



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Análise do papel das proteínas do complexo Polycomb na proliferação e apoptose de células de melanoma maligno

Gustavo Bastos, Hugo Rezende, Monica Maertens, Paula
Gonçalves, Rafael Ribeiro Almeida e Stella Maris

**Dezembro
2007**

1- INTRODUÇÃO

1.1- O câncer

Cancro ou câncer é uma doença caracterizada por uma população de células que cresce e se divide sem respeitar os limites normais. Estas células invadem e destroem tecidos adjacentes, e podem se espalhar para lugares distantes do corpo, através de um processo chamado metástase. Estas propriedades malignas do câncer o diferencia dos tumores benignos, que são auto-limitados em seu crescimento e não invadem tecidos adjacentes (embora alguns tumores benignos sejam capazes de se tornarem malignos). O câncer pode afetar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de câncer aumenta com o aumento da idade. O câncer causa cerca de 13% de todas as mortes no mundo.

1.2- O câncer de pele

As neoplasias cutâneas estão relacionadas a alguns fatores de risco, como o químico (arsênico), a radiação ionizante, processo irritativo crônico (úlceras de Marjolin), genodermatoses (xeroderma pigmentosum, etc) e principalmente à exposição aos raios ultravioletas do sol.

O câncer de pele é mais comum em indivíduos com mais de 40 anos, sendo relativamente raro em crianças e negros, com exceção daqueles que apresentam doenças cutâneas prévias. Indivíduos de pele clara, sensíveis à ação dos raios solares, ou com doenças cutâneas prévias, são as principais vítimas do câncer de pele.

Como a pele é um órgão heterogêneo, esse tipo de câncer pode apresentar neoplasias de diferentes linhagens. Os mais frequentes são: carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer de pele, o carcinoma epidermóide com 25% dos casos e o melanoma, detectado em 4% dos pacientes. Felizmente, o carcinoma basocelular, mais frequente, é também o menos agressivo. Este tipo e o carcinoma epidermóide são também chamados de câncer de pele não melanoma, enquanto o melanoma e outros tipos, com origem nos melanócitos, são denominados de câncer de pele melanoma.

1.3- O Melanoma

O melanoma maligno origina-se nos melanócitos, as células que produzem o pigmento melanina que confere cor à pele.

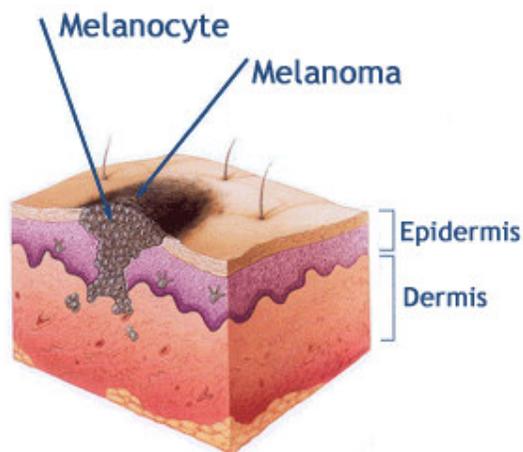


Fig. 1- Representação esquemática de um melanoma na epiderme, que se apresenta como uma mancha de coloração escura.

O melanoma geralmente apresenta-se como uma pinta de coloração preto, castanho, vermelho, azul ou cor da pele (Fig. 1). O que chama a atenção é seu crescimento rápido, bordas irregulares e normalmente múltiplas cores na mesma lesão. Pode surgir da pele sã ou de lesões pigmentadas pré-existentes (as "pintas" ou "sinais" de nascença).

Inicialmente, o melanoma não tem possibilidade de metástase e cresce apenas alastrando pela pele (crescimento radial ou horizontal). Com o aumento do número de células, há maior probabilidade de uma delas desenvolver as mutações que lhe permitam tornar-se invasiva (por exemplo expressão de genes de enzimas degradadoras do colágeno do tecido conjuntivo envolvente, uma barreira à proliferação). Essa célula então se multiplica e inicia a fase de crescimento vertical, invadindo os tecidos adjacentes.

1.4- Incidência mundial de melanoma no Brasil e no mundo

Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevivência dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do mesmo. Nos países desenvolvidos, a sobrevivência média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que, para os países em desenvolvimento, a sobrevivência média é de 56%. A média mundial estimada é de 69% (Figueira et al., 2000).

O melanoma de pele é menos frequente do que os outros tumores de pele (basocelulares e de células escamosas), porém sua letalidade é mais elevada. A Organização Mundial de Saúde estima que anualmente ocorram cerca de 132 mil casos novos desse câncer no mundo, e em termos de prevalência seja cerca de 2,5%. Tem-se observado um expressivo crescimento na incidência deste tumor em populações de cor de pele branca. Quando os melanomas são detectados em estágios iniciais os mesmos são curáveis.

A ocorrência de melanoma no Brasil é analisada a partir dos dados de mortalidade disponíveis no Ministério da Saúde e dos dados de incidência dos seis Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), localizados em seis capitais brasileiras. Existe em nosso país uma grande carência de informações e dados estatísticos sobre incidência de câncer. Mesmo com a ampliação de registros, visando obter dados muito próximos da realidade e conseqüentemente um perfil bastante fidedigno da distribuição do câncer no país, não significa que estimativas sejam um bom instrumento para se ter as informações de um país da extensão territorial brasileira.

No Brasil, a letalidade do melanoma é elevada, porém sua incidência é baixa, 2.710 novos casos em homens e 3.050 em mulheres previstos, segundo as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul e Sudeste, as mais populosas do país (Estimativa Ministério da Saúde, 2006).

Concluiu-se pela necessidade de se conduzir estudos no Brasil entre comunidade de indivíduos de pele clara, os quais apresentam risco potencializado para o desenvolvimento de melanoma, uma vez que a inexistência de informações recentes mais abrangentes e detalhadas sobre as neoplasias malignas de pele no Brasil, impossibilita que se trace o perfil real da magnitude do problema.

1.5- Polycomb: genes, proteínas e complexos

O grupo de genes Polycomb (PcG) atuam com um papel vital na herança estável dos tecidos e células pois atuam silenciando padrões e são responsáveis pela manutenção da identidade celular por gerações sucessivas. Os genes PcG foram primeiro descobertos como silenciadores epigenéticos durante a embriogênese e foi achado relação com papel no desenvolvimento do coração, esqueleto e sistema nervoso. No entanto, genes PcG tem um papel central no regulamento de vários processos nos adultos, incluindo o ciclo celular, linfopoiese e inativação gênica. Vários genes de PcG foram identificados como oncogenes. As proteínas de PcG usam territórios conservados de proteína para formar complexos multiméricos. Em seres humanos, o complexo Polycomb repressivo 1 (PRC1) contem o BMI1/ MEL18, ANEL, HPC e proteínas PcG de HPH. Outro complexo, PRC2, é composto de EED, EZH, SUZ12 e YY1. Estas proteínas representam o "âmago" evolutivo do complexo conservado, mas a composição de complexos PcG é determinada por tipo de célula e tipo de tecido e por estado de proliferação. Várias proteínas PcG reagem ou localizam-se flanqueadas por várias proteínas de não-PcG, incluindo a transcrição modulators CtBP, E2F6, KyoT2, RYBP, AF9, SSX e o MAPA/KAP kinase 3pK. Todas estas proteínas podem contribuir à atividade de silenciamento dos complexos PcG, sua capacidade de unir cromatina, e muitos são envolvidas em oncogênese.

1.6- Mecanismos de supressão dos complexos de Pcg

Os complexos PcG unem cromatina e estão diretamente envolvidos na remodelagem da estrutura da cromatina, como uma consequência; controle de atividade de genes. Duas das formas mais conhecidas de modificação da cromatina são acetilação da cauda de histona e metilação, que, de modo geral, resulta em ativação de gene e silenciamento, respectivamente. Os complexos PcG associam-se com, ou contêm, várias enzimas que modificam caudas de histona, incluindo desacetilases de histonas (HDACs), transferases de metilação de histonas (HMTs) e uma ligase de ubiquitina. Em PRC2, a proteína de EED recruta o HDAC1/2 HDACs, ao passo que EZH2 é um HMT conhecido lisina metilase de histona H3. O outro complexo de PcG, PRC1, é associado com atividade de HMT e contem CBX4/HPC2, que tem atividade de ligase, e RING1/RNF2, que são ligases de ubiquitina essa lisina promove ubiquitinação de histona H2A. A maioria destas atividades enzimáticas são evolutivamente conservadas, e silenciam a transcrição de genes alvo de PcG por apresentação de marcas epigenéticas

tal como resíduos desnaturados de lisina em caudas de histona. Além disso, promovem interferência com componentes chaves do complexo, PcG retira estas marcas epigenéticas e alivia repressão de genes alvo de PcG. Atualmente é comumente aceito que alterações da estrutura da cromatina é o modo principal de ação de complexos de PcG. Este processo é iniciado por atividade de HDAC do complexo de "iniciação" PRC2, nas quais caudas de histona de âmago de desacetilases. Isto é seguido por metilação destes resíduos, mais possível por atividade de HMT de EZH2 em PRC2. As experiências em *Drosophila* demonstraram interação transitória entre componentes dos dois complexos quando o tempo de silenciar é estabelecido. O recrutamento do complexo PRC1 pode levar a metilação adicional pelo SUV39H1 HMT em PRC1 e estabelecimento de um padrão estável de supressão de genes.

1.7- O papel das proteínas do complexo Polycomb na oncogênese

A manutenção da quiescência prolongada (por se manter sem se submeter a divisões celulares), capacidade de auto-renovação, e multipotência são as características marcantes de células tronco adultas. Auto-renovação ocorre predominantemente por sucessivas divisões celulares que ocorrem simetricamente e assimetricamente.

Divisões celulares assimétricas preservam a manutenção do número de células tronco e homeostase celular, enquanto divisões celulares simétricas podem levar a diferenciação celular aberrante (Morrison SJ e Kimble J., 2006). Oncogênese é uma diferenciação aberrante nas células que envolve a regulação inapropriada de genes do desenvolvimento e via de sinalização celular que leva a iniciação do câncer. (Hanahan D e Weinberg RA., 2000). Além das conhecidas mudanças genéticas, que ocorrem no câncer, tais como a repressão de genes supressores de tumor, amplificação de oncogenes e perda da heterozigose ou mutações gênicas nos genes associados a tumores ((Hanahan D e Weinberg RA., 2000), danos epigenéticos como a alteração no padrão de metilação de DNA, desregulação do remodelamento de cromatina por modificações na histona e expressão de proteínas PcG emergem como marcadores para muitos tipos de cânceres (Squazzo SL, et al, 2006; Enver T, et al, 2005; Esteller M., 2007). Além do mais, anormalidades epigenéticas cooperam com alterações genéticas na manifestação de vários fenótipos cancerosos (Jones PA.,2007, Vire E,et al.,2006). Por exemplo, modificações em histonas do genoma são marcadores comuns de cânceres humanos

(Fraga MF, et al., 2005, Seligson DB, et al., 2005). Similarmente, existem metilações aberrantes de grandes regiões de genomas cancerosos (Frigola J, et al., 2006, Widschwendter M, et al., 2007). Aproximadamente, 50% dos genes associados com cânceres familiares representam mutações conduzidas por silenciamento de genes metilação oncorelacionados em várias formas esporádicas de tumores (Jones PA, et al., 2002). Não surpreendentemente, expressões aberrantes de proteínas PcG e TrxG implicaram em tumorigêneses (Valk-Lingbeek ME, et al., 2004; Pasini D, et al., 2004; Raaphorst FM., 2005). Componentes de PRC1 (como as BMI1) e PRC2 (como as EZH2) são amplificadas e/ou super expressos em uma gama de cânceres. Desregulação na expressão de componentes PRC está associada com alterações na composição de proteínas PcG (Kuzmichev A, et al., 2005) assim como com a afinidade de genes alvos (Squazzo SL., et al., 2006). Além disso, a desrupção farmacológica da repressão gênica dependente de PRC2 induziu apoptose somente em células cancerosas e não em células normais (Tan J, et al., 2005).

É entendido que um equilíbrio funcional estrito entre oncogenes e genes supressores de tumor regula a função das células tronco ao longo da vida (Pardal R, et al., 2003; Parrish JZ, et al., 2007). Uma desregulação nessa interação, como aquelas que normalmente ocorrem com a idade (Sharpless NE, et al., 2005; Lu H, et al., 2006) ou inflamação (Lu H, et al., 2006; Coussens LM, 2002), podem resultar no desenvolvimento de cânceres, dependendo do grau de aberração encontrado nos níveis e função das proteínas PcG. Portanto, as aberrações epigenéticas são entendidas por apresentarem um papel central na transformação neoplásica inicial baseada no fato das células tronco no tecido tumoral constituir um substrato para essas alterações epigenéticas iniciais (Feinberg AP, et al., 2006; Jones PA, et al., 2007; Baylin SB, et al., 2007).

1.9- Células tronco cancerosas - Controle epigenético

Câncer é uma doença altamente heterogênea, variações epigenéticas na célula progenitora podem contribuir para a heterogeneidade do tumor. Células tronco e progenitoras não neoplásicas, mas epigeneticamente anormais são sugeridas como células marcadoras de risco de câncer (Feinberg AP, et al., 2006). Análogo ao papel das células tronco adultas na homeostase do tecido, tumores de vários tipos de câncer também mantêm uma população mínima de células iniciadoras de tumor, chamadas de células cancerosas parecidas com tronco ou células cancerosas tronco (Reya T, et al., 2001; Wicha MS, et al., 2006). Similar as células tronco adultas, as células tronco

cancerosas são capazes de manter a quiescência por períodos prolongados e se auto renovar, enquanto matem a habilidade para se diferenciar em vários tipos de células.

Acredita-se que células tronco cancerosas são originadas de mutações em células tronco adultas que sofreram alterações genéticas específicas ou por diferenciação de células somáticas maduras por aquisição de características de células tronco (Clarke MF, et al.,2006; Ohm JE,et al.,2007). O efeito oposto de diferentes proteínas PcG, tais como aqueles observados entre Cbx2 e Bmi1, Me118 e Bmi1, ou Eed e Bmi1, podem romper o delicado balanço entre auto-renovação e diferenciação, levando ao desenvolvimento do câncer (Kuzmichev A, et al.,2005; Lessard J, et al.,1999; Dahiya A,et al.,2001). Consistente com os últimos conceitos, genes de manutenção de célula tronco embrionária como OCT4 e NANOG se apresentaram inapropriadamente expressos em muitos tumores humanos (Monk M, et al.,2001; Gidekel S, et al.,2001). Particularmente, Gidekel et al. demonstraram que Oct4 confere um potencial oncogênico as células tronco embrionárias de maneira dose dependente (Gidekel S, et al.,2001). Ativação de Oct4 resulta em crescimento no tecido epitelial e é dependente da expressão contínua de Oct4 (Hochedlinger K, et al.,2004) . Baseado nessas observações que a expressão de oct4 causa displasia por inibir diferenciação celular no intestino, tem sido proposto que progenitores adultos podem integrar os principais sinais embrionários para conduzir à formação de tumor (Hochedlinger K,et al.,2005).

Devido ao papel fundamental dos genes PcG e modificação das histonas na manutenção das células tronco e desenvolvimento de tumor, sugere-se que o potencial oncogênico dos genes PcG, tais como BMI1 e EZH2, podem também facilitar a manutenção das células tronco cancerosas (Pardal R, et al,2003; Reya T,et al.,2001). Sabe-se também a isoforma-2 de Eed é expressa em câncer e células tronco embrionária indiferenciadas, mas não nas células embrionárias diferenciadas (Kuzmichev A, et al.,2005). De maneira similar, altos níveis de Suz12 são encontrados em células tumorais adultas, enquanto elas apresentam baixos níveis de expressão em células adultas normais (Squazzo SL,et al.,2006). É possível que super expressão de componentes de PRC afetem o delicado balanço na estequiometria normal de proteínas PcG. De fato, foi comprovado que marcadores Suz12_/Eed_ e Suz12_/Eed_ representam diferentes grupos funcionais em células tumorais e que fatores parecidos com Oct4 podem facilitar o recrutamento de Suz12 para certos subsistemas de promotores de genes caracterizados como Oct4_/Suz12_/RNA polimerase II (Squazzo SL, et al.,2006). Isso pode não somente alterar o perfil de metilação das histonas, mas

podem ainda induzir aberrações transcricionais requeridas para transformação celular (Kuzmichev A, et al.,2005; Margueron R,et al.,2005).

Os genes marcados pelas PcG tem mostrado uma maior possibilidade de adquirir hipermetilação em um promotor específico durante a progressão do câncer do que os genes não marcados (Boyer LA, et al.,2006; Kamminga LM, et al.,2006). A princípio, o reversível padrão de silenciamento transcricional epigenético em células tronco é substituído por uma suposta metilação aberrante de DNA mediada pela ligação PRC-DNMT (DNA metiltransferases). Isso pode potencialmente predispor as células tronco afetadas a se tornar uma célula precursora de câncer, sugerindo a origem de uma célula cancerosa a partir de uma célula tronco (Kamminga LM,et al.,2006). Uma grande porcentagem de promotores gênicos que são metilados em cânceres (câncer de cólon) parecem ser pré-marcados com o padrão H3K27me3 e por uma alta regulação dos componentes PRC (Schlesinger Y,et al.,2007). Os genes ligados as proteínas PcG com promotores de DNA hipermetilados em células cancerosas humanas adultas não são metilados nem em células tronco embrionárias normais nem em seus correspondentes malignos, nomeadas de células carcinoma embrionária (CE) (Kamminga LM,et al.,2005). Diferente das células cancerosas normais, as células CE mantêm o potencial de multilinhagens. Durante o desenvolvimento embrionário regular, o padrão de cromatina permite a ativação apenas de genes normais para o curso do desenvolvimento. Dessa forma, as células CE adquirem dois marcadores de repressão adicionais, o H3K9me3 e H3K9me2, em um estado de transição epigenético. Acredita-se que a combinação dos marcadores H3K27me3 com os H3K9me2/3 estimula uma substituição do silenciamento transitório de promotores de genes supressores de tumor nas células troncos e/ou nas células progenitoras para um silenciamento gênico herdável por aquisição de níveis aberrantes de PcG, que induz hipermetilação de novo de ilhas de CpG de promotores de DNAs em células tronco cancerosas (Boyer LA, et al.,2006;vet al.,2007). Então, isso mostra que existe um fino controle dos mecanismos epigenéticos de silenciamento de genes em tumores adultos (Fig. 1) (Ohm JE,et al.,2007).

De interesse, o *locus* p16*INK4a*-ARF representa um dos candidatos identificados acima com promotores de DNAs hipermetilados nas células cancerosas, mas não nas células normais. Esse *locus* codifica dois produtos gênicos de splicing alternativo, a proteína supressora de tumor p16*INK4a* (um inibidor de progressão do ciclo celular) e ARF (um regulador de p53) (Esteller M.,2007). BMI1 é um repressor de p16*INK4a* bem conhecido e, em alguns casos, como em células de mamíferos, também do gene ARF

(Jacobs JJ, et al.,1999; Molofsky AV, et al.,2007). Bmi1 and Ezh2 promovem tanto a auto-renovação de células tronco quanto a proliferação aberrante de células tronco cancerosas por reprimir o *locus* da p16^{INK4a}-ARF(Molofsky AV,et al., 2006). De forma importante, essa repressão tem demonstrado requerer uma associação direta de BMI1 e depender da formação de H3K27me3 pelo EZH2 contido no PRC2 (Kotake Y, et al., 2007). A presença de EZH2 no *locus* INK4A-ARF e o fato de EZH2 poder agir como uma plataforma para DNMTs (Vire E,et al., 2006) são consistentes com as observações da ligação entre proteínas PcG e as DNMTs durante progressão do câncer.

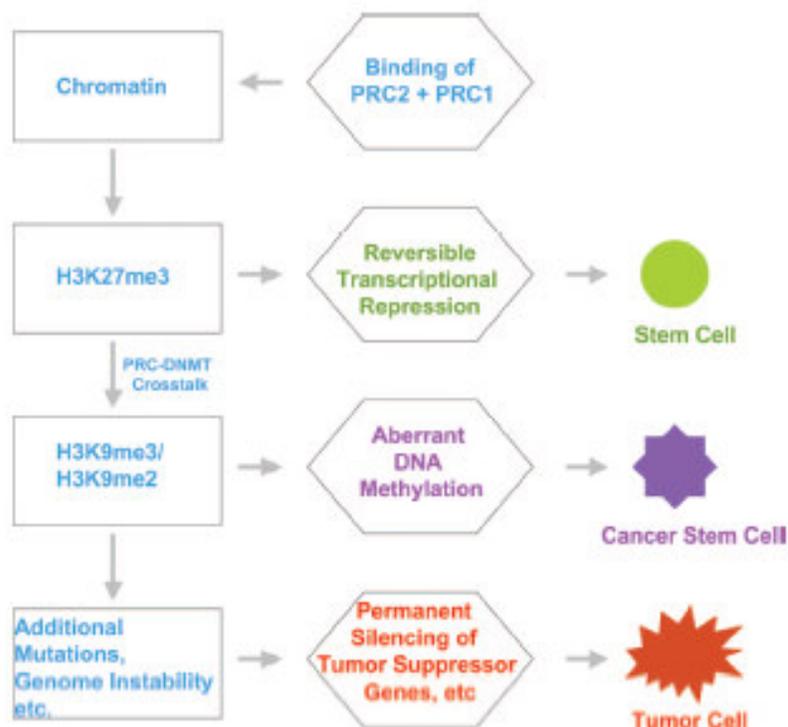


Fig.2- Modelo esquemático das mudanças epigenéticas no início do câncer. Progressão gradual de marcadores epigenéticos de repressão gênica reversível em células tronco (incluindo as células troncos embrionárias) via transiente hipermetilação aberrante de promotores de DNA em células tronco/precursoras cancerosas (células carcinoma embrionárias) para o “locked-in state” de silenciamento gênico em cânceres. (ex. Células tumorais). Abreviações DNMT, DNA methyltransferase; PRC, Polycomb repressive complex. (Rajasekhar VK, e Begemann M, 2007).

Alternativamente, durante a indução da senescência pela idade celular e estresse, a ativação do *locus* p16^{INK4a}-ARF mostrou depender de uma associada diminuição nos níveis de EZH2 e concomitante perda de marcação H3K27me3, e a conseqüente deslocamento de BMI1 (Molofsky AV, et al., 2005). Expressão de EZH2 tem se

apresentado como um marcador funcional que distingue câncer de próstata indolente daqueles que apresentam risco para progressão letal (Varambally S, et al., 2002). De forma similar, elevação na expressão de EZH2 detectada em lesões pré-neoplásicas em epitélio de mama morfológicamente normal *in vivo* e tecido de mama histologicamente distinto do normal no elevado risco para transformação. Diminuição da expressão de EZH2 mediada por pequenos RNA de interferência (siRNAs) resultou tanto em uma redução de marcação de H3K27me3 quanto na perda de sobrevivência clonogênica de células de leucemia mielógena (Fiskus W, et al., 2006). Dessa forma, seria interessante investigar se a super expressão em células tronco não conferiria uma resistência ao estresse e a idade, além de permitir que essas células com forma temporal para adquirir lesões genéticas adicionais se perpetuassem com fenótipos malignos (Bracken AP, 2005).

Apesar do *locus* p16^{INK4a} ser enriquecido com H3K27me3 e ligado as proteínas PcG, o silenciamento de p16^{INK4a} é requerido para uma dependência estrita no funcionamento das proteínas da família pRB que se ligam e regulam negativamente os fatores de transcrição E2F em células primárias de camundongos e humanos (Kotake Y, et al., 2007). Isso representa a primeira evidência de que proteínas pRB funcionam de maneira oposta as PcGs e também da ligação entre a função do recrutamento das proteínas PcG e a formação de H3K27me3. Alguns desse processos regulatórios parecem manifestar diferenças regionais entre os tipos de tecidos com que as células tronco ou as progenitoras estão associadas (Molofsky AV, et al., 2006). Sinais celulares intrínsecos ou extrínsecos podem integrar a regulação epigenética (Jaenisch R, et al., 2003), possivelmente por facilitar a discriminação seletiva de ilhas de CpG nos promotores de DNAs que são potencialmente vulneráveis a hipermetilações aberrantes (McGarvey KM, et al., 2007). As células que são escolhidas, como e quando são marcadas para serem células progenitoras cancerosas, e a natureza dos sinais moleculares, epigenéticos ou outros mecanismos envolvidos ainda precisam ser entendidos.

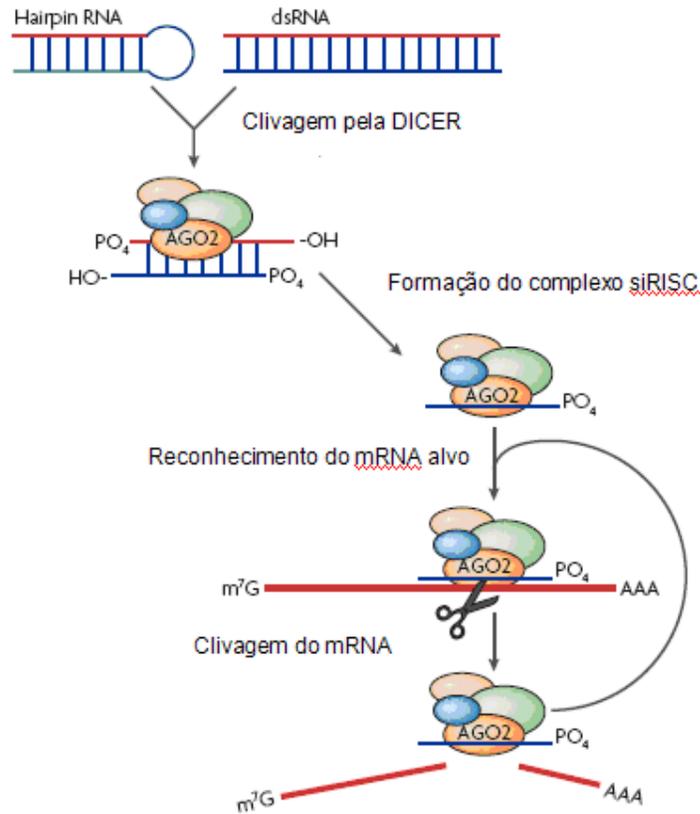
O microambiente das células tronco nos tecidos adultos é conhecido por formar um nicho fisiológico para sua manutenção. De maneira similar, o microambiente tumoral é requerido para a manutenção das células tronco cancerosas. Isso levanta uma importante questão que estima o papel funcional de tais nichos na discriminação entre células tronco adultas normais e células tronco cancerosas. Evidência preliminar é reportada para mudança epigenética tipo específica nos níveis de metilação de DNA nas

células estromais, tais como epiteliais e fibroblastos estromais de mamas normais e carcinomas de mama (Hu M, et al., 2005). O mecanismo molecular e o significado biológico de tais mudanças epigenéticas nas células estromais de tumor ainda é pouco conhecido.

1.10- RNAi – Mecanismos de silenciamento

O RNA de interferência (RNAi) é um potente e altamente específico fenômeno silenciador de genes encontrado em fungos, plantas e animais. O processo de silenciamento inicia-se através da conversão de longas moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) ou moléculas de RNA em forma de grampo (RNA hairpin) em pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNA) pela enzima DICER RNase tipo III. O siRNA (21-23 nt) resultante apresenta duas fitas. Estas são seqüências senso e anti-senso em relação ao RNA mensageiro (mRNA) alvo. A fita anti-senso do siRNA é também conhecida como fita guia, uma vez que ela serve como o molde da seqüência gênica especificamente silenciada pela maquinaria de RNAi. [Tariq M. Rana].

A molécula de siRNA incorpora-se em um complexo protéico denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) para formar um complexo RNA-proteína, conhecido como siRISC. Durante a incorporação da molécula de siRNA, a fita senso é destruída, o que facilita a formação do complexo siRISC. Este complexo silencia a expressão gênica ao se ligar e clivar o mRNA alvo, utilizando-se da fita anti-senso como molde. A proteína argonauta 2 (AGO2), que possui atividade ribonucleasica, é a responsável pela clivagem do mRNA neste processo, como mostrado na figura 3, abaixo. [Tariq M. Rana].



Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. [Tariq M. Rana 2007]

Fig.3- Hairpin RNA ou uma molécula longa de dsRNA é clivada pela enzima DICER para produzir a molécula de siRNA. Esta se associa ao complexo RISC, onde a fita sentido é destruída e a fita anti-senso é utilizada como molde para clivagem do mRNA alvo. O complexo RISC é reciclado e pode atuar em um nova clivagem.

A característica mais marcante do RNAi é sua alta especificidade no silenciamento gênico, sendo isto aparentemente devido à complementaridade entre a fita guia e o mRNA alvo. Outra característica fascinante deste mecanismo é a eficiência com que ocorre. A conversão de longas moléculas de dsRNAs em muitos fragmentos de siRNAs pode ser um dos mecanismos pelo qual há uma amplificação do silenciamento gênico. Outra explicação para a eficiência do RNAi é o fato do complexo RISC ter a capacidade de ser reciclado por várias vezes, o que faz com que um único sítio catalítico enzimático possa catalisar várias reações de clivagem do conteúdo celular de mRNA alvo. Tem sido sugerido que o processo de amplificação envolva uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), uma vez que o gene da mesma foi identificado como essencial para o processo de silenciamento gênico em plantas, fungos e vermes. O anelamento de uma fita do siRNA ao mRNA alvo permitiria que a RdRP utilizasse este

como molde e o siRNA como iniciador, o que levaria à produção de um novo RNA dupla fita. Este seria então clivado pela DICER, contribuindo com o processo de silenciamento. [Tariq M. Rana].

O conhecimento sobre o mecanismo de regulação gênica desempenhado pelo RNAi despertou na comunidade científica o interesse no uso deste como ferramenta no estudo de processos biológicos, assim como uma possível arma na terapia gênica.

Um desafio de se usar RNAi no estudo da função gênica em mamíferos foi relacionado ao sistema imune. Foi observado que uma resposta imune baseada em interferon (IFN) é desencadeada contra dsRNA maiores que 30 bases.[G.C. Sen 2001]. Entretanto, em 2001, Tuschl et al. e Caplen et al. descreveram que a introdução de dsRNA de 21 nt de comprimento seria capaz de mimetizar os produtos gerados pela ação da DICER sobre longos dsRNAs e atuar no silenciamento gênico específico sem ativar uma resposta imunológica.

A possibilidade de estudar a função gênica utilizando RNAi sem que o sistema imune atuasse como empecilho propiciou que tal técnica continuasse a ser utilizada. Para isto, diversos mecanismos de introdução de moléculas de siRNA em células, sejam de mamíferos ou não, foram e estão sendo desenvolvidos. Brummelkamp et al., em 2002, utilizaram retrovírus para inserir RNAi em células cancerígenas humanas, obtendo eficiente resultado em relação à inibição específica da expressão do alelo K-RAS(V12) de um oncogene. Apesar da eficiência dos retrovírus no auxílio da técnica de RNAi, algumas considerações devem ser feitas. Os retrovírus atuam por meio de integração no genoma da célula hospedeira, o que pode levar a mutações por inserção. Outro aspecto que deve ser levado em consideração é o fato de que os retrovírus são vetores limitados às células em divisão, o que restringe a utilização dos mesmos.

Além da utilização dos retrovírus como vetores para RNAi, os lentivírus também tem sido utilizados. Estes são pertencentes a uma subclasse de retrovírus e possuem algumas vantagens na atuação como vetores como a falta de risco de indução de mutação por inserção e, além disso, são aptos a transfectar células primárias e células que não se encontram em processo de divisão. Em adição, os lentivírus podem acomodar grandes quantidades de dados em seu genoma, e são menos imunogênicos que vetores adenovírus. [Johannes H. Fruehauf 2006]. Singer et al. usaram lentivírus como vetor para RNAi específico para BACE1, gene envolvido na clivagem da proteína precursora amilóide em modelo murino de Alzheimer, obtendo uma redução da formação das placas típicas da doença na região onde foi utilizado o lentivírus.

Outros vetores virais utilizados no silenciamento gênico por RNAi são os adenovírus. No caso destes a informação genética propaga fora do núcleo da célula alvo, o que reduz o risco de integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira. Uma consequência para isto é que a informação genética é conservada de forma menos estável e pode se perder durante os repetitivos ciclos de divisão celular. Isto acaba sendo favorável em situações em que um efeito passageiro é requerido, como no caso da terapêutica contra câncer. Uma das maiores desvantagens dos adenovírus, entretanto, é a falta de tropismo por um determinado tecido e a dependência de receptores de superfície celular, que frequentemente estão ausentes no tecido de interesse, especificamente em células tumorais [Johannes H. Fruehauf 2006]. Xia et al., em 2002, foram capazes de silenciar eficientemente o GFP, utilizando um adenovírus codificante para RNA hairpin, o que revela a utilidade dos vetores na técnica de RNAi.

A utilização de vetores para introduzir moléculas de siRNA nas células em que se quer estudar a função gênica é de bastante valia, porém, existem outros meios de se fazer isso, isentos do uso de vetores. Um destes mecanismos é a modificação química prévia da molécula de siRNA antes da inoculação *in vivo*. Um exemplo de modificação química é a adição de ácidos nucleicos protegidos (LNA) nas moléculas de siRNA, tanto em ambas extremidades, quanto em outras partes da molécula. Esta técnica não apresentou danos ao funcionamento normal das moléculas de siRNA [Braasch DA, et al. 2003] e mostrou-se eficiente na estabilização das moléculas de siRNA no soro [Elmen et al. J, 2005]. Assim, este tipo de modificação molecular mostra-se promissora, porém, ainda há necessidade de mais estudos *in vivo* para que isto se confirme.

Outro mecanismo adotado pela comunidade científica para inoculação de siRNA em células é a utilização de lipossomos, que adicionados de moléculas sinalizadoras, podem ser eficientes no direcionamento para um tecido alvo ou mesmo para grupos celulares. Sorensen et al., em 2003, usando um lipossomo catiônico DOTAP para injetar RNAi contra TNF- α foram capazes de suprimir uma reação letal contra LPS em camundongos isentos de germes. Landen et al., em 2005, mostraram a utilização de lipossomos neutros DOPC para carrear siRNA em tratamento intraperitoneal de câncer ovariano murino em crescimento.

O crescente estudo da utilização de RNAi, bem como de seus mecanismos de inclusão celular, em diversos processos celulares envolvidos na expressão gênica deram suporte para que esta técnica fosse visualizada com uma possível terapêutica contra vários tipos de doenças, dentre elas, o câncer. Diversos trabalhos foram realizados para

verificar a eficiência de tal técnica. Jiang and Milner, em 2002, verificaram apoptose de células de câncer cervical associado à HPV -16 induzida pela supressão dos genes E6 e E7 por RNAi. Hingorani et al., em 2003, verificaram um crescimento reduzido e apoptose de células de melanoma induzidos por supressão do gene B-RAF através do uso de RNAi. Lima et al, em 2004, verificaram que o uso de RNAi para supressão dos genes bcl-2 e XIAP aumentou o efeito de agentes quimioterápicos em células MCF-7 de câncer de mama. Eskandarpour et al., em 2005, verificaram apoptose em células de melanoma induzida pela supressão do oncogene NRAS por RNAi. Estes e vários outros estudos tem mostrado a eficiência do RNAi na terapia gênica.

Percebe-se, então, que a utilização da técnica de RNAi para terapêutica contra o câncer mostra-se promissora visto a quantidade de estudos desenvolvidos e em desenvolvimento sobre este tema.

2- JUSTIFICATIVAS PARA O PROJETO

Evidências de que os genes PcG são uma nova classe de oncogenes e anti-oncogenes estão rapidamente aumentando e podem no futuro se tornarem central para o desenvolvimento de terapias para o câncer baseados no silenciamento gênico epigenético (Nakao, M., et al.,2004; Egger, G.,2004). Os genes PcG, tais como BMI1 e EZH2 não são somente capazes de transformação celular, mas também são vitais para a sobrevivência da célula durante o desenvolvimento. Expressão anormal de genes PcG tem sido descrita em vários tipos de câncer, tais como câncer de próstata (Berezovska OP, et al.,2006), em linfoma (Sanchez-Beato M,et al.,2006; Bea S, Tort F, Pinyol M et al.,2001); em câncer de mama (Bracken AP,2003; Ding L,et al.,2006), entre outros, porém, não há na literatura descrição do papel das proteínas Polycomb em melanomas. Há, portanto, a necessidade de saber se para esse tipo celular o padrão de super expressão de BMI1 e EZH2, e de outros genes PcG, também se aplica e se o silenciamento desses genes levará ao aumento da morte das células tumorais por apoptose e senescência.

Há ainda a correlação entre expressão PcG e comportamento biológico de subtipos clinicamente definidos de câncer, sugerindo que esses genes apresentam um papel central em oncogênese, esses achados tornam promissor o desenvolvimento de novos marcadores diagnósticos. Porém, os mecanismos pelos quais os genes PcG afetem o comportamento biológico das células tumorais precisam ser melhor elucidados. Obviamente, expressão inapropriada de reguladores epigenéticos podem resultar em

perda das vias de silenciamento gênico normal, portanto, contribuem para a perda da identidade da célula. Uma possibilidade é de que isso explique as alterações epigenéticas observadas em muitas células tumorais (Nakao, M., et al.,2004; Sugimura, T. and Ushijima, T., 2000). É sabido que BMI1 confere não somente uma vantagem de crescimento para células, mas também características de células tronco que podem colocar os genes PcG centrais no processo de desdiferenciação. Muito se sabe sobre os mecanismos pelos quais a super expressão dos componentes BMI1 e EZH2 afeta a proliferação de células tumorais, porém, há poucos estudos sobre o papel dos outros componentes do complexo PRC na patologia do câncer. Por exemplo, em linfomas humanos, não somente BMI1 aparece anormalmente expresso, mas também seus parceiros ligantes RING1 e HPH1 (Sewalt, R.G.,2004). É possível que esses genes, presentes em diferentes cromossomos, estejam coordenadamente desregulados, em adição a outras anormalidades gênicas? Ou existe uma explicação alternativa? A relação desses outros componentes na proliferação celular, senescência e apoptose ainda não está bem esclarecida. Portanto, o papel dos outros componentes do complexo PCR no melanoma precisa ser estabelecido. Conhecimentos sobre como a desregulação epigenética contribui para o câncer oferecem excelentes premissas para o desenvolvimento de uma oncoterapia precisa na frente de batalha clínica.

3- OBJETIVO GERAL

Analisar o papel das proteínas do complexo Polycomb na proliferação, senescência e apoptose das células tumorais de melanoma maligno, utilizando a técnica de RNAi para silenciar genes super expressos nesse câncer.

4- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão gênica das culturas de melanócitos normais e cancerosos pela técnica de significance analysis of microarrays (SAM).
- Verificar a expressão das proteínas Polycomb nas culturas celulares normais e cancerosas, pela técnica de Western Blot.
- Escolher apenas as proteínas Polycomb que foram super expressas no cultura de células tumorais quando comparadas com células normais, para os estudos posteriores.
- Utilizar a técnica de RNAi para silenciamento dos genes Polycomb tanto na cultura de células tumorais quanto na de células normais.

- Analisar a efetivação do silenciamento pela verificação, por Western Blot, da expressão protéica pós RNAi.
- Verificar o efeito do silenciamento por RNAi nas células cancerosas e normais através de ensaio de proliferação.
- Verificar a influencia do silenciamento por RNAi das proteínas Polycomb em células cancerosas através de ensaio de apoptose.

5- METODOLOGIA

5.1- Isolamento e Cultura de Melanócitos e Melanoma

As culturas celulares para melanoma serão realizadas a partir de linhagens imortalizadas adquiridas de banco de células específico (American Type Culture Collection). Serão utilizadas duas linhagens distintas: HTB-140 (células de melanoma primário) e CRL-11147 (células de melanoma metastático). As células serão mantidas em garrafas de cultura T75 em meio DMEM suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (FBS) inativado, 50U/ml penicilina, 50 µg/ml Streptomomicina e 1.25 µg/ml fungizone (Biogal, Debrecen, Hungria). As culturas serão mantidas em estufa de cultura à 37°C e 5%CO².

Para a cultura primária de melanócitos do epitélio humano, pele humana será extraída de doadores voluntários, mantida em gelo e utilizada no máximo 3 horas após a extração. Em uma placa estéril os tecidos serão lavados duas vezes com DMEM suplementado com Penicilina/Streptomomicina. Os tecidos serão colocados em meio novo e incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos. Na dissecação inicial, a gordura será retirada do tecido, preservando-se apenas as camadas de queratina, epiderme e derme. O tecido será então cortado em pedaços pequenos e colocados em placas de cultura de 100x200mm na proporção de 15 a 25 pedaços por placa. 15ml de meio DMEM + 50%FBS + Penicilina/Streptomomicina será adicionado às placas e incubaremos à temperatura ambiente por 30 minutos. O Meio será então retirado e novo meio, igual ao anterior, será adicionado, e as placas incubadas a 37°C e 5%CO₂ overnight. O Meio será então substituído por novo meio DMEM + 30%FBS + Penicilina/streptomomicina e as placas serão reincubadas em estufa a 37°C e 5%CO₂. O Meio de cultura será trocado a cada 24 horas. Após 48 horas os fibroblastos serão removidos do tecido através de tratamento com 0.25% tripsina + 1mM EDTA. As células serão então coletadas, lavadas e transferidas para novas placas de cultura onde

serão cultivadas por mais uma semana antes novamente serem tripsinizadas e levadas para seleção de melanócitos por citometria de fluxo.

5.2- Citometria de Fluxo

Para a seleção dos melanócitos do total de células extraídas, o conteúdo tripsinizado, centrifugado e ressuspendido em 20 µm de DMEM será coletado antes do plaqueamento final e utilizado para seleção por citometria de fluxo. As análises por FACS serão realizadas utilizando-se o Citômetro de Fluxo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). O Citômetro, modelo FACScan (Becton-Dickson) é capaz de realizar leituras nos comprimentos de onda próximos àqueles do FITC, da Fitoeritrina (PE), e do CY além de tamanho e granulosidade. Serão utilizados os critérios de tamanho e granulosidade para a seleção, podendo ser utilizados anticorpos monoclonais primários anti-melanócitos conjugados a Cy5 para confirmação e padronização da técnica. Serão lidos todos os eventos da amostra, e as análises dos dados obtidos bem como a plotagem dos gráficos Dot Plot serão realizadas utilizando-se o software Cell Quest (Becton-Dickson) também disponível no Instituto.

5.3- Microarranjo de DNA

Para a verificação de expressão diferencial de mRNA para as proteínas PcG e outras associadas à estas será utilizada a técnica de microarranjo de DNA. Os Chips serão encomendados contendo as seqüências para análise dos mRNAs das proteínas:

2.3.1- Recrutadoras de PcG/trxG: HMGB2, GRHL1, YY1, YY2, L3MBTL2, E2F6, BCL6, RB1, RBL1

2.3.2-Proteínas PcG (PRC2): EZH1, EZH2, EED, SUZ12, RBBP4/RbpAp48, RBBP7/RbAp46

2.3.3-Proteínas associadas a PRC2: PHF1, HDAC2, SIRT1

2.3.4- Proteínas PcG (PRC1): RING1/RING1A/ RNF1, RNF2/RING1B/RING2,, CBX2/HPC1/M33, CBX4/HPC2, CBX8/HPC3/PC3, PHC1/EDR1/HPH1, PHC2/EDR2/HPH2, PHC3/EDR3/HPH3, BMI1, PCGF2/RNF110/ZFP144, ZNF134, SCMH1

2.3.5- Proteínas associadas a PcG/trxG de função desconhecida JARID1C/XLMR/SMCX, JARID1B/PLU-1, ASXL1, ASXL2, EP400/P400 EPC1, CHD4/Mi-2, CHD7, ZMIZ1, MED12L/TRAP230/TRALP, THRAP2/TRAP240

Além de outras seqüências dos genes chamados “housekeeping” como o da actina, para controle da técnica. A extração de mRNA, síntese de cDNA, marcação do cDNA gerado e a hibridização no Chip serão realizados utilizando-se de kit específico para tal, da Invitrogen (BioModule™ Microarray Analysis with Direct Labeling).

5.4- Preparo de RNAi para as diversas proteínas

Os RNAs para a técnica de interferência de RNA serão obtidos da empresa Prodímol. Serão encomendadas seqüências homólogas e as complementares àquelas do mRNA para as proteínas que apresentarem diferenças de expressão na técnica de microarray e que tiverem a síntese diferencial de proteínas confirmada por Western Blot.

Os RNAs terão de 20 a 22 pbs e serão anelados *in vitro* antes de sua exposição às culturas de células. A exposição ocorrerá concomitante à adição de Lipofectamina para garantir a eficiência da introdução do dsRNA.

5.5- Western Blot

Para a confirmação dos dados da técnica de microarray, bem como para teste da eficiência do processo de interferência de RNA procederemos o protocolo de extração de proteína total e Western Blot para cada uma das proteínas em questão e normalizaremos pela concentração de α -actina.

Os extratos de proteína total serão corridos em gel de SDS-PAGE, previamente preparados com membrana de nitrocelulose e camadas externas de papel filtro bem alinhados, a 10-20V, 250mA por 90 minutos. Os passos de lavagem, bloqueio e incubação serão realizados em agitador, a 60rpm.

Os anticorpos monoclonais primários específicos e os anticorpos secundários conjugados a fluorocromos serão adquiridos de empresas especializadas, ou produzidos no Instituto de Ciências Biológicas, caso não se encontrem disponíveis no mercado.

5.6- Ensaio de proliferação celular

O ensaio da Proliferação Celular dos melanócitos submetidas ou não à interferência de RNA será realizada antes e após a interferência de RNA utilizando-se para tanto,

pelo menos quatro poços de experimento.

A proliferação celular será analisada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide). Esse ensaio permite a análise indireta da proporção de células viáveis nos poços tratados em relação aos poços controle através da análise da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase.

O meio de cultura das células será retirado e substituído por um novo meio com 500µg/ml de MTT. As células metabolizarão esse substrato por 4 horas, formando cristais insolúveis. O meio então é novamente retirado e substituído por uma solução de SDS, para que ocorra a lise celular e a solubilização dos cristais formados. Essa nova solução contém coloração arroxeadada e será quantitativamente analisada em leitor de ELISA na absorvância do comprimento de onda de 540nm.

Procederemos ainda uma análise histológica para a contagem da proporção de células vivas e mortas (membrana lisada) através da tripsinização das células no poço, coloração destas pelo corante vital Azul de Tripán e contagem em câmara de newbauer. Essa contagem nos mostrará o número total de células, e o número de células mortas e vivas.

5.7- ELISA para ensaio de apoptose

A taxa de apoptose será avaliada nas culturas tratadas com RNAi em relação às culturas controle através de um kit de ELISA para detecção de apoptose (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche). Brevemente, as células em cultura terão suas membranas celulares lisadas, e seus núcleos, ainda intactos, coletados por centrifugação. Uma alíquota será plaqueada numa placa de ELISA coberta com streptavidina. Primeiramente será incubado um anticorpo de detecção anti-histona marcado com biotina. Após este passo as amostras são introduzidas e incubadas. O próximo passo consiste na incubação de um anticorpo anti-DNA marcado com peroxidase. Após cada passo lava-se o material não reativo e após todo o processo o substrato é adicionado e o produto colorido deve ser lido em leitor próprio.

6- RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se observar, através da técnica de micro arranjo, a expressão gênica diferencial entre as culturas de melanócitos cancerosos e normais, sendo que os primeiros deverão apresentar superexpressão de representantes gênicos das proteínas do complexo Polycomb, como por exemplo BMi1 e EZH2, como visto em outros trabalhos realizados com alguns tipos de câncer

que não o melanoma. Após esta observação espera-se visualizar, através da técnica de Western Blot, a expressão das proteínas Polycomb que apresentaram superexpressão gênica detectada pelo micro arranjo. Após a utilização de RNAi em células tumorais e normais, espera-se que as primeiras apresentem supressão dos genes Polycomb que foram detectados como superexpressos e passem a entrar em apoptose e/ou apresentar uma redução na proliferação, o que é esperado observar nos ensaios de proliferação e apoptose. É esperado que as células normais tratadas com RNAi não entrem em apoptose, aumentem a taxa de proliferação e nem percam sua função normal porque caso contrário o presente trabalho perderia sustentação no que se diz respeito ao possível uso de RNAi em terapia contra câncer. É possível que as células normais aumentem sua taxa de proliferação, uma vez que as Polycomb estão relacionadas a processos de controle do ciclo celular. Os efeitos nas células em estudo somente aparecerão se a técnica de RNAi realmente funcionar. Para verificar isto será feito um Western Blot para as proteínas que terão os genes silenciados. Espera-se obter uma redução na expressão destas proteínas.

7- ORÇAMENTO

PRODUTO	QUANTIDADE	PREÇO	TOTAL
Linhagens celulares	2	R\$0600,00	R\$01200,00
Garrafas de Cultura T75	100	R\$0007,50	R\$00750,00
Soro Fetal Bovino	2	R\$0200,00	R\$00400,00
Penicilina/Streptomicina	5	R\$0080,00	R\$00400,00
Fungizone	2	R\$0200,00	R\$00400,00
DMEM	5	R\$0500,00	R\$02500,00
Balão de CO ²	1	R\$0230,00	R\$00230,00
Placa de Petri	4	R\$0020,00	R\$00080,00
Caixa de Material Cirúrgico	1	R\$0300,00	R\$00300,00
Placas de cultura (6 e 24 poços)	50	R\$0009,00	R\$00450,00
Filtros de 22µm (caixa)	1	R\$0200,00	R\$00200,00
Tripsina	5	R\$0200,00	R\$01000,00
EDTA	2	R\$0100,00	R\$00200,00
Pipetas descartáveis (10ml)	500	R\$0010,00	R\$05000,00
Micropipetas	4	R\$0400,00	R\$01200,00
Ponteiras (pacote com 1000)	8	R\$0200,00	R\$01400,00
Seringas descartáveis	50	R\$0010,00	R\$00500,00
Anticorpos primário marcado	1	R\$1000,00	R\$01000,00
Chip de Micoarray (50 mRNAs)	1	R\$5000,00	R\$05000,00
KIT BioModule™ Microarray Analysis with Direct Labeling (Invitrogen)	1	R\$9000,00	R\$09000,00
Primers de 20 a 22 nucleotídeos (Prodimol)	40	R\$0250,00	R\$10000,00
Lipofectamina	1	R\$1200,00	R\$01200,00
Anticorpos primarios anti-PcGs	20	R\$0500,00	R\$10000,00
Anticorpos secundários marcados	2	R\$0300,00	R\$00600,00

SDS	1	R\$0300,00	R\$00300,00
Membrana de Nitrocelulose	20	R\$0100,00	R\$02000,00
Papel Filtro	40	R\$0010,00	R\$00400,00
PBS (reagents)	1	R\$0200,00	R\$00200,00
MTT ([3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide])	1	R\$0750,00	R\$00750,00
Placas de ELISA	50	R\$0080,00	R\$04000,00
Azul de Tripán	1	R\$0100,00	R\$00100,00
Câmara de Neubauer	1	R\$0700,00	R\$00700,00
KIT Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} (Roche)	1	R\$2000,00	R\$02000,00
TOTAL DO PROJETO		R\$63.460,00	

8- CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

CRONOGRAMA ANO 1	
MÊS 01	<ul style="list-style-type: none"> - Pesquisas Bibliográficas - Pesquisas de Dados Genéticos - Aquisição de Licença específica para experimentos com doadores humanos - Compra dos materiais importados
MÊS 02	
MÊS 03	
MÊS 04	
MÊS 05	
MÊS 06	
MÊS 07	<ul style="list-style-type: none"> - Estabelecimento das culturas celulares - Estabelecimento de quadro de doadores - Normalização da técnica de cultura primária de epitélio humano
MÊS 08	
MÊS 09	
MÊS 10	
MÊS 11	
MÊS 12	

CRONOGRAMA ANO 2	
MÊS 01	- Realização dos experimentos de expressão gênica (Microarray) - Realização de experimentos de expressão protéica (Western Blot) - Compra dos primers para a técnica de RNAi
MÊS 02	
MÊS 03	
MÊS 04	
MÊS 05	
MÊS 06	
MÊS 07	- Padronização dos níveis de dsRNA a serem utilizados na técnica de RNAi - Realização dos experimentos de RNAi - Realização dos ensaios para determinação da taxa de proliferação celular e taxa de apoptose
MÊS 08	
MÊS 09	
MÊS 10	
MÊS 11	- Repetição de experimentos necessários - Produção e divulgação de Relatórios e
MÊS 12	

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006;441:1068 –1074.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100 50-57.
- Squazzo SL, O'Geen H, Komashko VM et al. Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome Res* 2006;16:890 –900.
- Enver T, Soneji S, Joshi C et al. Cellular differentiation hierarchies in normal and culture-adapted human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet* 2005;14:3129 –3140.
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8:286 –298.
- Berezovska OP, Glinskii AB, Yang Z et al. Essential role for activation of the Polycomb group (PcG) protein chromatin silencing pathway in metastatic prostate cancer. *Cell Cycle* 2006;5:1886 –1901.
- Sanchez-Beato M, Sanchez E, Gonzalez-Carrero J et al. Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays. *Mod Pathol* 2006;19:684–694.
- Bea S, Tort F, Pinyol M et al. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 2001;61:2409 –2412.
- Rajasekhar VK. Analytical methods for cancer stem cells. In: Vemuri MC, ed. *Stem Cell Assays*. Totowa, NJ: Humana Press, 2007:83–95.
- Saramaki OR, Tammela TL, Martikainen PM et al. The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45:639–645.

- Bracken AP, Pasini D, Capra M et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003;22:5323–5335.
- Ding L, Erdmann C, Chinnaiyan AM et al. Identification of EZH2 as a molecular marker for a precancerous state in morphologically normal breast tissues. *Cancer Res* 2006;66:4095–4099.
- Lessard J, Schumacher A, Thorsteinsdottir U et al. Functional antagonism of the Polycomb-Group genes *eed* and *Bmi1* in hemopoietic cell proliferation. *Genes Dev* 1999;13:2691–2703.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128: 683– 692.
- Berezovska OP, Glinskii AB, Yang Z et al. Essential role for activation of the Polycomb group (PcG) protein chromatin silencing pathway in metastatic prostate cancer. *Cell Cycle* 2006;5:1886–1901.
- Sanchez-Beato M, Sanchez E, Gonzalez-Carrero J et al. Variability in the expression of polycomb proteins in different normal and tumoral tissues. A pilot study using tissue microarrays. *Mod Pathol* 2006;19: 684–694.
- Bea S, Tort F, Pinyol M et al. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 2001;61:2409–2412.
- Bracken AP, Pasini D, Capra M et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003;22:5323–5335.
- Ding L, Erdmann C, Chinnaiyan AM et al. Identification of EZH2 as a molecular marker for a precancerous state in morphologically normal breast tissues. *Cancer Res* 2006;66:4095–4099.
- Raaphorst, F.M., Vermeer, M., Fieret, E., Blokzijl, T., Dukers, D.,
- Sewalt, R.G., Otte, A.P., Willemze, R. and Meijer, C.J. (2004) Site-specific expression of Polycomb-group genes encoding the HPC-HPH/PRC1 complex in clinically defined primary nodal and cutaneous large B-cell lymphomas. *Am. J. Pathol.*, 164, 533–542.
- Nakao, M., Minami, T., Ueda, Y., Sakamoto, Y. and Ichimura, T. (2004) Epigenetic system: a pathway to malignancies and a therapeutic target. *Int. J. Hematol.*, 80, 103–107.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P.A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy *Nature*, 429, 457–463.
- Sugimura, T. and Ushijima, T. (2000) Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 462, 235–246.
- Vire E, Brenner C, Deplus R et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006;439:871– 874.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 2005;37:391–400.
- Seligson DB, Horvath S, Shi T et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 2005;435: 1262–1266.
- Frigola J, Song J, Stirzaker C et al. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* 2006;38:540 – 549.
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D et al. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 2007;39:157–158.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415– 428.

- Pasini D, Bracken AP, Helin K. Polycomb group proteins in cell cycle progression and cancer. *Cell Cycle* 2004;3:396–400.
- Raaphorst FM. Of mice, flies, and man: The emerging role of polycomb- group genes in human malignant lymphomas. *Int J Hematol* 2005;81:281–287.
- Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 2004;118:409–418.
- Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A et al. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102: 1859 –1864.
- Squazzo SL, O’Geen H, Komashko VM et al. Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome Res* 2006;16:890 –900.
- Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: Interpretin the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:163–176.
- Kamminga LM, Bystrykh LV, de Boer A et al. The Polycomb grou gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood* 2006; 107:2170 –2179.
- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I et al. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 2007;39:232–236.
- Tan J, Yang X, Zhuang L et al. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 2007;21:1050 –1063.
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:895–902.
- Parrish JZ, Emoto K, Jan LY et al. Polycomb genes interact with the tumor suppressor genes hippo and warts in the maintenance of Drosophila sensory neuron dendrites. *Genes Dev* 2007;21:956 –972.
- Sharpless NE, DePinho RA. Cancer: Crime and punishment. *Nature* 2005;436:636–637.
- Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006;4:221–233.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420: 860–867.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7:21–33.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128: 683– 692.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6:107–116.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF et al. Stem cells, cancer, and câncer stem cells. *Nature* 2001;414:105–111.
- Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: An old idea—a paradigm shift. *Cancer Res* 2006;66:1883–1890.
- Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: Two faces of eve. *Cell* 2006;124:1111–1115.
- Ohm JE, McGarvey KM, Yu X et al. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 2007;39:237–242
- Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A et al. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102: 1859 –1864.

- Lessard J, Schumacher A, Thorsteinsdottir U et al. Functional antagonism of the Polycomb-Group genes *eed* and *Bmi1* in hemopoietic cell proliferation. *Genes Dev* 1999;13:2691–2703.
- Dahiya A, Wong S, Gonzalo S et al. Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol Cell* 2001;8:557–569.
- Monk M, Holding C. Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene* 2001;20:8085–8091.
- Gidekel S, Pizov G, Bergman Y et al. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 2003;4:361–370.
- Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005;121:465–477.
- Hochedlinger K, Blueloch R, Brennan C et al. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev* 2004;18:1875–1885.
- Pardoll R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:895–902.
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441:349–353.
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441:349–353.
- Ohm JE, Baylin SB. Stem cell chromatin patterns: An instructive mechanism for DNA hypermethylation? *Cell Cycle* 2007;6:1040–1043.
- Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2007;96:R26–30.
- Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S et al. The oncogene and Polycomb group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 1999;397:164–168.
- Molofsky AV, He S, Bydon M et al. *Bmi-1* promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the *p16Ink4a* and *p19Arf* senescence pathways. *Genes Dev* 2005;19:1432–1437.
- Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM et al. Increasing *p16INK4a* expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 2006;443:448–452.
- Kamminga LM, de Haan G. Cellular memory and hematopoietic stem cell aging. *STEM CELLS* 2006;24:1143–1149. Ohm JE, McGarvey KM, Yu X et al. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 2007;39:237–242.
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D et al. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 2007;39:157–158.
- Fiskus W, Pranpat M, Balasis M et al. Histone deacetylase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive complex 2 proteins in human acute leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3096–3104.
- Kotake Y, Cao R, Viatour P et al. *pRB* family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing *p16INK4alpha* tumor suppressor gene. *Genes Dev* 2007; 21:49–54.
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33:245–254.
- McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E et al. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res* 2006;66:3541–3549.

- Hu M, Yao J, Cai L et al. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet* 2005;37:899–905.
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002;419:624–629.