action attributed to random multiple packaging and activity of NS genes. **J. Interferon Cytokine Res.**, 20:963–970, 2000.

Sen R, Baltimore D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. **Cell.**, 47:921-928, 1986.

Sharp PA. RNA interference. **Genes Dev.**, 1(5): 485-490, 2001. Review.

Shimada A, Shiota G, Miyata H, Kamahora T, Kawasaki H, Shiraki K, Hino S, Terada T. Aberrant expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase in hepatocytes of chronic hepatitis and differentiated hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.**, 58(19):4434-4438, 1998.

Singh C, Haines GK, Talamonti MS, Radosevich JA. Expression of p68 in human colon cancer. **Tumour Biol.**, 16(5):281-289, 1995.

Singh S, Sadanandam A, Singh RK. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, 26(3-4):453-467, 2007.

Sioud M. RNA interference and innate immunity. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 59(2-3):153-163, 2007. Review.

Sioud M, Furset G, Cekaite L. Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 361(1):122-126, 2007.

Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. **Nat. Cell. Biol.**, 5(9):834-839, 2003.

Sloane BF, Dunn JR, Honn KV. Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. **Science**, 212(4499):1151-1153, 1981.

Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine Gary, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. **Nature**, 432, 173-178, 2004.

Squire J, Meurs EF, Chong KL, McMillan NA, Hovanessian AG, Williams BR. Localization of the human interferon-induced, ds-RNA activated p68 kinase gene (PRKR) to chromosome 2p21-p22. **Genomics**, 16:768-770, 1993.

Srivastava SP, Kumar KU, Kaufman RJ. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.**, 273:2416-2423, 1998.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. **Annu. Rev. Biochem.**, 67:227-264, 1998. Review.

Stojdl DF, Abraham N, Knowles S, Marius R, Brasey A, Lichty BD, Brown EG, Sonenberg N, Bell JC. The murine doublestranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. **J. Virol.**, 74:9580–9585, 2000.

Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, 270(45): 27348–27357, 1995.

Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ, Ramaiah KV. Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. **Biochemistry**, 39:12929–12938, 2000.

Szymanski M, Barciszewski J. Beyond the proteome: non- coding regulatory RNAs. **Genome Biology**, 3(5): reviews 0005.1-0005.8, 2002.

Tan SL, Katze MG. The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death? **J. Interferon Cytokine Res.**, 19(6):543-554, 1999. Review.

Tanaka H and Samuel CE. Mechanism of interferon action: structure of the mouse PKR gene encoding the interferon-inducible RNAdependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 91:7995–7999, 1994.

Tarhini AA, Agarwala SS. Interleukin-2 for the treatment of melanoma. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, 6(12):1234-1239, 2005. Review.

Taylor DR, Lee SB, Romano PR, Marshak DR, Hinnebusch AG, Esteban M, Mathews M B. Autophosphorylation sites participate in the activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR. **Mol. Cell. Biol.**, 16:6295–6302, 1996.

Terada T, Ueyama J, Ukita Y, Ohta T. Protein expression of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in intrahepatic bile ducts in normal adult livers, fetal livers, primary biliary cirrhosis, hepatolithiasis and intrahepatic cholangiocarcinoma. **Liver.**, 20(6):450-457, 2000.

Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested ds RNA. **Nature**, 395: 854, 1998.

Tuschl T. RNA interference and *small interfering* RNAs. **Chem. Biochem.**, 2:239-245, 2001.

Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, Czubyko F, Aigner A. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. **Gene Ther.**, 12 (5): 461-466, 2005.

Uprichard SL. The therapeutic potential of RNA interference. **FEBS Lett.**, 579(26):5996-6007, 2005. Review.

Van Der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in Petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **Plant Cell**, 2:291-299, 1990.

Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. **Genes Dev.**, 9(22):2723-2735, 1995. Review.

Vorburger SA, Pataer A, Swisher SG, Hunt KK. Genetically targeted cancer therapy: tumor destruction by PKR activation. **Am. J. Pharmacogenomics**, 4(3):189-198, 2004. Review.

Wassarman KM, Zhang A, Storz G. Small RNAs in *Escherichia coli*. **Trends Microbiol.**, 7:37–45, 1999.

Watanabe MAE, Almeida DO, Serrano SV, Sales VSF, Soares FA, De Lucca FL. Immunotherapy of metastases with lymphocytes treated with exogenous RNA in mice bearing B16 melanoma. **Cell. Mol. Biol.**, 43(3):393-8, 1997.

Watanabe MAE, Souza LR, Murad JM, De Lucca FL. Antitumor activity induced by regulatory RNA: possible role of RNA-dependent protein kinase and nuclear factor- κ B. **Eur.J. Pharmacol.**, 465: 205– 210, 2003.

Watanabe MAE, Souza LR, Murad JM, De Lucca FL. Activation of the RNA-dependent protein kinase of lymphocytes by regulatory RNAs: implications for immunomodulation in HIV infection, **Curr. HIV Res.**, 3:329–337, 2005.

Watanabe MA, de Souza LR, Murad JM, De Lucca FL. Activation of the RNA-dependent protein kinase (PKR) of lymphocytes by regulatory RNAs: implications for immunomodulation in HIV infection. **Curr. HIV Res.**, 3(4):329-337, 2005b. Review.

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, 411(6839):834-842, 2001. Review.

Williams BR. Role of the double strand RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. **Biochem. Soc. Trans.**, 25(2): 509-513, 1997.

Williams BR. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. **Oncogene**,18:6112–6120, 1999.

Williams BR. Signal integration via PKR. **Sci. STKE**, RE2, 2001.

Xie FY, Woodle MC, Lu PY. Harnessing in vivo siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. **Drug Discov. Today**, 11(1-2):67-73, 2006. Review.

Yang YL, Reis LF, Pavlovic J, Aguzzi A, Schäfer R, Kumar A, Williams BR, Aguet M, Weissmann C. Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase, **EMBO J.**, 14:6095-6106, 1995.

Yang D, Lu H, Erickson JW. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. **Curr. Biol.**, 10(19):1191-1200, 2000.

Zamanian-Daryoush M, Der SD, Williams BR. Cell cycle regulation of the double stranded RNA activated protein kinase, PKR. **Oncogene.**, 18:315-326, 1999.

Zamanian-Daryoush M, Mogensen TH, DiDonato JA, Williams BR. NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. **Mol. Cell. Biol.**, 20(4):1278-1290, 2000.

Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 75(1):280-284, 1978.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. **Cell**, 101:25-33, 2000.

Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. **Science**, 296:1265-1269, 2002.

Zhang F, Romano PR, Nagamura-Inoue T, Tian B, Dever TE, Mathews MB, Ozato K, Hinnebusch AG.. Binding of doublestranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop. **J. Biol. Chem.**, 276:24946–24958, 2001.

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. **Nature**, 393(6685):595-599, 1998.

Anexo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)