

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

DOUGLAS SOUZA VIEIRA

Estudo do efeito de Deferoxamina, Curcumina e inibidor de ABL PD180970 sobre o ciclo celular e expressão gênica de linhagens leucêmicas.

**São Gabriel
2014**

DOUGLAS SOUZA VIEIRA

Estudo do efeito de Deferoxamina, Curcumina e inibidor de ABL PD180970 sobre o ciclo celular e expressão gênica de linhagens leucêmicas .

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Andrés Delgado Cañedo

**São Gabriel
2014**

DOUGLAS SOUZA VIEIRA

Estudo do efeito de Deferoxamina, Curcumina e inibidor de ABL PD180970 sobre o ciclo celular e expressão gênica de linhagens leucêmicas .

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo
Orientador
UNIPAMPA

Dr. Gabriel da Luz Wallau
UNIPAMPA

Prof. Dr. Juliano Boldo
UNIPAMPA

São Gabriel

2014

Dedico este trabalho á todos que podem imaginar além do que os olhos podem mostras e dão assas a sua imaginação para criar e/ou melhorar os processos pela qual a vida torna-se possível. Fazer pão é um deles, em especial dedico este trabalho ao meu pai e os anos de ensinamento e trabalho que permitiram de forma indireta chegar aos resultados que cheguei e ao meu Orientador pela paciência e criatividade para ensinar os fundamentos científicos das ultimas tecnologias deste tempo, talvez um dia ele descubra que toda sorte que tive, tenha sido a ligação que fiz entre dois mundos tão distintos, mas que por um simples detalhe pode ser a diferencia entre o erro do acerto.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr Andres Delgado Cañedo, meu amigo e desorientador deixo aqui uma breve agradecimento pelos anos de ensinamento, diálogos e pela incrível coragem de acreditar em mim e contribuir com as minhas ideias nenhuns pouco convencionais.

Ao Prof. Dr Paulo Pinto, pelos inúmeros diálogos e discussões científicas, apesar de querer ser o “cara mal”, sempre foi alguém que tive oportunidade de ter dialogo aberto e franco, como sei do seu ego coloquei seu nome antes do Juliano, você é importante cara, para a formação dos cientistas deste campus, cientistas de verdade que não tem medo de questionar ou se questionar sobre as coisas sem medo das consequências, jamais deixe de ser o cara chato, palavras de um chato para o outro.

Ao Prof. Dr Juliano Boldo pela paciência e sempre disponibilidade de ajudar a entender os mecanismos moleculares, pelos quais a vida torna-se algo possível, pela compreensão nos diálogos e os inúmeros ensinamentos nas disciplinas as quais tivemos oportunidade de trabalhar juntos.

Ao Prof. Valdir pela sempre disponibilidade e dialogo aberto nas inúmeras questões que tivemos no decorrer da minha graduação, pelo excelente trabalho que vem realizando no desenvolvimento desta universidade.

Ao Prof. Dr Fabiano Pimentel, o meu amigo de noitadas ao qual tive muitos diálogos, que com certeza contribuíram de maneira significativa para a minha formação; pois os que falam pouco, são os que mais pensão, e em um momento de pouco moral tu me fez lembrar que meu “curriculum é bom”, sou eternamente grato.

A minha colega de “células” Viviane Ulbrich Ferreira, pela paciência e pelas horas que sempre me escutou falar sobre os experimentos, deixo meu agradecimento especial por tentar me organizar, pois muito do que funciono aqui foi graças a sua organização.

Aos técnicos Adriana Sassi, Ruti Roll, Daiana Balconi, Michele Stach , pelos empréstimos de equipamentos e reagentes, por tentar organizar minhas bagunças, pela amizade e compreensão quando eu dissertava sobre as moléculas da vida.

Aos meus colegas de teto Viviane Azevedo, Jeferson Diego Dias, Everton Gonçalves e minha vizinha de cima Renata Cavaleiro, pelos empréstimos, pela convivência e pelas coisas que aprendi com vocês, pois a formação na universidade foi bem além das disciplinas e aulas. A convivência com todos vocês permitiu ampliar a minha percepção do mundo.

Aqui estão os loucos. Os desajustados. Os rebeldes. Os criadores de caso. Os pinos redondos nos buracos quadrados. Aqueles que vêem as coisas de forma diferente. Eles não curtem regras. E não respeitam o status quo. Você pode citá-los, discordar deles, glorificá-los ou caluniá-los. Mas a única coisa que você não pode fazer é ignorá-los. Porque eles mudam as coisas. Empurram a raça humana para frente. E, enquanto alguns os vêem como loucos, nós os vemos como geniais. Porque as pessoas loucas o bastante para acreditar que podem mudar o mundo, são as que o mudam.

Jack Kerouac

RESUMO

O câncer é uma doença que afeta uma grande parte da população mundial e possui múltiplas causas, sendo diretamente relacionado ao desequilíbrio dos genes envolvidos na regulação do ciclo de vida e diferenciação das células. Neste trabalho avaliamos o efeito de Deferoxamina, Curcumina e inibidor de ABL PD180970 sobre o ciclo celular, viabilidade e expressão dos genes COX2 e CELF2 nas linhagens de células K562 e U937. Nossa hipótese inicial foi que a desregulação do gene CELF2 nas células K562 e U937 poderia afetar seu ciclo de vida. Sua expressão antagônica em COX2 quando células de tumor pancreático foram tratadas com Curcumina nos levou a procurar nas bases de dados de microarranjos por outras substâncias que modificariam sua expressão. Para compreender a estrutura genômica da região promotora, realizamos análises de genômica comparativa, em uma região de aproximadamente 1.000 bases *upstream* do gene CELF2, que se mostrou conservada em 44 vertebrados, desde primatas não humanos ao *Danio rerio*. Esta sequência foi clonada no vetor pCR-Bicolor, visando futuros ensaios. Por outro lado, foram realizados ensaios de Citometria de Fluxo e q-RT-PCR que nos permitiram observar que o gene CELF2 não sofre alterações na sua expressão quando tratados com as drogas Deferoxamina, Curcumina e inibidor de ABL PD180970, na linhagem celular K562. No entanto, nos ensaios de viabilidade celular; A curcumina causou uma parada do ciclo celular em G2/M após 24/horas de tratamento, bem como diminuição da viabilidade de células k562 tratadas após 24/horas nas concentrações de 12,5/mM e 25/mM. O inibidor de ABL PD180970 somente apresentou diminuição da viabilidade após 48/horas de tratamento nas concentrações 5/mM e 10/mM. O experimento de q-RT-PCR mostrou uma diminuição estatística de expressão de COX2 na linhagem celular U937 tratada com DFO e Curcumina. Estes dados de diminuição da expressão do gene COX-2 são inéditos para células leucêmicas tratadas com Curcumina, DFO e inibidor de ABL PD180970 e são independentes de mudanças na expressão de CELF2. Ao mesmo tempo, nossos dados sugerem que a indução da expressão de CELF2 pelo tratamento com Curcumina é um fato célula-específico e não se aplicaria a linhagens hematopoiéticas.

PALAVRAS-CHAVE: U937 , K562 , Curcumina , DFO , COX2, CELF2.

ABSTRACT

Cancer is a disease that affects a large portion of the world population and has multiple causes, being directly related to the imbalance of genes involved in the regulation of cell differentiation and life cycle. This study evaluated the effect of deferoxamine, Curcumin and PD180970, an ABL inhibitor, on the cell cycle, viability and COX2 and CELF2 expression in K562 and U937 cell lines. Our initial hypothesis was that the deregulation of CELF2 gene in K562 and U937 cells could affect their life cycle. Its antagonistic role on COX2 expression when pancreatic tumor cells were treated with curcumin led us to search microarrays databases for other substances that modify their expression. To understand the genomic structure of the promoter region we performed comparative genomic analyzes, a region of approximately 1000 bases upstream from the transcription start site of CELF2 gene preserved in 44 vertebrates, from non human primates to *Danio rerio*. This sequence was cloned into the vector pCR-Bicolor, for further analysis. Furthermore, flow cytometry assays and q-RT-PCR were performed which allowed us to observe that the CELF2 gene expression is not altered when K562 cells were treated with Deferoxamine, curcumin and PD180970. However, these drugs altered the cell viability assays; curcumin caused a cell cycle arrest in G2/M phase after 24 hours of treatment, as well as decreased the viability in K562 cells treated after 24 hours at concentrations of 25 mM and 12.5mM. The ABL inhibitor PD180970 only exhibited reduced viability after 48 hours of treatment in 5 mM and 10 mM concentrations. q-RT-PCR experiment showed a statistical decrease in the expression of COX2 gene in U937 cell line treated with DFO and Curcumin. These data showing decreased expression of COX-2 gene are new for leukemic cells treated with the used drugs and are independent of changes in the expression of CELF2 gene. At the same time, our data suggest that CELF2 expression induced by treatment with Curcumin is a cell-specific event, and would not apply to hematopoietic lineages.

KEYWORDS: U937, K562, Curcumin, DFO, COX2, CELF2.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores (*Primer*) utilizados neste trabalho

10

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Controle da expressão gênica e promotores	1
1.2 Análises de promotor (<i>in vitro</i>)	2
1.3 Análise de expressão gênica (<i>in silico</i>)	2
1.4 Gene CELF2	3
1.5 Ciclo celular e Câncer	4
1.6 Características das Linhagens Celulares usadas neste estudo	5
1.7 Deferoxamina	5
1.8 Inibidor de ABL	6
1.9 Curcumina	7
1.10 Hipótese	7
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivo específico	8
3. METODOLOGIA	9
3.2 Análises de modelos com expressão diferencial de CELF2 em banco de dados de (<i>microarranjo</i>)	9
3.3 Análises de genômica comparativa	10
3.4 Clonagens molecular no vetor pCRBicolorRSV por PCR circular	11
3.5 Transfecção por Eletroporação	12
3.6 Transfecção de pCRBicolorRSV em células K562	13
3.7 Extrações de RNA e RT-PCR-TIME	13
3.8 Análise de viabilidade e ciclo celular por Citometria de Fluxo	14

4.RESULTADOS	15
4.1 Estudo <i>in silico</i> do promotor do gene CELF2	15
4.2 Clonagem do promotor do gene CELF2	19
4.3 Efeito da Curcumina, DFO e PD180970 no ciclo celular e viabilidade de K562	23
4.4 Transfecção de K562 com os plasmídeos contendo o promotor CELF2	26
5. DISCUSÃO	27
6. CONCLUSÃO	30
7. REFERENCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1 Controle da expressão gênica e promotores

Os promotores são regiões no DNA que regulam a expressão gênica e se localizam flanqueando o sítio de início da transcrição. O estudo de promotores através das ferramentas de bioinformática começou há aproximadamente 20 anos quando os primeiros fatores de transcrição de eucariotos começaram a ser elucidados. (Licatalosi *et al*, 2011). Identificação dos promotores utilizando técnicas computacionais é uma importante área de pesquisa devido a sua associação direta na regulação da transcrição. Uma das partes importantes da anotação do genoma é a identificação do promotor, as regiões específicas a montante do gene onde a RNA-polimerase se liga para iniciar a transcrição, que é um dos passos mais importantes na regulação dos genes. Uma ampla variedade de algoritmos está disponível para a predição de promotores. (Umesh *et al*, Bioinformation 2014.) Em organismos multicelulares, a modulação da expressão genética é realizada por meio da interação complexa de proteínas reguladoras e as regiões de DNA específicas, sequências em *cis*, com as quais interagem fisicamente. Numerosos estudos bioquímicos realizados ao longo da última década identificaram perto de 500 fatores de transcrição específicos de vertebrados (G. Loots *et al*, 2004). Diferentemente da maioria dos genomas procarióticos, que são compostos de unidades de genes sobre postos com regiões intergênicas limitadas, genomas eucarióticos são ricos em sequências não codificantes de funções pouco conhecida (Asif. T *et al*, 2002). O sequenciamento do genoma humano previu uma região aproximada de 40.000 genes, que representam <5% do genoma humano. Um adicional de 40-45% do genoma dos mamíferos é constituído por DNA de sequencias repetitivas, enquanto que os restantes 50% são de natureza não codificante. (J. Craig Venter *et al*, 2001). Os primeiros vislumbres do genoma humano têm revelado muito poucos conhecimentos sobre novos genes que codificam RNAs, elementos reguladores de transcrição ou quaisquer outras sequências biologicamente relevantes presentes nas regiões não codificantes. Apesar de algumas partes do genoma não codificante provavelmente não demonstrar nenhuma função biológica mensurável, é amplamente conhecido que muito da nossa complexidade genética é devido a sequências não codificadoras de regulação sofisticada, que determinam, quando, onde e em que medida cada gene exibe atividade de transcrição. Apesar da importância das sequências não codificantes na regulação dos genes, a

nossa capacidade de identificar computacionalmente e caracterizar estes elementos é muito limitada (Loots *et al*, 2004).

1.2 Análises de promotor (*in vitro*).

Uma estratégia básica para a análise de transcrição é a utilização de genes repórter permitindo compreender as propriedades das sequencias de DNA. Para testar os elementos funcionais, o DNA teste é ligado a montante da região de codificação do gene repórter para gerar um gene quimérico no qual o elemento regulador (*promotor*) controla a expressão do gene repórter. O vetor possuindo os elementos reguladores e estruturais que são usados em procedimentos de transformação. A expressão do DNA introduzido pode ser monitorada após 12h, entretanto a maioria dos estudos avalia a expressão do gene repórter entre 24 e 72 h após transfecção (*apud* Jawed Alam, Julia L. Cook 1990). A intensidade da fluorescência emitida proporciona uma leitura direta da expressão do gene repórter (Cheng *et al* , 1996). Análise de citometria de fluxo é utilizada para monitorar a expressão de genes repórteres induzível. Que pode ser estimada ao nível de uma única célula (Anderson,M.T., *et al*, 1996).

1.3 Análise de expressão gênica (*in silico*)

A visualização dos processos biológicos como um todo pode ser analisada usando a tecnologia de *microarray* de DNA. Nos *chips* usados nesta tecnologia existem dezenas de milhares de sondas para que todos ou a maioria dos genes de uma espécie possam ser quantificados simultaneamente. A análise destes dados de expressão gênica revela uma lógica molecular e biológica profunda sobre os programas de expressão gênica durante eventos como, por exemplo, a diferenciação celular e ativação do ciclo celular. (*apud* Brown, 2000). Pode haver a comparação de tecido tumoral com tecido não tumoral, respostas de expressão dos genes a um estímulo de *stress*, ou a comparação de padrões de expressão em um tecido particular ao longo do tempo. Conceitualmente, as diferenças entre os vários estados devem ser refletidas em mudanças em determinadas vias metabólicas celulares. Dados de *microarray* permitem identificar genes envolvidos e suas contribuições para estas vias. Em geral, é possível identificar os processos celulares nos quais a maioria dos genes está associada a uma função biológica particular, na qual sua regulação é realizada de forma antagônica ou não. No entanto, esta técnica de análise em larga escala ainda apresenta viés, por problemas de hibridização inespecífica em algumas sondas e isto levou pesquisadores a retratar a técnica

como não confiável. Contudo, quando os resultados dos estudos de *microarray* são submetidos à validação independente usando outras técnicas (com a q-RT-PCR), a confirmação da taxa é superior a 90% (*apud* Quackenbush, 2003).

1.4 Gene CELF2

Cada passo na vida de um transcrito, incluindo a sua produção, modificação, transporte, tradução, e decaência, é rigidamente controlado. Muitas famílias de proteínas de ligação ao RNA interagem diferencialmente com subconjuntos específicos de transcritos. CELF/BRUNOL é um membro da família de proteínas que já recebeu os nomes BRUNOL3, CUGBP2, ETR-3, ETR3, NAPOR. Os membros da família de proteínas CELF/BRUNOL são proteínas de ligação ao RNA e contêm dois motivos de reconhecimento na região N-terminal e um domínio C-terminal. Os membros desta família de proteínas de regulação estão envolvidos na edição de pré-mRNA. Mas podem também estar envolvidos na edição de mRNA e na tradução, resultando em múltiplas variantes de transcrição que codificam diferentes isoformas (Timchenko *et al*, 1999).

Um exemplo é o CUG-BP 2, família *Elav-like* (CELF2), Localizado no cromossomo 10 em *Homo sapiens* (figura.1). A família de proteína CELF2 tem se mostrado importante no processamento e regulação de RNAs em várias etapas no núcleo e no citoplasma, mas pouco se sabe sobre a existência ou como estas são coordenadas. Na literatura foi demonstrado que *in vivo* a proteína CELF2 desempenha papéis na gametogênese, no desenvolvimento embrionário inicial, nas funções cardíacas, músculo esquelético e transmissão neurosináptica. A desregulação dos programas mediados pelo CELF2 tem sido correlacionada na patogênese de doenças humanas. Muitos tecidos expressam múltiplas proteínas CELF2, mas a extensão da redundância funcional e as contribuições individuais dos membros da família específicos não foram determinadas. Os fenótipos distintos de camundongos *knockout* CELF2 sugerem que diferentes membros da família, de fato, desempenham papéis diferentes *in vivo* (Anant, S *et al*, 2001). A elucidação e comparação de alvos regulados por cada membro da família vão ajudar a compreender a real importância deste gene (Dasgupta T *et al*, 2012).

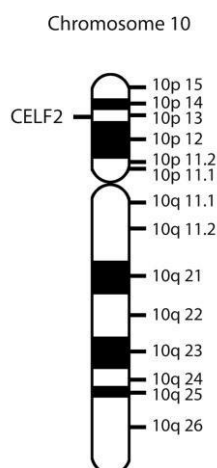


Figura 1. Localização esquemática do gene CELF2 em *Homo Sapiens*. Disponível em: http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=2550

1.5 Ciclo celular e Câncer.

Com o avanço da compreensão da oncogênese e apoptose, existe uma valorização do papel da regulação do ciclo celular, tentando desvendar o mecanismo pelo qual ele possa ser alterado na transformação maligna. A modulação do ciclo celular também contribui para a resistência à quimioterapia (MA Dickson *et al*, 2009). O ciclo celular regula a transição da quiescência (G0), para a proliferação, enquanto assegurando a fidelidade da transcrição genética. As fases associadas com síntese de DNA (fase S) e mitose (fase M) são separadas por intervalos G1 e G2 (Schwartz *et al*, 2009). O padrão de expressão das ciclinas define a progressão da célula através do ciclo (Johnson DG *et al*, 2009). Complexos específicos regulam cada passo do ciclo. As ciclinas D1-D3 / cdk 2, -4 e -6 tem uma progressão de suas unidades através G1; ciclina E / cdk 2 controla a entrada na fase S, Uma ciclina / cdk 2 controla a progressão da fase S, uma ciclina /cdk 1 (também conhecido como cdc 2) controla G2; e cdk 1 / ciclina B facilita a mitose (MA Dickson *et al*, 2009). A entrada no ciclo celular (G1) é regulada pelo ponto de restrição, o qual a progressão através do ciclo é independente de estímulos como, por exemplo, mitógeno (Pardee AB *et al*, 1974). Mitógeno é uma substância que estimula a proliferação celular, desencadeando a mitose. Em geral os mitógenos são de natureza proteica e atuam através da sinalização de Ras / Raf / MAPK caminho que leva à produção de ciclina D. (MA Dickson *et al*, 2009). O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto saudáveis (Salmonm *et al*, 1998). Pesquisas são realizadas com diferentes agentes químicos que possivelmente possam interagir no ciclo celular entre eles esta a Deferoxamina, Curcumina e Inibidor de ABL.

1.6 Características das Linhagens Celulares usadas neste estudo

A linha celular K562 foi originalmente estabelecida a partir de uma efusão pleural de um paciente com Leucemia Mielóide Crônica em crise terminal (Lozzio *et al*, 1975) o qual exibe o cromossomo Filadélfia (Ph), uma aberração envolvendo uma translocação cromossômica identificada em 90% de casos de Leucemia Mielóide Crônica. Essa translocação origina a tirosino-quinase Bcr-AbL (Fialkow PJ *et al*, 1979). As células K562 foram extensivamente utilizadas como um sistema de modelo *in vitro* para estudo. As células U937 são um modelo de linhagem celular utilizada na investigação bioquímica e foi estabelecida a partir de um linfoma de um paciente de 37 anos do sexo masculino. Esta linha celular é uma das poucas linhas de células que exibem muitas características monocíticas, assim, serviu como modelo para a diferenciação de monócitos e macrófagos *in vitro*. As células podem se diferenciar em macrófagos e podem ser induzidas por uma variedade de agentes de maturação, numa fase de desenvolvimento monocítica. Este processo é acompanhado pela aquisição de um número de características morfológicas e funcionais que estão normalmente associados com macrófagos maduros e requer a expressão de oncogenes (Lehmann *et al*, 1998).

1.7 Deferoxamina

A Deferoxamina (Figura. 2) DFO forma complexos predominantemente com os íons trivalentes de Ferro e Alumínio. A afinidade da DFO para íons divalentes tais como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} é substancialmente menor quando comparado aos trivalentes. A quelação ocorre em base molar de 1:1, de modo que 1g de DFO pode, teoricamente, ligar-se a 85 mg de Fe^{3+} ou 41mg de Al^{3+} . Em decorrência de suas propriedades quelantes, a DFO é capaz de deslocar ferro, tanto em forma livre quanto ligado à ferritina e à hemossiderina, formando, portanto o complexo ferrioxamina (FO). A DFO, entretanto, não remove o ferro da transferrina, da hemoglobina ou de outras substâncias hemínicas. A DFO pode também mobilizar e quelar o alumínio, formando um complexo aluminioxamina (AIO). Quatro metabólitos da DFO foram isolados e identificados na urina de pacientes com sobrecarga de ferro. Observou-se a ocorrência das seguintes reações de biotransformação com a DFO: transaminação e oxidação, resultando em um metabólito ácido; betaoxidação, também resultando em um metabólito ácido; descarboxilação e N-hidroxilação, resultando em metabólitos neutros (*aput* Plataforma HiDoctor ©2014).

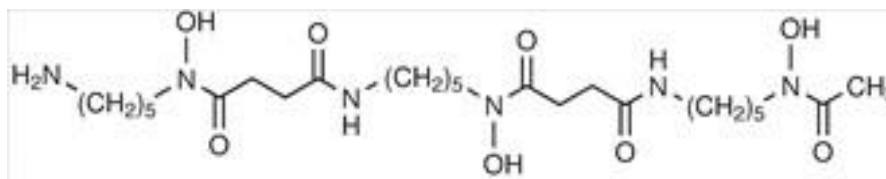


Figura 2: Formula estrutural do composto Deferoxamina. segundo IUPAC N'-{5-[Acetyl(hydroxy)amino]pentyl}-N-[5-({4-[(5-aminopentyl)(hydroxy)amino]-4-oxobutanoyl}amino)pentyl]-N-hydroxysuccinamide. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d9533?lang=en®ion=>

1.8 Inibidor de ABL

O Inibidor de ABL PD 180970 (Figura. 3) é um inibidor potente da tirosino-quinase BcrAbl nos níveis *in vitro*, celular e *in vivo*. O composto inibe seletivamente a proliferação e induz a apoptose em linhagens celulares Bcr-Abl positivas, bem como em células leucêmicas frescas de pacientes com LMC, cromossomo Philadelphia (Ph) positivo e leucemia linfoblástica aguda (LLA).

O composto demonstra atividade anti-tumoral como agente único em modelos animais utilizando células tumorais Bcr-Abl positivas. *In vitro*, o inibidor de ABL PD 180970 inibe a proliferação e induz a apoptose das células tumorais do intestino (GIST). Inibidores de proteína tirosina cinase são capazes de modular a sinalização intracelular.

(Valerie Guez *et al*, 2004).

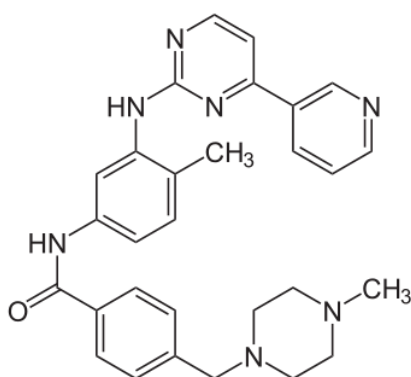


Figura 3: Formula estrutural do composto PD180970 Segundo IUPAC 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-N-[4-methyl-3[(4-pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]phenyl]benzamide. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d9533?lang=en®ion=>

1.9 Curcumina

A Curcumina (Figura. 4), um membro da família dos compostos *curcuminoides*, é um pigmento fenólico de cor amarela, obtido a partir da cúrcuma (*Curcuma longa L.*), pertencente à família da *Zingiberaceae*. A atividade antioxidante da curcumina tem sido atribuída aos seus grupos hidroxil e metóxi um típico extrato cru dos rizomas da *C. longa*, contem cerca de 70% a 76% de Curcumina diversos estudos caracterizaram a ação anti-inflamatória da Curcumina, aliada à ação antibacteriana, antiviral, antifúngica e antitumoral (Rahman I, *et al* 2006). A Curcumina modula *in vitro* diversos alvos moleculares, incluindo o NF-κB, e a expressão dos genes induzidos por este fator de transcrição, como as proteínas COX-2, NOS, VCAM-1, ICAM-1, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e interferon-γ. Além disso, a Curcumina inibe *in vitro* a ativação do NF-κB dependente de TNF-α, além da ativação induzida por forbol-12-acetato-13-miristato (PMA) e por peróxido de hidrogênio. Todos esses três indutores citados estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio, que são potentes ativadoras do NF-κB (Hatcher H *et al*, 2008).

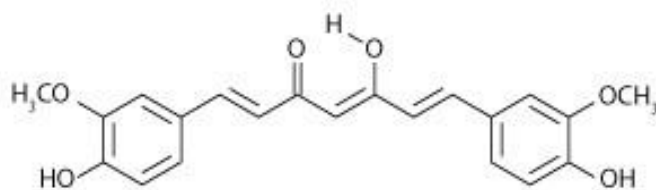


Figura 4: Formula estrutural do composto Curcumina , segundo IUPAC (1E,6E)-1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) - 1,6heptadiene-3,5-dione.<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d9533?lang=en®ion>

1.10 Hipótese

Acreditamos que o tratamento das celulares de origem leucêmica com as drogas citadas poderia aumentar a expressão do gene CELF2 e por consequência inibir o gene COX2 resultando possivelmente em uma diminuição da proliferação celular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

*Determinação da estrutura da região promotora do gene CELF2 e estudar a expressão deste em modelos celulares de leucemia.

2.2 Objetivos específicos

Analisar regiões potencialmente promotoras do gene CELF2 através do uso de ferramentas de genômica comparativa;

Clonar diferentes fragmentos da sequência promotora em plasmídeo contendo o gene repórter GFP;

Obter de bases de dados de *microarray* para modelos celulares que expressem o gene CELF2;

Obter de bases de dados de *microarray* e na literatura substâncias que modifiquem a expressão de CELF2 em modelos celulares;

Avaliar o efeito sobre o ciclo e viabilidade celular das substâncias que potencialmente modulam a expressão do gene CELF2;

Analisar por qPCR a expressão dos genes COX2 e CELF2 nas linhagens celulares determinadas como modelo neste estudo e durante o tratamento com as substâncias selecionadas.

3. METODOLOGIA

3.1 Análises de modelos com expressão diferencial de CELF2 em banco de dados de (*microarranjo*)

Foram realizadas buscas no banco de dado GEOprofiles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/>) com o nome do gene (CELF2), mais o modelo de estudo a ser usado, neste caso K562. Os gráficos de expressão deste gene foram analisados manualmente, buscando dados de expressão diferencial quando as células em questão eram tratadas com substâncias químicas. Dados com potencial expressão diferencial em modelos *knockout* foram ignorados.

3.2 Análises de genômica comparativa.

As sequências genômica correspondente ao gene CELF2 foram importadas da base de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10659>), localização de 10796888 bases a 11336675 bases no cromossomo 10 de *Homo sapiens*, sequenciado pelo genoma de referência consortium (data 17/12/2013). Compreendemos *upstream* como início de transcrição do gene como ponto zero o qual foi selecionado -1700 bases. A sequência foi alinhada no programa BioEdit (Thomas A.Hall,1999) usando a análise ClustalW com base no algoritmo Neighbor Joining (Toby J.Gibson, 1983) e destas foram obtidas as sequências reverso complementas as quais foram analisadas no banco de dados do VISTA genômica comparativa (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) limite de probabilidade do rank VISTA ($0 < P < 1$) = 0.5, genoma humano de referência foi de Feb , 2009.

Primer	Sequência
Promo CELF2 direto1	cgatttcggcctattggtaAGGCTTGAGTGAATGCAGAC
Promo CELF2 direto2	cgatttcggcctattggtaCTAAGGGTCTTGACCTTGTC
Promo CELF2 direto3	cgatttcggcctattggtaGGTAACTGTACATGCGAAG
Promo CELF2 direto4	cgatttcggcctattggtaTAAAGAGAGCCACAGAGAGG
Promo CELF2 reverso	cacgttgggtctccctataAAACATCAATGCCACAGTCG
Biocolor direto	TATAGGGAGACCCAAGCTG
Biocolor reverso	TAACCAATAGGCCGAAATCG
GFP – anti reverso	GCTCGATAACAATAAACGCC
RSV direto	GCTCGATAACAATAAACGCC
B-actin F-RT	GCTGATCCACATCTGCTGG
B-actin R-RT	ATCATTGCTCCTCCTCAGCG
COX2-F-RT	GAATCATTCACCAGGCAAATTG
COX2-R-RT	TCTGTACTGCGGGTGGAACA
CELF2-F-RT	TGCTTCAACCCCCAACTCC
CELF2-R-RT	GTCCTTGCAGAGTCCCGAGA

Tabela 1: Primer utilizados neste estudo

Os primer (Tabela. 1) foram desenhados e analisados no programa Oligo Analyzer (copyright© 2000–2002 Teemu Kuulasma).

3.3 Clonagem molecular no vetor pCRBicolorRSV por PCR circular.

O plasmídeo pCR-BICOLOR, criado pelo nosso grupo, foi utilizado como base para a clonagem de diferentes fragmentos do potencial promotor do gene CELF2 *upstream* à sequência codificante do gene repórter GFP. A clonagem foi realizada usando a técnica de PCR circular e os construtos gerados foram denominados BicolorRSV+D1, BicolorRSV+D2, BicolorRSV+D3 e BicolorRSV+D4. Os termos D1,D2,D3,D4 são referentes à sequência clonada. As sequências dos primers usados para amplificar o plasmídeo e os diferentes fragmentos do promotor do gene CELF2 são mostrados na tabela 1. A PCR circular foi realizada segundo Quan *et al.*, 2009, brevemente: foi realizada uma reação de PCR (utilizando uma unidade de DNA Polymerase high-fidelity (Fermentas) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As condições dos ciclos usados para cada reação são detalhados a seguir. **PCR amostra DNA (amplificação do promotor):** 94°C 3minutos / 35ciclos, 94°C 30s, 58°C 30s 72°C 1minuto e 30s/ extensão final por 10minutos a 72°C. **PCR do plasmídeo pCR-BICOLOR:** 94°C 3min / 35ciclos, 95°C 30s, 55°C 30s, 8 minutos a 68°C, / extensão final por 10minutos a 68°C. Os produtos das reações de amostra PCR foram purificada usando Invisorb® Spin DNA Extraction Kit e quantificado no aparelho NanoVue Plus, após quantificação as amostras foram diluídas em água ultrapura até atingir a mesma condição molar. **Condições da reação de PCR circular** 94°C 3 minutos/ 15 ciclos, 95°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 8 minutos 68°C/ extensão final por 10minutos a 68°C. Usamos a metodologia descrita por Quan J, Tian J. (2009). Circular Polymerase Extension Cloning. Todas as reações foram realizadas em um termociclador (Agilent Technologies / Sure Cycler 8800). Os produtos de PCR circular foram usados para transformar bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5-alfa por eletroporação seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do eletroporador Gene Pulser Xcell – BioRad. A avaliação dos produtos recombinantes foi realizada pela técnica de PCR de colônia nas seguintes condições: 94°C 5 minutos/ 35ciclos 95°C 30 segundos, 72°C 2 minutos. Foi utilizada uma DNATaq Polymerase recombinante (Life Technologies) (5U/μl) 2.5ml 10x buffer (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) MgCl₂ (50 mM).As colônias positivas foram colocadas em crescimento pelo período de 16 horas, sobe agitação a 37°C até atingir a densidade óptica >1,0 A 600nm, os plasmídios foram extraídos usando o sistema (Pure Yield™ Plasmid Midiprep/ PROMEGA).

Para confirmar a qualidade da sequência clonada os plasmídeos foram sequenciados pelo serviço da empresa Ludwig Biotec (PoA, Brasil).

3.4 Transfecção por Eletroporação

Foi adicionando 1ng de plasmídeo em 20ul de bactérias competentes. Estas foram colocadas em uma cubeta de 0,2mm estéril e aplicado uma voltagem 2,500V, 25 capacitância, 200 de resistência, adicionado 1ml de meio LB (1g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura 1g de NaCl, H2O destilada 100mL), e incubadas pelo período de 1 hora à 37°C em estufa bacteriológica. Após este período as bactérias foram colocadas em placas de Petri contendo meio LB (1g de triptona 0,5 g de extrato de levedura 1g de NaCl, H2O destilada 100mL, 0,5g de Ágar) contendo ampicilina 1:1000. As colônias foram colocadas em meio LB (1g de triptona 0,5 g de extrato de levedura 1g de NaCl, H2O destilada 100mL, ampicilina 1;1000) e incubadas pelo período de 16 horas sobe agitação em estufa bacteriológica a 37°C. A avaliação dos produtos recombinantes foi realiza por uma reação de PCR nas seguintes condições: 94°C 5 minutos/ 35ciclos 95°C 30segundos, 72°C 2 minutos. Foi utilizada uma DNATaq Polymerase recombinante (Life Technologies) (5U/μl) 2.5ml 10x buffer (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) MgCl₂ (50 mM).As colônias positivas foram colocadas em crescimento pelo período de 16 horas, sob agitação a 37°C até atingir a densidade óptica >1,0 A 600nm, os plasmídios foram extraídos usando o sistema (Pure Yield™ Plasmid Midiprep/ PROMEGA).

3.5 Transfecção de pCRBicolor em células K562.

As células foram centrifugadas com meio RPMI 1640, sem antibiótico e sem soro fetal bovino, duas vezes a 4000RPM, 22°C pelo período de 5 minutos, a concentração de células usada foi de $5,9 \times 10^7$ /ml¹. Um volume de 0,3ml foi transferido para um tubo de 1,5ml contendo a concentração de plasmídeo em media 100ug/ml que foi previamente concentrada em um aparelho (Concentrator Plus Eppendoff/Alemanha), na temperatura de 60°C pelo período de 7 minutos. A células forma deixas pelo período de 15 minutos em temperatura ambiente na presença dos plasmídeos, foi transferido para uma cubeta 0,4mm estéril (Gene Pulser Xcell system electroporation/BIO RAD), e aplicado um uma voltagem de 350v, 30(ms), com a resistência infinita. Os produtos foram centrifugados a 4000RPM, 30s e deixados à temperatura ambiente pelo período de 20 minutos. O meio RPMI1640 foi

descartado e as células foram colocadas em placa com 3ml de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10mM de tampão HEPES, pH 7,4, em estufa úmida a 37°C, com 5% CO₂. Após o período de 24 horas as células foram tratadas com 10mM Curcumin (Sigma/EUA), 50mM Deferoxamina (Sigma/EUA) e 10mM inibidor de ABL PD 180970 (Sigma/EUA) todos em triplicata e incubado em estufa de CO₂. Após 24 horas de tratamento foi realizada acitometria de fluxo em um aparelho modelo C6 da marca Accuri coletando 10.000 eventos por avaliação. Os dados foram analisados utilizando o software CFlow Plus (Accuri, Estados Unidos).

3.6 Extrações de RNA e RT-PCR-TIME

As células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10mM de tampão HEPES, pH 7,4, em estufa úmida a 37°C, com 5% CO₂. As células foram semeadas a uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células/mL e repicadas a cada 48 ou 72 h, em fluxo laminar. Para a realização dos experimentos, as duas linhagem celulares foram tratadas com Curcumina na concentração 25mM, Deferoxamina na concentração 50mM e inibidor de ABL PD 180970 na concentração 1mM, todos em triplicata e incubado em estufa de CO₂ por 24 horas. Todos os procedimentos de preparação das amostras foram realizados em fluxo laminar e todo material utilizado foi previamente esterilizado. Após o período de incubação de 24 horas, foi realizada uma extração de RNA usando o Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp. Canada) com protocolo específico do fabricante, os valores de RNA extraído foram quantificados, foi utilizado 25ng de RNA total na síntese de cDNA em uma reação de 2.5µl a 10pmol/µl de dNTP, 10µl H₂O, 1µl M-MLV Transcriptase Reversa (200 U/µl) por tubo de reação, 10µl 5x estabilizador de Reação [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM Cloreto de Magnésio] 5µl DTT em uma concentração 100mM) com primer(s) a 10 pmol/µl. Foi pré-incubado a 65°C por 5 minutos sem adição da Transcriptase Reversa, após este período de pré-incubação foi adicionado 1µl M-MLV Transcriptase Reversa (200 U/µl) por tubo de reação, pelo período de 42°C durante uma hora. cDNA foi sintetizado imediatamente após a extração do RNA total. Produto da reação de síntese de cDNA foi diluído na proporção de 1:20 (95µl H₂O em 5µl de produto de cDNA).

Reação de qPCR foi realizada usando o Platinum® SYBR® Green qPCR (SuperMix-UDG 10µl, 0.4µl (10pmol/µl) primer direto e reverso, 0.1µl ROX de referencia 50nM, 9.1µl

de cDNA diluído (1:20) sendo a o volume final da reação de 20 µl. O aparelho usado foi um ABI 7500 FAST, nas seguintes condições; 50°C 2 minutos, 95°C 2 minutos em 40 ciclos de 95° 15 segundos e 68°C 30 segundos.

3.7 Análise de viabilidade e ciclo celular por Citometria de Fluxo.

Visando avaliar o perfil das substancias selecionadas no ciclo celular e viabilidade celular, células da linhagem k562 foram cultivadas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10/mM de tampão HEPES, pH 7,4. A cultura celular foi acondicionada em estufa úmida a 37°C, com 5% CO₂. As células foram semeadas a uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células/mL e repicadas duas vezes por semana na relação 1:5 sob condições de esterilidade em fluxo laminar. Para a realização dos experimentos, as células foram tratadas com diferentes concentrações das substancias (diluição seriadas de base 2 a partir da máxima concentração utilizada na literatura, num total de 4 diluições) 10^5 células foram tratadas em um volume final de 1ml. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas e analisados nos tempos 24/horas, 48/horas e 72/horas. Antes do tratamento, todas as células foram mantidas em meio fresco por 24/horas. Após o período de incubação as células foram tratadas com Iodeto de Propídio (PI) usando 10µL de uma solução estoque 50µg/mL a cada 100µl de suspensão celular, para análise da viabilidade celular e, posteriormente, foi adicionado 400/µl Tampão hipotônico Pollack (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl) mais 5/µL de PI (1mg/ml) em cada tubo para avaliar o ciclo celular. As avaliações de viabilidade e ciclo celular foram realizadas em um citometro de fluxo modelo C6 da marca Accuri coletando 10.000 eventos por avaliação. Os dados foram analisados utilizando o software CFlow Plus (Accuri, Estados Unidos) e FlowJo (versão 10.0.6, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Estudo *in silico* do promotor do gene CELF2

O primeiro passo para estudar a expressão do gene CELF2 foi conhecer quais eram as células que o expressavam. Devido à pouca informação na literatura usamos a ferramenta BioGPS (<http://biogps.org/#goto=welcome>). Como demonstrado na Figura 5 às células de origem hematológica e tecidos do sistema imunológico apresentam expressão elevada do gene CELF2, quando comparada com as demais amostras do banco de dados. Além destas células normais, o gráfico também demonstra que a linhagem K562 é a única das linhagens analisadas que apresentou expressão deste gene e por este motivo foi usado como modelo para o presente trabalho.

Desta forma, tendo definido a linhagem K562 como modelo, partimos para a busca de dados dentro da base de dados de microarranjos GEOProfiles usando o termo “K562 AND CELF2”. A análise individual dos gráficos de expressão de aproximadamente 70 resultados obtidos sugeriu uma expressão diferencial do gene CELF2 quando as células foram tratadas com DFO mostrando aumento de expressão quando comparado com os controles não tratados (figura 6 A) e uma leve diminuição da expressão durante o tratamento das células com Imatinib (inibidor de BCL-ABL) (Figura 6, B). Dados com expressão diferencial a partir do uso de super expressão gênica ou iRNA não foram levados em consideração. Além das substâncias químicas selecionadas pela análise de dados de expressão gênica de CELF2 obtidos da base de dados GEOProfiles também foi selecionada a Curcumina, que em tumor pancreático mostraram gerou aumento de expressão do gene CELF2.

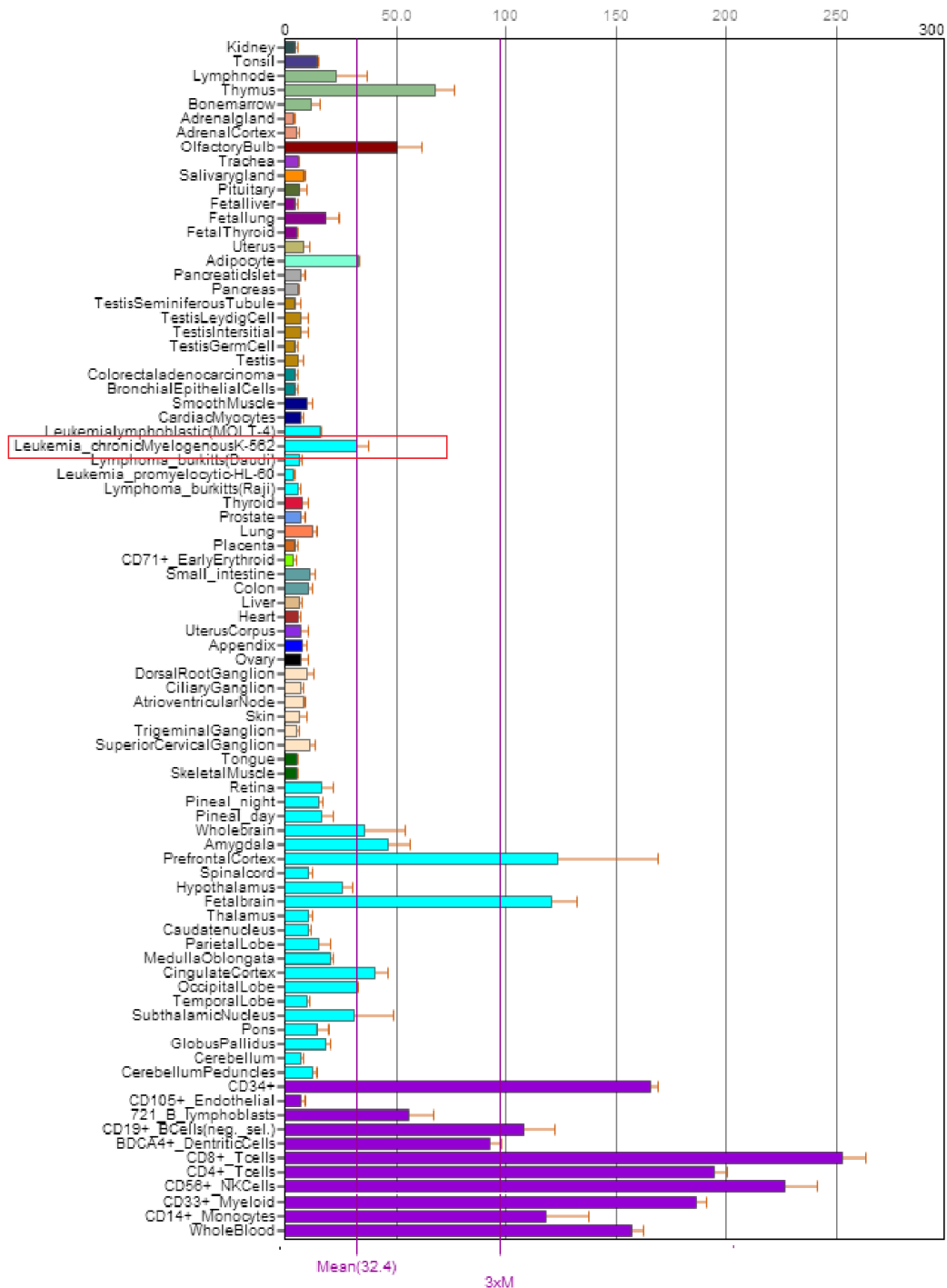


Figura 5: Expressão de CELF2 em diferentes tipos celulares. Dados obtidos no banco de dados BioGPS, a caixa vermelha salienta a expressão positiva de células k562.

As células de origem imunológica naturalmente tem uma expressão do gene CELF2 intrínsecas, quando comparada com as demais linhagens do banco de dados do BioGPS, como observado no gráfico, podemos supor que de forma evolutiva a estabilidade destas linhagens requer uma expressão gênica contínua do gene CELF2, que por sinalização celular iria coordenar a estabilidade destas células, nossa hipótese inicial é que o gene CELF2 seja um regulador mestre dos eventos de divisão e manutenção da estabilidade celular em linhagem celulares de origem imunológica.

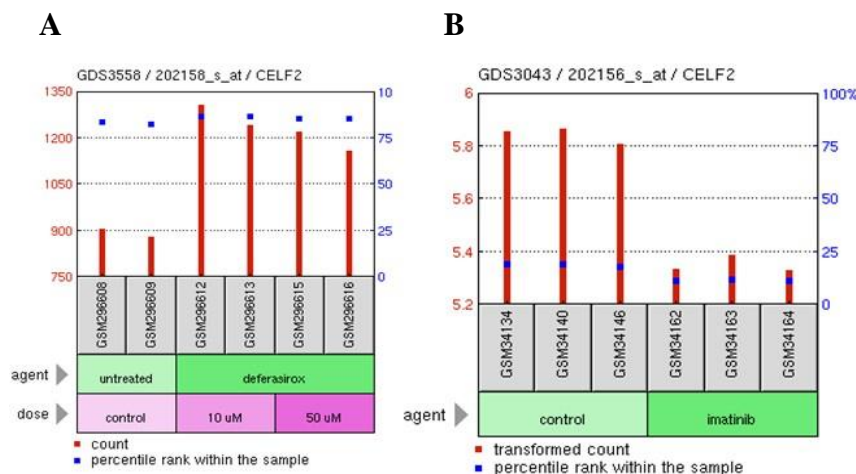


Figura 6: Resultado do banco de dados de *microarray* (GEOprofiles) para células k562 tratadas com DFO(A) e inibidor BCL-ABL(B).

Com o objetivo de analisar a atividade do promotor do gene CELF2 durante o tratamento das células K562, e na ausência de dados que apontem para a região promotora deste gene, realizamos uma análise de genômica comparativa na ferramenta rVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/rvista/submit.shtml>) comparando a região -2000 a +200 dos genomas de *Homo sapiens* e *Mus musculus*. Os resultados desta análise permitiram a visualização de uma região á montante do gene CELF2 altamente conservada entre as duas espécies utilizadas (Figura 7). A partir destes dados dividimos a região em quatro partes que foram usadas para desenhar primers de acordo com a o seu grau de similaridade. Além disto, este resultado foi a base para a compreensão da região promotora do gene CELF2 que, até a presente data, não tinha sido citado na literatura.

Homo sapiens sapiens X Mus musculos

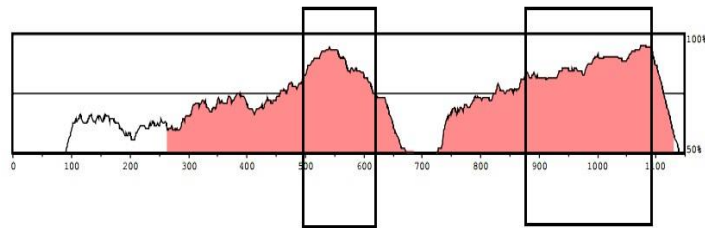


Figura 7: Resultado de análise de genômica comparativa de *Homo sapiens* e *Mus musculos* matriz de similaridade entra os 1.700 bases localizados a montante do gene CELF2.

Para saber se esta conservação acontecia dentro dos mamíferos com placentação do tipo discoide ou podia se estender a outros seres vivos a região de -1750 a +200 do gene CELF2 do genoma humano foi comparada em vários genomas usando a ferramenta gVISTA (<http://genome.lbl.gov/cgi-bin/GenomeVista>) como mostra a figura 8, mostrando que esta sequência se manteve conservada durante a evolução dos vertebrados e sua função, tanto da região promotora quanto do produto do gene CELF2.

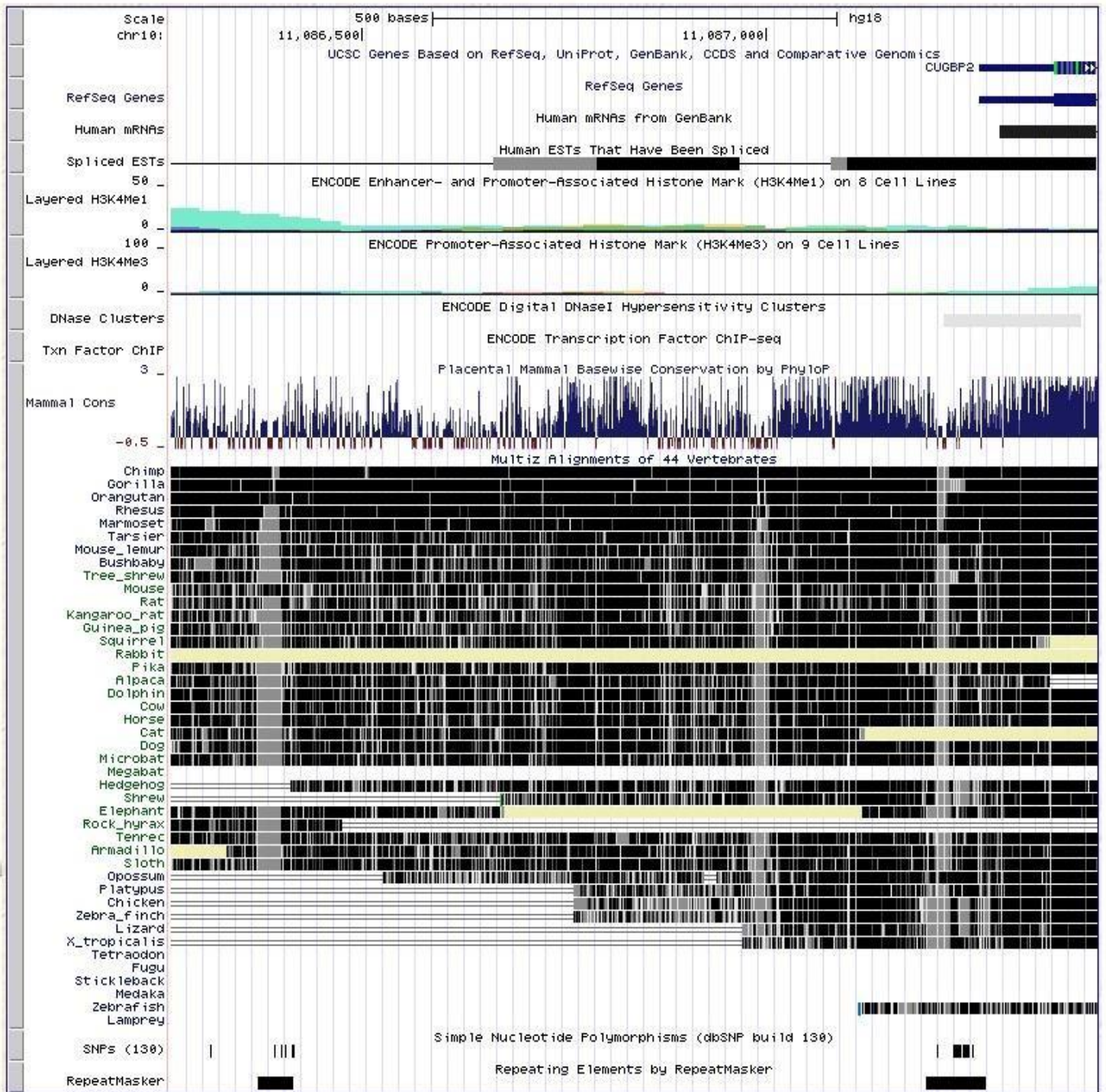


Figura 8: Resultado de análise de genômica comparativa de *Homo sapiens*, matriz de similaridade 500 bases.

4.2 Clonagem do promotor do gene CELF2 .

Os dados de bioinformática nos permitiram prever uma região altamente conservada evolutivamente, mas a sua funcionalidade requer estudo no nível molecular. Para tal, clonamos as regiões promotoras de CELF2 a montante da região codificante da proteína GFP no plasmídeo pCR-BICOLOR. A sequência da região promotora foi obtida por PCR de amostras de DNA humano usando os *primers* desenhados a partir dos dados obtidos do ensaio de genômica comparativa. Na Figura 7 são mostrados os produtos de amplificação do promotor do gene CELF2 que foram denominados com a letra D e um número em ordem crescente conforme o tamanho do fragmento aumenta, D4 corresponde a aproximadamente 1700pb (tamanho máximo clonado), D1,D2,D3 correspondem a diferentes seguimentos do promotor.

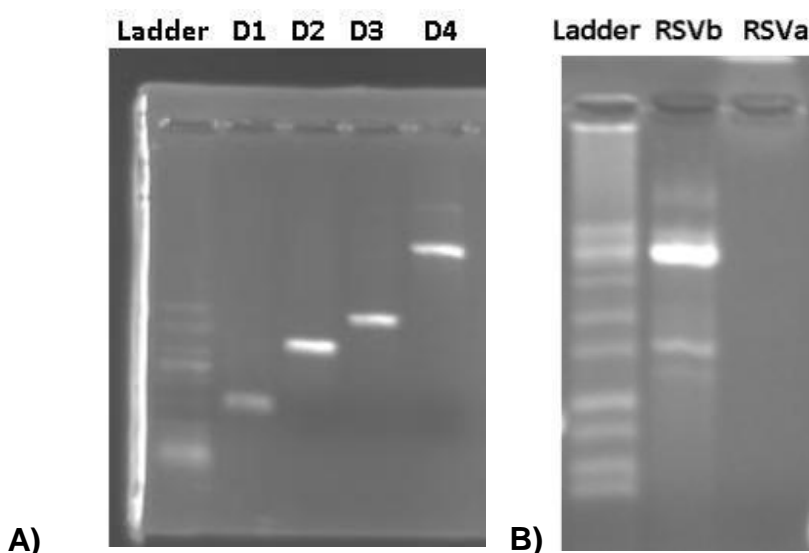


Figura 9 : Imagem da amplificação do promotor CELF2 e plasmídeo pCR-BICOLOR. A corrida eletroforética ocorreu em gel 1% corado com GelRed, são mostrando os produtos de amplificação de: A) D1, D2, D3, D4 e B) plasmídeo pCR-BICOLOR.

Os diferentes segmentos do promotor foram clonados no vetor plasmidial por PCR circular a montante da sequência codificante do gene repórter GFP.

Realizamos com sucesso a amplificação da sequência no vetor que após quantificado foram diluídos para deixá-los na mesma molaridade vetor da sequência. Realizamos a clonagem utilizando DNA polimerase de alta fidelidade durante 15 ciclos. Uma pequena

alíquota da reação final foi avaliada em gel de agarose em eletroforese (figura.10) comprovando a formação de uma quantidade significativa de produto recombinante e procedeu-se à eletroporação de *Escherichia coli* DH5-alfa.



Figura 10: Produto do PCR circular, bandas marcadas são o produto recombinante construído, da esquerda para direita recombinante ladder 10.0K, RSV +D1, RSV+D2,RSV+D3, RSV+D4. A seta mostra material restante do plasmídeo pCRBICOLOR linearizado que não formou o produto recombinante.

Quatro colônias resistentes a ampicilina foram escolhidas de forma aleatórias e analisadas pela técnica de PCR de colônia usando 1µl do da suspensão bacteriana. As colônias positivas foram sequenciadas.

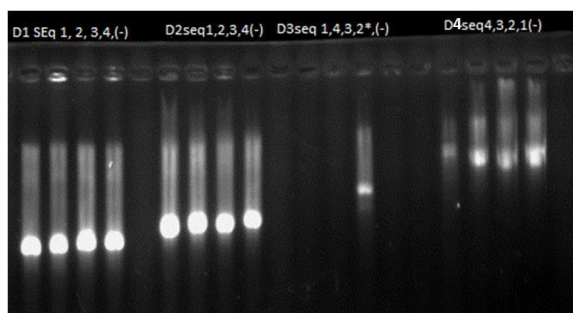


Figura 11: PCR de colônia E.coli DH5-alfa D1,D2,D3,D4, primer d1,d2,d3,d4 direto e GFP-anti como reverso. Colônias resistentes a Amp. Gel 0,5% Agar, TBE 0,5%. Taq Pol recombinante.

Os resultados do sequenciamento das colônias escolhidos aleatoriamente confirmou que a reação de clonagem demonstraram alta qualidade (Figura 12).

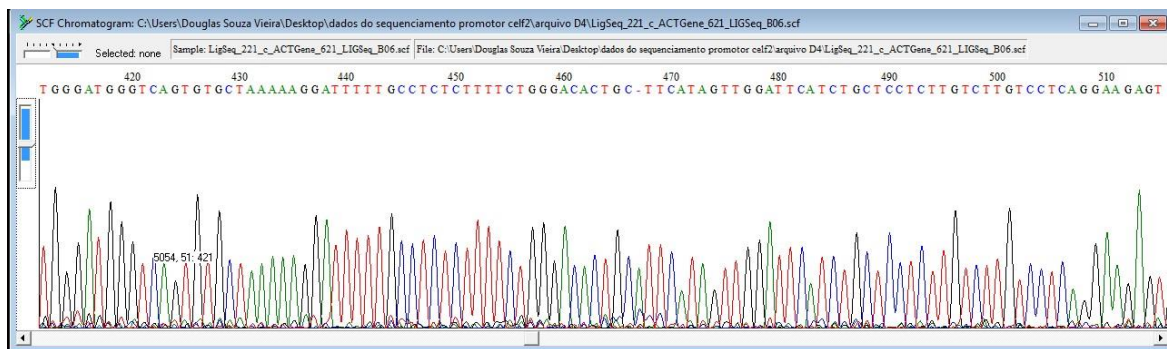
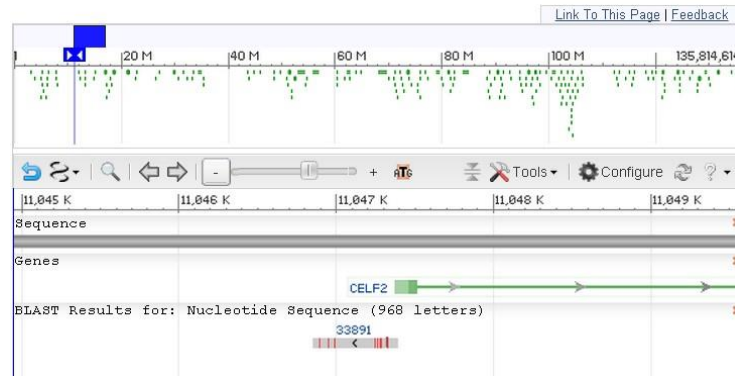


Figura 12 Eletroesferograma obtido do sequenciamento dos plasmídios (pCR-BICOLOR + promotor do gene CELF2).

Os resultados do sequenciamento das colônias escolhidas aleatoriamente confirmaram que a clonagem aconteceu exatamente como o esperado, sem mutações nas junções de clonagem. As sequências geradas pelo sequenciamento foram comparadas aquelas depositadas no banco de dados NCBI usando a ferramenta *Blast* a qual confirmo que as mesma se tratavam do promotor potencial de CELF2 (figura13-A) e que estas não possui mutações com respeito à sequência original, além de confirmar que estavam clonadas no sítio esperado dentro do plasmídeo pCR-BICOLOR (Figura 13-B) , os erros de interpretação na leitura do eletroesferograma, representados com base (N), foram avaliados individualmente confirmando que a base sequenciada correspondia à mesma da sequência depositada no NCBI.

A



B

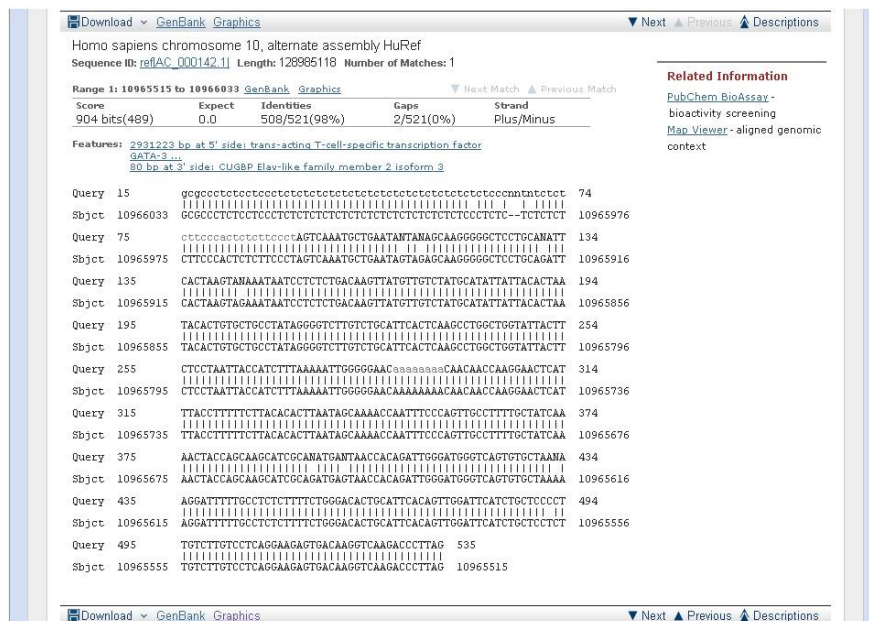


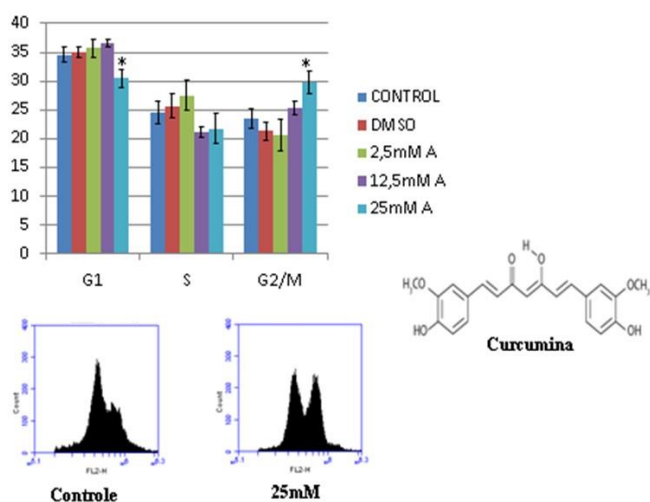
Figura 13: Resultado do BLAST da da região sequenciada no plasmídeo recombinante. A) gráfico mostrando o local de similaridade com respeito ao gene CELF2. B) Pareamento de bases mostrando a alta similaridade entre as seqüências.

4.3 Efeito da Curcumina, DFO e PD180970 no ciclo celular e viabilidade de K562

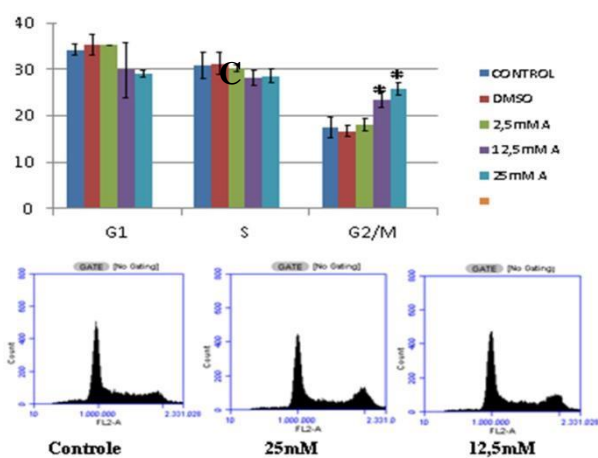
Para determinar as concentrações das diferentes substâncias a serem utilizadas nas células da linhagem K562 foram tratadas com diferentes concentrações e analisadas por citometria de fluxo nos tempos 24, 48 e 72 horas. Após 24 horas de tratamento com Curcumina a linhagem K562 mostra alteração na fase G1 e G2/M, unicamente nas amostras tratadas com 25mM. Figura 14-A. Após 48 horas de tratamento com Curcumina, pode-se

observar uma parada no ciclo celular em fase G2/M nas amostras tratadas com 12,5mM e 25mM, quando comparado com os controles não tratados, os dados de fluorescência gerados foram submetidos a teste estatístico ANOVA e Teste T o qual mostro valor de P inferior a 0,05. Em 72 horas de tratamento com 25mM as células da linhagem K562 tem uma parada do ciclo celular em G2/M. Figura 14 - C em comparação ao controle não tratado.

A



C



B

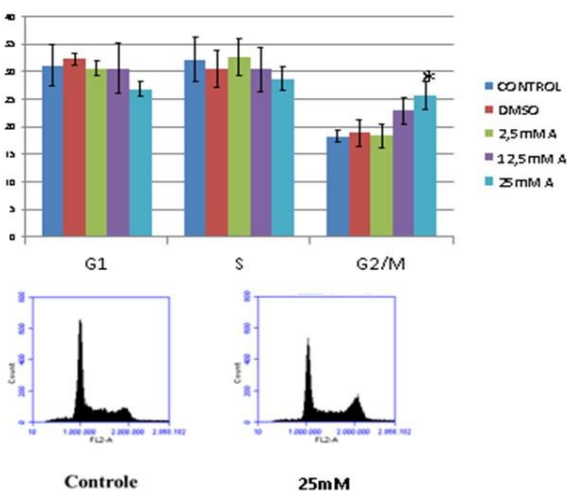


Figura 14: Análise de citometria de fluxo de células K562 tratadas com Curcumina durante A) 24Hs, B) 48Hs e C) 72Hs.

As células da linhagem K562 tratadas com Curcumina tiveram a viabilidade celular avaliada 24, 48 e 72 horas de tratamento, após 24hora de tratamento com 12,5mM e 25mM já foi possível observar um aumento significativo de células marcadas pela coloração com PI (iodeto de Propídio) indicando morte perda da viabilidade celular ($p < 0,05$). O inibidor de

ABL PD180970, somente apresentou coloração de PI após 48 horas de tratamento para a concentração 1mM, enquanto que DFO não apresentou dados estatísticos significantes em relação aos controles não tratados.

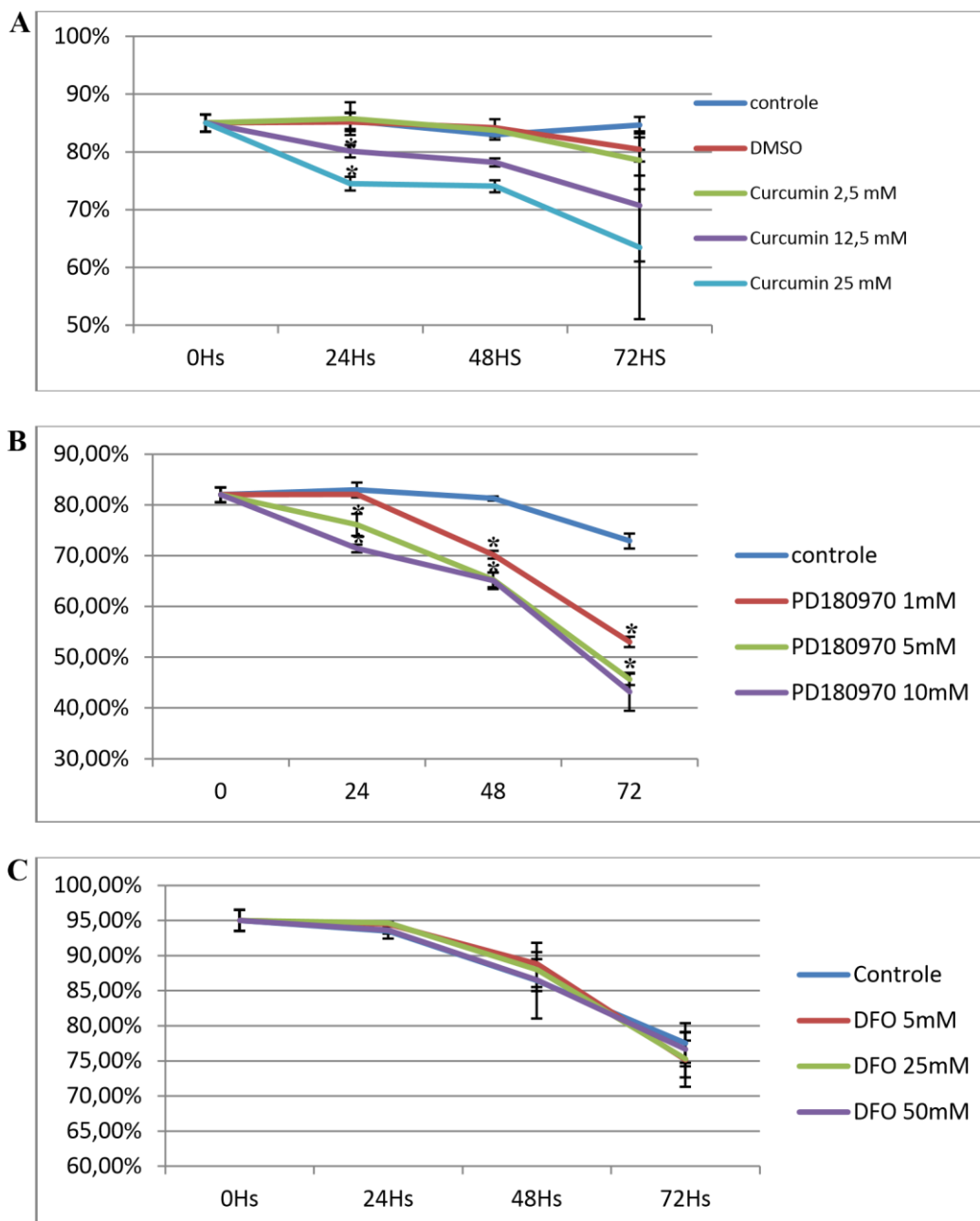


Figura 15: Análise de Citometria de Fluxo de células K562 quanto a sua viabilidade celular, após 24, 48 e 72 horas quando tratadas A) Curcumina B) PD180970 e C) DFO.

Devido ao fato que entre os mediadores do efeitos antiproliferativo da Curcumina foi proposto o aumento na expressão do gene CELF2 que diminuiria a ação do produto do gene COX-2, avaliamos a expressão destes dois genes por qRT-PCR em células K562 e U937 tratadas com as drogas Deferoxamina 50mM , Curcumina 25mM e inibidor de ABL

PD180970 1mM. Nenhuma linhagem celular em nenhum dos tratamentos demonstrou alteração na expressão do gene CELF2. Nenhuma das três substâncias induziram mudanças na expressão de COX-2 em células K562; porem, DFO e Curcumina causaram uma diminuição estatisticamente significativa da expressão de COX-2 em células U937 com relação às células não tratadas mostrando alteração nesta via de sinalização celular. Na figura 18 apresentamos unicamente o gráfico do gene que apresentou diferencia de expressão significativa.

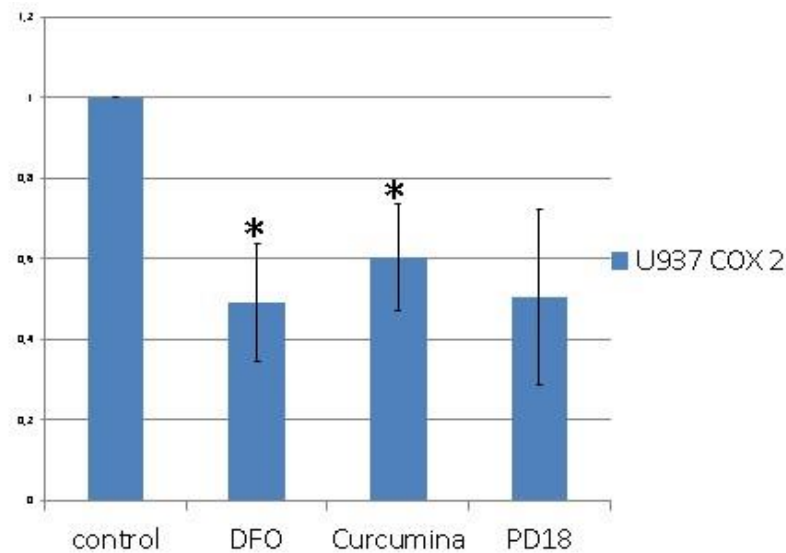


Figura 16: Gráfico estatístico das análises de qRT- PCR para a linhagem celular U937, decorrente dos tratamentos avaliados.

4.4 Transfecção de K562 com os plasmídeos contendo o promotor CELF2

A transformação de células da linhagem K562 foi realizada com sucesso quando foi usado o plasmidio base pCRBicolor. A avaliação por Citometria de Fluxo 24 horas pós-transfecção mostrou eficiência de transfecção de aproximadamente 60%, enquanto que os recombinantes pCRBicolor+D1, pCRBicolor+D2, pCRBicolor+D3, pCRBicolor+D4, não apresentaram expressão de GFP visível por Microscopia e Citometria de Fluxo até 72 horas de avaliação figura17 .

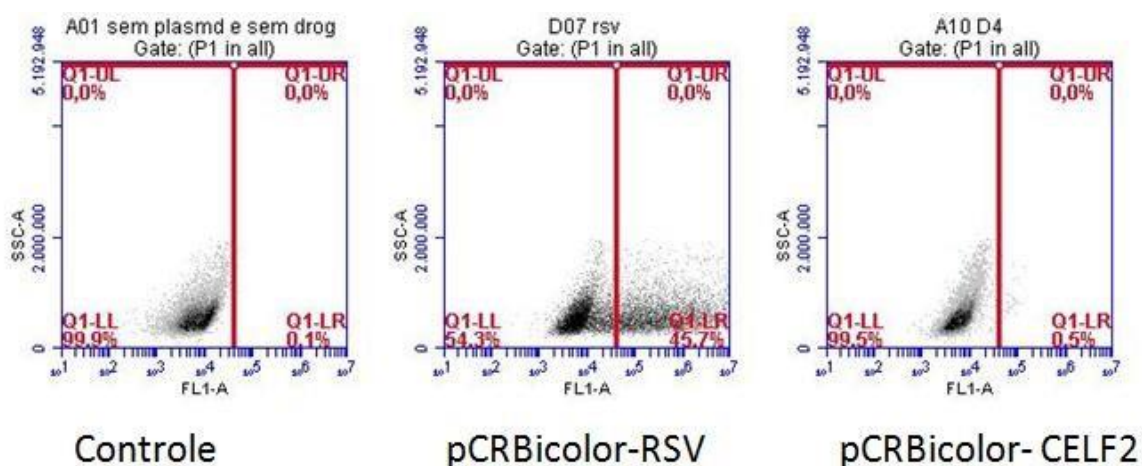


Figura 17: Avaliação da expressão do gene GFP. Células K562 transformadas com pCRBicolor com promotor RSV (pCRBicolor-RSV), pCRBicolor com promotor CELF2 (pCRBicolor-CELF2) e células não transformadas (controle) foram avaliadas por citometria fluxo quando a sua verde (canal FL1-A).

5. DISCUSSÃO

Regulação gênica é o processo de modulação de genes quanto a sua expressão positiva ou negativa. Durante o desenvolvimento das células a regulação gênica garante que os genes sejam expressos de forma apropriada nos momentos adequados (onde, quando e quanto), permitindo que estas respondam às mudanças ambientais através de uma grande variedade de mecanismos, incluindo a modificação química de macromoléculas de ação em *cis* ou em *trans*. (David M, *et al* 2014). Entretanto, se este sistema de regulação for afetado a célula pode sofrer apoptose ou sofrer transformação neoplásica. Entre os genes cuja expressão desregulada está relacionada com processos neoplásicos encontra-se o CELF2 que codifica uma proteína de ligação a RNA que estaria envolvida em edição pós-transcricional de RNA, na estabilidade da molécula de RNA ou no bloqueio do ribossomo durante a tradução dos RNAs ao qual esta proteína se liga. Um conjunto de patologias humanas está correlacionado na literatura com os arranjos cromossômicos envolvendo a região do gene CELF2; no entanto, existem poucos dados sobre a regulação deste gene. Sendo esta a lacuna o fator que nos conduziu no desenvolvimento deste estudo.

Ao longo do trabalho, nós demonstramos que tanto a região codificante do RNA do gene CELF2, quanto uma região de aproximadamente 1000 bases *upstream* do sítio de início da transcrição apresentam alto grau de conservação, demonstrando sua importância ao longo do processo evolutivo dos vertebrados. A identificação de uma região conservada imediatamente

upstream ao sítio de início da transcrição por métodos de genômica comparativa permitiu inferir sua função como promotor do gene humano CELF2, dado ainda não descrito na atual literatura. Com objetivo de obtermos um modelo de mudança da expressão do gene CELF2 buscamos dados na literatura e bases de dados de estudos de *microarrays*. Desta forma chegamos aos dados que demonstram expressão deste gene nas linhagens K562 e U937 que foram usadas nos diferentes protocolos usados neste trabalho. Entre os tratamentos que poderiam alterar a transcrição de CELF2 estaria a aplicação de Curcumina (Ramalingam *et al* 2008), em estudo realizado tratando células de câncer pancreático, mas nenhum dados aponta para a expressão em células hematopoiéticas ou leucêmicas. A partir da análise de dados de *microarray* de diferentes situações de células das linhagens K562 e U937, obtivemos dois compostos que poderiam alterar a expressão do gene CELF2, um deles seria a Deferoxamina que provocaria um leve aumento da expressão e o outro seria o inibidor de Bcr-Abl Imatinib que provocaria uma diminuição moderada da expressão deste gene. Ambos os dados não foram validados por qPCR nos respectivos trabalhos e, por este motivo, nos estudamos estes modelos. Ao mesmo tempo, foram clonados diferentes fragmentos do possível promotor do gene CELF2 em um vetor pCR-BICOLOR (desenvolvido pelo nosso grupo) para controlar a expressão do gene repórter GFP (abreviatura do inglês *green fluorescent protein*). Tanto a avaliação da expressão de GFP por Citometria de Fluxo quanto avaliação da expressão por qPCR durante o tratamento de células das linhagens K562 e U937 com as drogas citadas não demonstraram alteração na expressão deste gene. Por este motivo nós estudamos também a expressão do gene COX-2 nestas duas linhagens quando tratadas com Curcumina, DFO ou ABL PD180970. Nenhuma das três substâncias induziram mudanças na expressão de COX-2 em células K562; porém, DFO e Curcumina causaram uma diminuição estatisticamente significativa da expressão de COX-2 em células U937 com relação às células não tratadas e, portanto, poderia ser um dos efeitos que levaria à alterações no ciclo ou viabilidade celular nesta linhagem. Sureban *et al* 2007, demonstraram que a proteína CELF2 suprime a tradução do mRNA de COX-2. Em células saudáveis o mRNA de COX-2 não só é transcrito a uma taxa muito baixa, mas também degrada-se rapidamente. COX2, também conhecida como prostaglandina síntase, é a enzima responsável pela conversão de ácido araquidônico (AA) para as várias prostaglandinas, uma família de mediadores lipídicos que têm diversas funções biológicas (Smyth EM *et al* , 2009). Está envolvida em vários processos patológicos tais como inflamação e carcinogênese (Honkanen N *et al*, 1997).

Segundo Saukkonen K *et al* 2001, revelou que a expressão de COX-2 em pacientes com mutação em P53 foi mais elevada do que naqueles sem a mutação em P53. Isto indicou que a

mutação em P53 pode estar relacionada com a super expressão de COX-2. A proteína de tipo selvagem P53 podia inibir a formação de um complexo formado por proteínas de ligação a região TATA-box e os promotores localizados a montante das sequências deste gene e, eventualmente, inibiu a expressão de COX-2. Em contraste, o produto de tipo mutante p53 pode elevar a expressão de COX-2 por via do sinal de Ras / Raf / MAPK. Por outro lado, a COX-2 pode reversivelmente induzir mutação de p53, e ambas foram co-expressos em tecidos de tumor pancreático (Hermanova M, *et al* 2008). Devido ao fato que tanto K562 quanto U937 são linhagens que não expressam a proteína P53 (Durland-Busbice e Reisman, 2002). Estas expressam COX2 de forma constitutiva (Nakamura *et al* 2004). Nenhuma das três substâncias induziram mudanças na expressão de COX-2 em células K562; porém, DFO e Curcumina causaram uma diminuição estatisticamente significativa da expressão de COX-2 em células U937 em relação às células não tratadas e, portanto, poderia ser um dos efeitos que levaria à alterações no ciclo ou viabilidade celular nesta linhagem.

Quando as células tratadas foram testadas quanto aos efeitos na viabilidade e ciclo celular, todos os tratamentos causaram mudanças significativas em ambos os parâmetros, mas os efeitos foram maiores nas células onde o tratamento diminuiu a expressão do gene COX-2 (as células U937, dados não mostrados). Estes dados de diminuição da expressão do gene COX-2 são inéditos para células leucêmicas tratadas com Curcumina, DFO e inibidor de ABL PD180970 e são independentes de mudanças na expressão de CELF2. Ao mesmo tempo, nossos dados sugerem que a indução de CELF2 pelo tratamento com Curcumina é um fato célula-específico e que o modo de ação deste alcaloide nas células leucêmicas não pode ser explicado por mudanças nesta via de regulação da expressão gênica. Junto, estes dados aportam uma nova via de ação de Curcumina, inibidor de ABL PD180970 e DFO durante o tratamento de células leucêmicas e os mecanismos moleculares que levam à diminuição de COX-2, como também a quantificação da tradução da proteína COX-2 e prostaglandina E2 deverão ser determinados futuramente.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi determinado com dados de bioinformática a possível sequência promotora do gene CELF2 que se estende até 900 à montante de sítio de início da transcrição, esta foi clonada no vetor pCRBicolor, visando estudar a expressão deste gene; entretanto não foi possível observar a fluorescência, possivelmente pela baixa expressão deste gene fazendo com que a quantidade de proteína GFP esteja abaixo do limite de detecção. As análises realizadas na base de dados GEOprofile e BioGPS mostraram que as linhagens celulares expressam o gene CELF2. Além disso, dados não validados até o momento indicavam mudança na expressão do gene CELF2 nos tratamentos com DFO e PD180970. Nossos dados de qPCR mostraram que não existe variação na expressão de CELF2 nestes tratamentos nem quando as células são tratadas com Curcumina. Em células K562 tão pouco há alterações do gene COX2 durante estes tratamentos; no entanto, esta variação foi comprovada na linhagem U937. Embora não tenha sido induzidas alterações na expressão de COX2 e CELF2 na linhagem K562 Curcumina e PD100970 provocam diminuição da viabilidade e alterações no ciclo celular (bloqueio em G2/M) a partir das concentrações de 12,5mM e 1Mm, respectivamente.

7. PERSPECTIVAS

Pretendemos continuar os estudos e avaliação de expressão do gene CEFL2 em outras linhagens celulares.

8. REFERÊNCIAS

Asif T et al, 2002 **Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome** *Nature* 420, 520-562 (5 December 2002) | doi:10.1038/nature01262; Received 18 September 2002; Accepted 31 October 2002.

Anderson, M. T., Tjioe, I. M., Lorincz, M. C., Parks, D.R., Herzenberg, L A., and Nolan, G.P. (1996) **Simultaneous fluorescence activated cell sorter analysis of two distinct transcriptional elements within a single cell using engineered green fluorescent proteins.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, 8508–8511.

Cheng, L. Fu, J., Tsukamoto, A. e Hawley, 1996 **A utilização de variantes da proteína fluorescente verde para monitorar a transferência de gene e a expressão em células de mamíferos.** *Nat. Biotechnol.* , 14, 606 -609.

Donny D. Licatalosi and Robert B. Darnell **Resolving RNA complexity to decipher regulatory rules governing biological networks** *Nat Rev Genet.* Author manuscript; available in PMC Dec 4, 2011. Published in final edited form as: *Nat Rev Genet.* Jan 2010; 11(1): 75–87. doi: 10.1038/nrg2673.

David M, **National Institutes of Health.** “Talking Glossary of Genetic Terms.” National Human Genome Research Institute. 14 August 2014, Disponível em: <<http://www.genome.gov/glossary/>> Acesso em: 23 ago. 2014.

Dasgupta T, Ladd AN. **The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins.** *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012;3:104–121

Fialkow PJ : **Clonal origin of human tumors:** *Annu Rev Med* 30: 135-143, 1979

Gabriela G. Loots and Ivan Ovcharenko/. **rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding** Disponível em: doi: <[10.1093/nar/gkh383](https://doi.org/10.1093/nar/gkh383)>

Graña X, Reddy EP. **Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (cdks), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (ckis)** *Oncogene.*1995;11:211–19.

Hatcher H, Planalp R, Cho J, Tortia FM, Torti SV. **Curcumin: From 32. ancient medicine to current clinical trials.** *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(11):1631-52)

Henderson J O; Mukhopadhyay D; Navaratnam N; Kennedy S; Min J; Davidson N O (Dec 2001). "Novel role for RNA binding protein CUGBP2 in mammalian RNA editing. **CUGBP2 modulates C to U editing of apolipoprotein B mRNA by interacting with apobec-1 and ACF, the apobec-1 complementation factor**". *J. Biol. Chem. (United States)* 276 (50): 47338 51. Disponível em <[doi:10.1074/jbc.M104911200](https://doi.org/10.1074/jbc.M104911200).ISSN 0021-9258. PMID 11577082>

Hermanova M., Trna J., Nenutil R., Dite P., Kala Z., **A expressão da COX-2 está associada com acúmulo de p53 no câncer de pâncreas: análise da COX-2 e p53 expressão na pré-malignas e malignas lesões pancreáticas ductal** *Eur J Gastroenterol Hepatol.* de 2008; 20 . :732-739.

Jawed A., Julia L., Cook /Reporter genes: **Application to the study of mammalian gene transcription/** Disponível em: DOI: 10.1016/0003-2697(90)90601-5.

Johnson DG, Walker CL. **Cyclins and cell cycle checkpoints.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*1999;39:295–312.

John Q., *Science* 10 October 2003: **GENOMICS Microarrays Guilt by Association**
The author is at The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, USA. Email: johnq@tigr.org , Related Resources In *Science Magazine* Vol. 302 no. 5643 pp. 240-241 DOI: 10.1126/science.1090887

Lifton RP, Goldberg ML, Karp RW, Hogness DS (1978). "A organização dos genes de histonas em *Drosophila melanogaster*: funcionais e implicações evolutivas". *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42 :. 1047-1051 [doi : 10.1101 / sqb.1978.042.01.105](https://doi.org/10.1101/sqb.1978.042.01.105) .PMID 98.262

Lozzio CB and Lozzio BB: **Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome.** *Blood* 45: 321-334, 1975.

Lu X, T. NA, Timchenko L. T., (Mar, 1999). "Tipo elav a ligação da ARN-proteína Cardíaca (ETR-3) liga-se a repetições ARN CUG expandidas na distrofia miotónica." *Hum. Mol. Genet* 8 (1):. 5360 Disponível em: <[doi : 10.1093/hmg/8.1.53](https://doi.org/10.1093/hmg/8.1.53) . PMID 9.887.331>

Pardee A.B., **A restriction point for control of normal animal cell proliferation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71:1286–90.

Plataforma HiDoctor ©2014/ todos os direitos reservados/ Disponível em ; <http://www.bulas.med.br/bula/2432/desferal.htm>

Ramalingama S, Anant S **CELF2** (CUGBP, Elav-like family member 2); **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.** URL:<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/CELF2ID52815ch10p14.html> indexed on : Fri Aug 8 11:28:32 CEST 2014

Rahman I., Biswas S. K., Kirkham P. A., **/Regulation of inflammation 30. and redox signaling by dietary polyphenols.** *Biochem Pharmacol.* 2006;72(11):1439-52)

S Durland B., and D Reisman². **Lack of p53 expression in human myeloid leukemias is not due to mutations in transcriptional regulatory regions of the gene.** *Leukemia* (2002) 16, 2165-2167.

Sandra W et al., (STI571) **resistência na leucemia mielóide crônica: base molecular dos mecanismos subjacentes e estratégias potenciais para o tratamento.** Disponível em (PMID [15032675](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15032675/)).

Satoki N., et al., **COX-2 independent induction of apoptosis by etodolac in leukemia cells in vitro and growth inhibition of leukemia cells in vivo.** *Cancer Therapy* Vol 2, 153-166, 2004 Umesh et al, Disponível em; *Bioinformation.* 2014; 10(4): 175–179. Published online Apr 23, 2014.doi: [10.6026/97320630010175](https://doi.org/10.6026/97320630010175)

Smale, ST; Kadonaga, JT (2003). "O RNA polimerase II núcleo promotor." . Revisão anual de bioquímica 72 :. 44979 Disponível em: <[doi :10.1146 annurev.biochem.72.121801.161520](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520) . PMID 12651739>.

Solovyev V.V., Shahmuradov I.A, Salamov A.A., (2010) **Identification of promoter regions and regulatory sites.** *Methods Mol Biol.* 674, 57-83.

Staudt, B.,2000 / **Genomic Views of the Immune System/** Vol. 18: 829-859 (Volume publication date April 2000) Disponível em: DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.829

Smale, ST; Kadonaga, JT (2003). **"O RNA polimerase II núcleo promotor."** . Revisão anual de bioquímica 72 .: 44979 [doi :10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520) . [PMID 12651739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12651739/) .

Solovyev V. V., Shahmuradov I. A., Salamov A. A., (2010) **Identification of promoter regions and regulatory sites.** Methods Mol Biol. 674, 57-83. Hermanova M, Trna J, Nenutil R, Dite P, Kala Z. A expressão da COX-2 está associada com acúmulo de p53 no câncer de pâncreas: análise da COX-2 e p53 expressão na pré-malignas e malignas lesões pancreáticas ductal Eur J Gastroenterol Hepatol. de 2008; 20 . :732-739.

Venter *et al.*, 291 (5507): 1304-1351/**The Sequence of the Human Genome/** Science 16 February 2001: Vol. 291 no. 5507 pp. 1304-1351 DOI: 10.1126/science.1058040

Vera Lúcia A., et. al., **Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction/** Quím. Nova vol.28 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2005, disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>>.

Umesh et al, Disponível em; Bioinformation. 2014; 10(4): 175–179. Published online Apr 23, 2014.doi: [10.6026/97320630010175](https://doi.org/10.6026/97320630010175)

Yang, C; Bolotin, E; Jiang, T; Sladek, FM; . Martinez, E (2007) ". **Prevalência do iniciador ao longo da caixa de TATA na identificação de genes e de motivos de ADN humanas e de levedura enriquecida em TATÁ menos promotores centrais humanos"** . Gene 389 (1):. 52-65 Disponível em: <doi : [10.1016/j.gene.2006.09.029](https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.09.029) . [PMC 1.955.227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1955227/) . [PMID 17123746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17123746/)>.