Ulises Maximiliano Mancini Villagra

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES COM SPLICING ALTERNATIVO EM CÉLULAS NORMAIS E NEOPLÁSICAS



1910001624

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto De Biociências, Letras e Ciências Exatas
Pós-Graduação em Genética

Ulises Maximiliano Mancini Villagra

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES COM *SPLICING* ALTERNATIVO EM CÉLULAS NORMAIS E NEOPLÁSICAS

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva
Colaborador: Prof. Dr. Márcio Colombo

São José do Rio Pretro - SP

2003

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto De Biociências, Letras e Ciências Exatas
Pós-Graduação em Genética

Ulises Maximiliano Mancini Villagra

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES COM *SPLICING* ALTERNATIVO EM CÉLULAS NORMAIS E NEOPLÁSICAS

T. 1624/07
BIBLIOTECA

Dissertação Apresentada Para Obtenção do Título de Mestre em Genética

São José do Rio Preto - SP

2003

575.1
M269a
25/04/2007
DOAÇÃO
AUTOR(A)

O programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, passou a denominar-se Programa de Pós-Graduação em Genética pela Resolução UNESP n° RU. 10/01 de 08/03/2001, DOE 09/03/2001.

Mancini Villagra, Ulises Maximiliano.
Análise de expressão de genes com *splicing* alternativo em células normais e neoplásicas / Ulises Maximiliano Mancini Villagra – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003
-- f.142 : il. ; 30 cm.

Orientador: Eloiza Helena Tajara da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular. 2. Ácido ribonucléico. 3. Câncer. 4. Autópsia. 5. Expressão gênica. 6. *Splicing* alternativo. I. Silva, Eloiza Helena Tajara da. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.21

Ulises Maximiliano Mancini Villagra

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES COM *SPLICING* ALTERNATIVO EM CÉLULAS NORMAIS E NEOPLÁSICAS

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TITULO DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, BILCE – UNESP.

2° Examinador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr., Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Laboratório de Genética Molecular, USP.

3° Examinador: Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, BILCE – UNESP.

São José do Rio Preto, 29 / 08 / 2003

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, Campus São José do Rio Preto, sob orientação da Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva e colaboração do Prof. Dr. Márcio Colombo.

Dedico este trabalho

A meu pai
..... mi mejor amigo, mi querido viejo

À minha maravilhosa família, (*papi, mami* e *Fer*)
....un día partí en busca de mi tesoro, y fue el tiempo y la distancia que me enseñaron que él siempre había estado a mi lado

A Maria Consuelo
....y advertí que el reloj no avanzaba, presumí que era un defecto mecánico y entendí que era por mí que no pasaba el tiempo, porque siempre, siempre pensaba en ti

A Deus e à Virgem
....cada instante de mi vida

Agradecimentos

A realização do presente trabalho foi possível devido à contribuição de várias pessoas. A todos eles, meus mais sinceros agradecimentos.

À Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, pela sua inesgotável paciência para me orientar, auxiliando em cada detalhe, todo um exemplo e modelo de pesquisadora pela sua infinita capacidade intelectual, acadêmica e humana, formadora de profissionais e de recursos humanos.

Ao Prof Dr Márcio Colombo, pelas suas idéias e sugestões que contribuíram para enriquecer o trabalho desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, ao Prof. Dr. Emmanuel Dias Netto e à Profa. Dra. Elida Ojopi, pelos *primers* gentilmente cedidos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores do Projeto Genoma Humano do Câncer, especialmente ao grupo da *Head and Neck Transcriptome Initiative*.

Aos Professores do curso de Pós-Graduação do IBILCE-UNESP, por ter contribuído para minha formação acadêmica.

À Dra Paula Rahal, por seus conselhos, amizade e por enxergar com seu coração o que muitos não conseguem com seus olhos.

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto Higino Estécio, pela sua paciência, conselhos, sugestões e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Biologia e da seção de Pós-Graduação, especialmente a Simone e a Rosana, por seu atendimento sempre amável e cordial.

Aos queridos amigos do laboratório de Biologia Molecular, especialmente a Flavia, Ale Trovó, Ale Vidotto, Paola, Giovana, Janaína, Carol e Gustavo.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Ao Fabián e ao meu pequeno Rhamses, o primeiro porque, além de falar a minha língua, é um grande amigo, o segundo porque embora fale outra língua, entende de sinais e é meu porto seguro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Às Fundações CAPES e CNPq pelos auxílios concedidos ao laboratório, que contribuíram para a realização deste trabalho.

....No es la fuerza y sí la perseverancia la que hace a los hombres superiores

NIETZSCHE

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 9

Splicing do Transcrito Primário 10

Trans-splicing 18

Splicing Alternativo 18

2. OBJETIVOS 23

3. MATERIAIS E MÉTODOS 24

I. Cultivo celular de linhagens 24

II. Extração de RNA total e obtenção de cDNA por RT-PCR 25

III. Controle de qualidade do cDNA 27

IV. Amplificação do cDNA por PCR 27

V. Avaliação qualitativa e semiquantitativa da expressão gênica 30

4. RESULTADOS 36

I. Cultivo celular 36

II. Extração de RNA e obtenção de cDNA 36

III. PCR e Eletroforese 36

IV. Análise da expressão de genes com *splicing* alternativo 41

1. Autópsia, tumor e margem cirúrgica aparentemente normal 41

2. Linhagens celulares submetidas a estresse por temperatura, pressão osmótica e pH 46

5. DISCUSSÃO 67

6. CONCLUSÕES 77

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79

8. APÊNDICE I 93

9. APÊNDICE II 110

10. RESSUMO 141

11. ABSTRACT 142

unesp

Análise de Expressão de Genes com *Splicing* Alternativo em Células Normais e Neoplásicas

1. INTRODUÇÃO

Muitas moléculas de transcrito primário de bactérias e da maioria dos eucariotos não são funcionais e necessitam ser processadas após a síntese. As modificações que ocorrem no transcrito durante esse processamento incluem adição de um *cap* de 7-metilguanosina em sua extremidade 5' e clivagem e poliadenilação da extremidade 3'. Além disso, as seqüências não codificadoras (íntrons) são removidas e as seqüências codificadoras (exons) tornam-se contíguas por um mecanismo conhecido como *splicing*.

Do momento em que são sintetizados pela RNA polimerase II até serem transportados para o citoplasma, os transcritos precursores de RNA mensageiros (mRNA), conhecidos como pré-mRNAs, são imediatamente associados a um conjunto abundante de proteínas nucleares, tão numerosas quanto as histonas. Tais proteínas são os componentes principais das partículas de ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNPs), que contêm o RNA heterogêneo nuclear (hnRNA), um termo utilizado para o pré-mRNA e para outros RNAs nucleares (Dreyfuss *et al.*, 1993).

A diversidade das proteínas hnRNPs sugere que elas possuem várias funções. Por exemplo, algumas interagem com as seqüências do RNA relacionadas com *splicing* e poliadenilação e contribuem para o processamento do transcrito. Outras são cíclicas no núcleo e no citoplasma e podem operar no transporte do mRNA. A maioria delas possui uma estrutura modular e apresenta um ou mais domínios de reconhecimento e ligação ao RNA, denominados RRM ou RBD (*RNA recognition motif* ou *RNA binding domain*) e pelo menos um domínio de interação com outras proteínas. O domínio RRM é identificado por dois segmentos de oito e seis aminoácidos separados por aproximadamente 30 resíduos, denominados RNP-1 e RNP-2, respectivamente. O número desses domínios é variável. Por exemplo, as

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

hnRNP L, M e I (essa última também denominada proteína ligadora de seqüência de polipirimidina ou PTB) possuem quatro domínios RNPs; a hnRNP-A/B possui dois RNPs e um domínio auxiliar rico em glicina e a hnRNP-C possui apenas um RNP (Varani & Nagai, 1998).

Splicing do Transcrito Primário

Na espécie humana, a maioria dos exons contém cerca de 150 nucleotídeos enquanto os íntrons possuem em média 3.500 pb e podem atingir até 500 Kb (Rowen *et al.*, 2002). Os íntrons possuem seqüências consenso curtas, algumas das quais parecem ser absolutamente imprescindíveis para o processamento do RNA. As mais conservadas estão presentes nas extremidades 5' e 3', denominadas sítios de *splicing* doador e aceptor, respectivamente. Em vertebrados, o sítio 5' apresenta um par de nucleotídeos GU enquanto o 3' está definido pelo par AG. Em mamíferos, o consenso do sítio doador é $^{-2}$AG↓GUPuAGU^{+6} enquanto o do sítio aceptor é $^{-4}$NPyAG↓PuN^{+2}, sendo a seta representativa da junção exon-íntron e as bases sublinhadas correspondentes aos resíduos mais conservados. Outras duas regiões próximas ao sítio aceptor também são importantes (Figura 1): uma seqüência de aproximadamente 15 nucleotídeos rica em pirimidinas (PTT) e uma seqüência de sete a oito bases (CUPuAPy) na qual a penúltima delas, nos vertebrados, é uma adenina (Goldstrohm *et al.*, 2001). Apesar dessa última seqüência ser de grande importância, é comum encontrá-la ausente, situação que não dificulta o processamento normal do RNA. Nesses casos, a maquinaria de *splicing* procura um outro resíduo A na região 3' e, eventualmente, utiliza também sítios doadores e aceptores alternativos quando as seqüências normais encontram-se alteradas por mutações (Lodish *et al.*, 2000; Lewin 2000).

Existem quatro classes de íntrons, sendo as duas primeiras (I e II) observadas em genes nucleares de protozoários e em genes de organelas (mitocôndrias e cloroplastos) de plantas e fungos. Os mecanismos de 'auto-*splicing*' nesses grupos



ocorrem sem a utilização de enzimas ou de um cofator de alta energia, como o ATP (Figura 2) e as seqüências de reconhecimento não apresentam conservação elevada, como nos íntrons III e IV. Entretanto, a estrutura secundária típica que adotam é de suma importância para o correto processamento do transcrito. O *splicing* do grupo I requer um cofator (guanosina, GMP, GDP ou GTP) cuja hidroxila 3' é utilizada como nucleófilo no primeiro passo da reação. Essa hidroxila forma uma ligação 3',5'-fosfodiéster com a extremidade 5' do íntron. A hidroxila 3' do exon liberado nesse passo atua agora como nucleófilo em uma reação semelhante com a extremidade 3' do íntron (Lodish *et al.*, 2000).

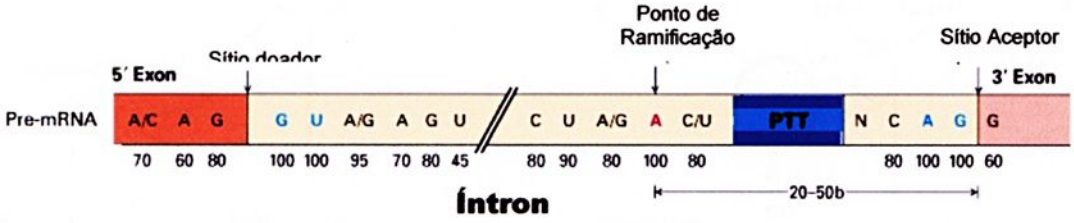


Figura 1. Diagrama das seqüências consenso nas regiões intrônicas importantes para o mecanismo de *splicing* em vertebrados: GU e AG nos extremos 5' e 3' dos íntrons, respectivamente; região rica em pirimidina (PTT); adenosina (ponto de ramificação), geralmente localizada entre -20 e -50 bases do sítio de *splicing* 3'. Modificado de Lodish (2000).

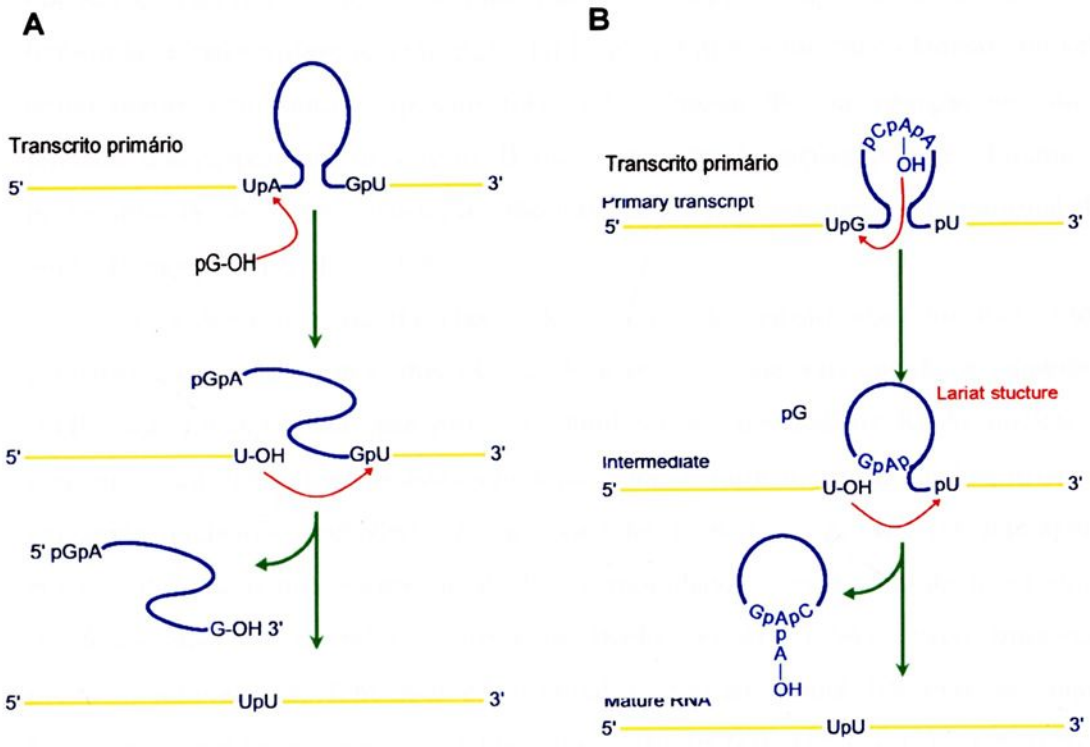


Figura 2. Mecanismo de *splicing* de íntrons do grupo I (A) e II (B). Modificado de Nelson & Cox (2000).

No grupo II, o padrão de *splicing* é similar, exceto pelo nucleófilo do primeiro passo que, nesse caso, é a hidroxila 2' de um resíduo A intrônico. No final, uma estrutura denominada *lariat** é formada como um composto intermediário (Nelson & Cox, 2000). Aparentemente, para que as interações na estrutura tridimensional dos íntrons II aconteçam, é necessário um grupo de proteínas denominadas maturases, que se ligam ao RNA concedendo estabilidade. As maturases apresentam um domínio homólogo à transcriptase reversa, permitindo que o íntron atue como elemento móvel, como ocorre com retrotransposons não virais. Apesar de sua inserção em outra unidade transcripcional, os íntrons II não provocam mutações porque, durante o processamento do RNA hospedeiro, são eliminados pelo seu mecanismo normal de auto-*splicing* (Lodish et al., 2000).

A terceira e a quarta classe de íntrons são encontradas em transcritos primários nucleares e em certos tRNAs de leveduras, respectivamente, e requerem ATP para *splicing*. Para esse processo, também são necessários RNAs nucleares pequenos (snRNAs), que se associam a proteínas e formam as ribonucleoproteínas pequenas nucleares (snRNPs). Os componentes protéicos das snRNPs interagem entre si durante o processamento do RNA, modulando e estabilizando a estrutura tridimensional dos complexos formados (Kohtz *et al.*, 1994). Essas proteínas possuem similaridade funcional e estrutural às proteínas hnRNPs mas são mais homogêneas e estáveis. São conhecidas cinco snRNPs (U1, U2, U4, U5 e U6) e 50 a 100 fatores de *splicing* não-snRNPs (Kramer, 1996).

O *splicing* dos transcritos primários de mRNA é, de forma geral, semelhante ao dos íntrons II (Figura 3). Na sua fase inicial, ocorre uma série de reações de pareamento de bases entre as snRNPs e as seqüências consenso do transcrito levando à formação do *spliceosome*. Esse grande complexo ribonucleoprotéico cataliza duas reações de transesterificação que resultam na excisão de um íntron e na reunião de dois exons. Nesse processo, a hidrólise de ATP não é necessária para a transesterificação, mas acredita-se ser importante para os rearranjos que ocorrem no complexo.

**lariat:* nome decorrente da semelhança dessa estrutura com o laço utilizado para laçar animais.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

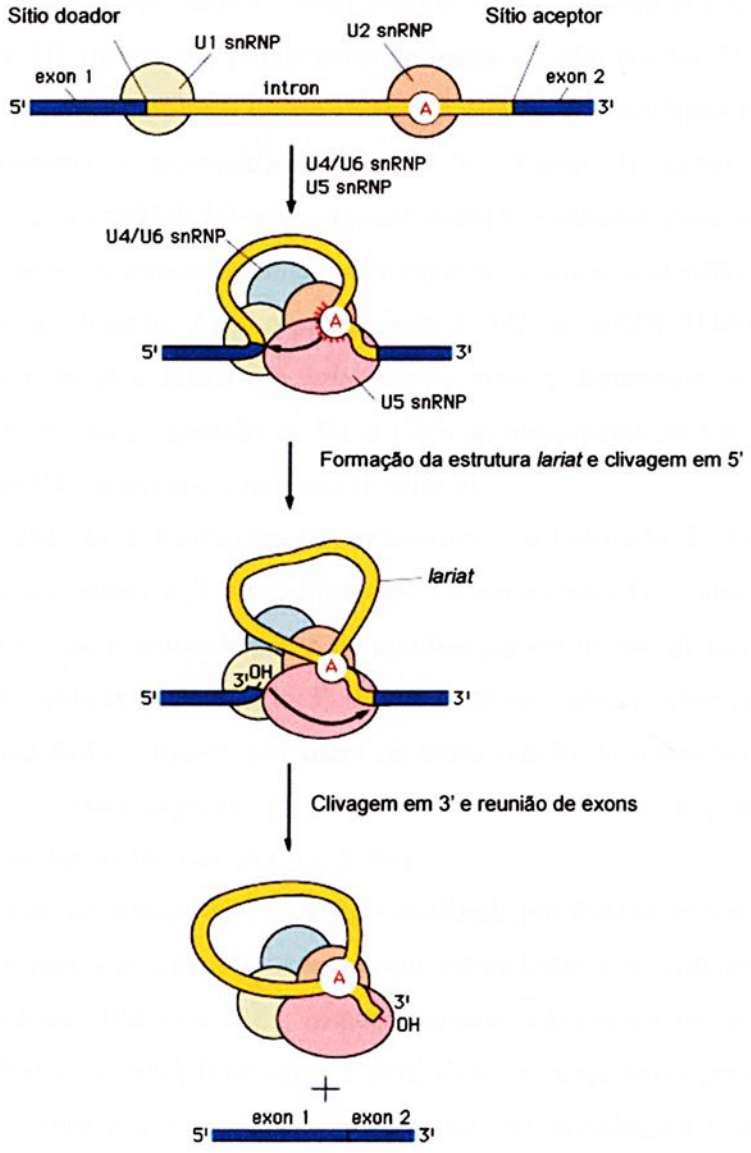


Figura 3. Mecanismo de *splicing* em transcritos primários de mRNA. Modificado de Alberts *et al.* (1994).

A montagem do *spliceosome* tem início com a formação do complexo E (*early complex*), comumente chamado de complexo de compromisso (CC) porque sua presença identifica um pré-mRNA comprometido com o *splicing* (Figura 4). Nessa etapa, a snRNP U1 liga-se por pareamento de bases ao sítio doador 5' enquanto o fator de *splicing* U2AF une-se à região interna do íntron (denominada Py), rica em pirimidinas, próxima à extremidade aceptora 3'. Tanto U1 como U2AF são necessárias para que a snRNP U2 inicie o pareamento à seqüência consenso intrônica, cujo penúltimo resíduo, uma adenosina, irá comportar-se como nucleófilo na primeira reação de transesterificação. Após o pareamento de U2, as snRNP U4/U6 e U5 são recrutadas para o local e formam e *spliceosome* inativo. Rearranjos internos, que consomem ATP, levam à expulsão de U1 e U4 e ao pareamento de U6 com o sítio doador 5' e com U2, ativando o complexo (Figura 5).

Acompanhando a montagem do *spliceosome*, a hidroxila 2' da adenosina intrônica forma um enlace 2',5' fosfodiéster com o nucleotídeo G do sítio doador 5'. Essa adenosina recebe o nome de ponto de ramificação em função de sua posição na estrutura *lariat* formada. A hidroxila 3' do nucleotídeo exônico livre comporta-se, então, como nucleófilo e liga-se por meio de outra reação de transesterificação ao nucleotídeo 5' do exon seguinte (Figura 6). O íntron liberado é posteriormente degradado por nucleases (Nelson & Cox, 2000).

A regulação do processo de *splicing* é realizada por fatores transativantes que reconhecem elementos positivos (*enhancers* ou estimuladores de *splicing* presentes em exons ou íntrons, ESEs ou ISEs, respectivamente) e/ou negativos (*silencers* ou silenciadores, ESSs ou ISSs) (Graveley, 2000). Entre as seqüências potencialmente reguladoras presentes nos íntrons, já identificadas por abordagens bioquímicas e computacionais (Brudno *et al.*, 2001), estão o hexanucleotídeo UGCAUG, o motivo (A/U) GGG, as repetições CUG, a seqüência UCAY (elementos positivos) e as seqüências CUCUCU, UUCUCU e UCUU (elementos negativos).

unesp

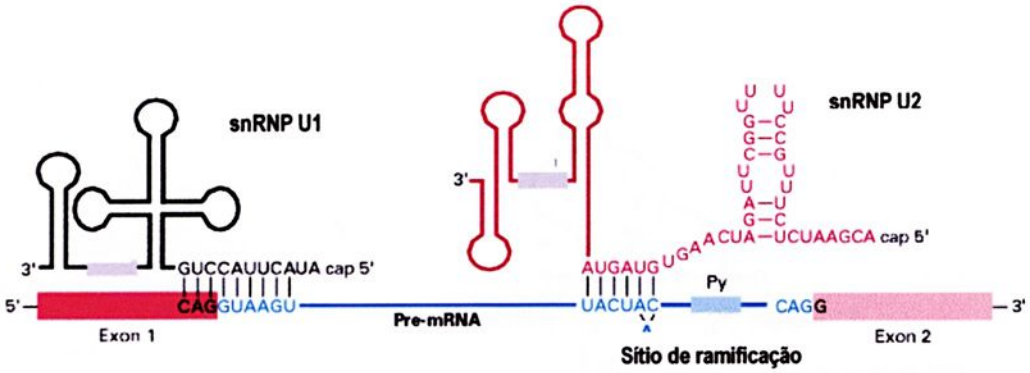


Figura 4. Interações entre o pré-mRNA e as snRNPs U1 e U2, na etapa inicial do processo de *splicing*. A região 5' de U1 inicia o pareamento de bases com os nucleotídeos do extremo 5' do íntron e com o extremo 3' do exon e U2 pareia com a seqüência próxima ao sítio de ramificação A. Modificado de Lodish (2000).

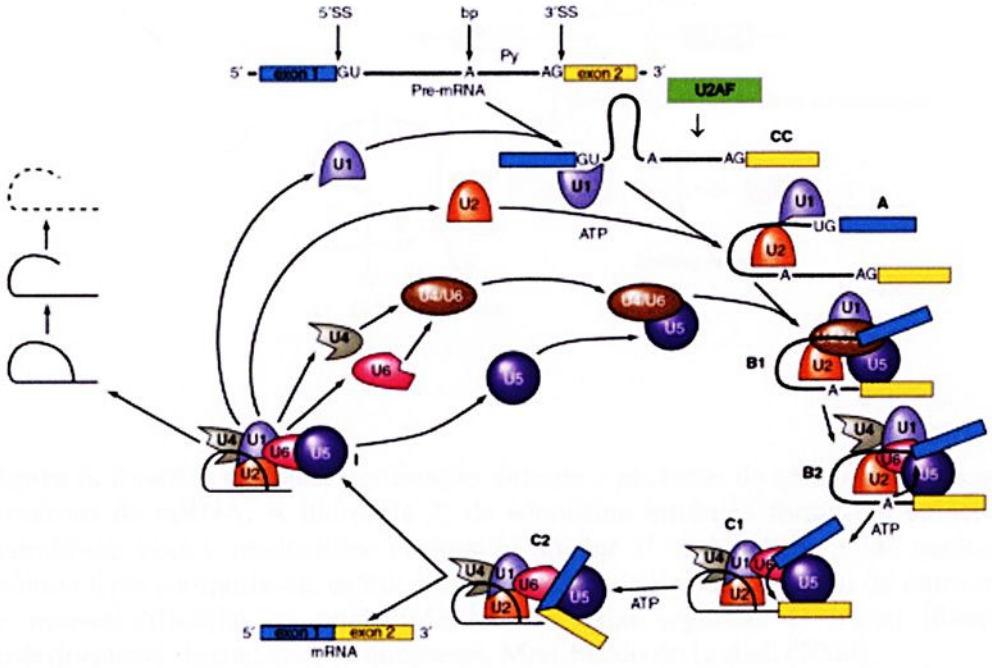


Figura 5. Montagem do *spliceosome*. O processo tem início com a ligação da U1 ao sítio doador 5' e da U2 com o sítio de ramificação. Em seguida, as snRNP U4/U6 e U5 são recrutadas para o local e formam e *spliceosome* inativo. Rearranjos internos, que consomem ATP, levam ao pareamento de U6 com o sítio doador 5' e com U2, ativando o complexo. Modificado de Lodish (2000).

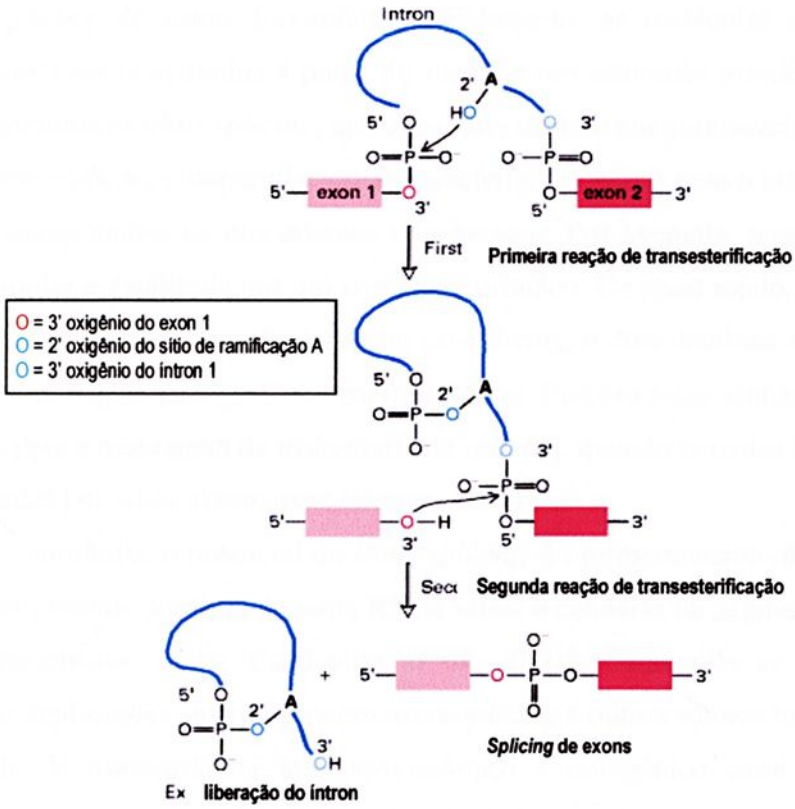


Figura 6. Reações de transesterificação durante o processo de *splicing* em transcritos primários de mRNA. A hidroxila 2' da adenosina intrônica forma um enlace 2',5' fosfodiéster com o nucleotídeo G do sítio doador 5'. A hidroxila 3' do nucleotídeo exônico livre comporta-se, então, como nucleófilo e liga-se por meio de outra reação de transesterificação ao nucleotídeo 5' do exon seguinte. O íntron liberado é posteriormente degradado por nucleases. Modificado de Lodish (2000).

Trans-splicing

Potencialmente, todas as moléculas de mRNA nas células de vertebrados e de insetos são derivadas de uma simples molécula de pré-mRNA por remoção interna de íntrons e *splicing* de exons (*cis-splicing)*. Entretanto, as moléculas de mRNAs também podem ser construídas a partir de mais de um transcrito primário, em um processo denominado *trans-splicing*, que é bastante comum em protozoários.

O *trans-splicing* compartilha várias características gerais com o *cis-splicing*, o que indica serem ambos os mecanismos relacionados. Por exemplo, a seqüência de eventos é similar e catalisada por um complexo protéico. De igual modo, alguns dos elementos de reconhecimento são, como no *cis-splicing*, o dinucleotídeo AG no sítio 3' aceptor e uma região contígua, rica em pirimidinas. Embora essas seqüências sejam importantes para a montagem da maquinaria de *splicing*, quando ausentes ou mutadas são substituídas por sítios alternativos (Bonen, 1993).

Nos mamíferos, o potencial do *trans-splicing* foi primeiramente observado *in vitro* e posteriormente confirmado entre RNAs virais e celulares de células infectadas (Eul & Graessmann, 1995; Caudevilla *et al.*, 2001). Caudevilla *et al.* (1998) descreveram duplicações com origem em *trans-splicing* e outros autores levantaram a possibilidade de *trans-splicing* intercromossômico e intergênico entre transcritos codificados por genes altamente relacionados (Fujieda *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1999).

É importante citar que em todos os exemplos já descritos de *trans-splicing* em mamíferos também é referido *cis-splicing*. Portanto, é possível que o primeiro represente um "ruído" resultante de baixos níveis de pareamento entre sítios de *splicing* de pré-RNAs diferentes (Maniatis & Tasic, 2002).

***Splicing* Alternativo**

O tamanho do proteoma de um organismo (conjunto completo de proteínas expressas pelo genoma) pode ser expandido durante a evolução por aumento no número de genes e pela utilização de mecanismos que geram diversidade protéica. Entre os principais processos que geram essa diversidade nos eucariotos, estão a

unesp

utilização de diferentes sítios de início de transcrição e de poliadenilação, as modificações no padrão de edição do mRNA ou no padrão pós-traducional e o *splicing* alternativo. Não há dúvidas de que esse último é o principal mecanismo gerador de diversidade protéica em vertebrados (Black, 2000).

Após a descoberta de exons e íntrons (Sambrook, 1977), Gilbert (1978) foi o primeiro a propor que diferentes combinações de exons poderiam levar a isoformas distintas a partir de um mesmo gene. No início da década de 80, o *splicing* alternativo foi observado em vários genes (Early *et al.*, 1980; Rogers *et al.*, 1980) e, mais recentemente, seus mecanismos reguladores foram descritos (Lopez, 1998; Smith *et al.*, 2000). Esse processo tem sido citado para explicar a disparidade entre o pequeno número de genes na espécie humana (cerca de 30 mil), sugerido pelo seqüenciamento do seu genoma (Venter *et al.*, 2001; Lander *et al.*, 2001), e a complexidade observada em relação a outros organismos com número de genes próximo a esse, como o *Caenorhabditis elegans* (*The C. elegans Sequencing Consortium***, 1998). Tem sido estimada uma porcentagem entre 35 e 59% de genes na espécie humana com *splicing* alternativo, mas como esse valor foi calculado com base no número de ESTs analisadas, muito provavelmente ele está subestimado (Modrek & Lee, 2002).

A contribuição do *splicing* alternativo na diversidade protéica pode ser avaliada pelo gene *Dscan* de *Drosophila*, que codifica uma proteína de membrana em neurônios. Seu pré-mRNA pode gerar mais de 38 mil isoformas, um número superior ao dobro de genes da *Drosophila* (Schmucker *et al.*, 2000). Outro exemplo é o gene *Slo* de mamíferos, que tem potencial para originar 500 isoformas (Graveley, 2001).

Existem quatro tipos básicos de *splicing* alternativo (Figura 7): (a) a forma mais comum na qual ocorre a remoção ou não do íntron, (b) a utilização de sítio intrônico 5' alternativo levando a mudança no comprimento do exon, (c) a utilização de sítio 3' alternativo também levando a mudança no comprimento do exon, (d) a forma mais complexa na qual ocorre a inclusão ou a exclusão/*skipping* de um exon (Goldstrohm *et al.*, 2001).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Um grupo importante de proteínas que modula a escolha do sítio de *splicing* é o das proteínas SR. Embora, esse grupo corresponda a uma família de fatores que possuem um ou dois domínios RRMs no terminal amino e um domínio rico em dipeptídeos arginina-serina no terminal carboxila, o termo proteína SR refere-se a apenas oito polipeptídios com 20 a 75 Kda que estão presentes em todos os eucariotos, exceto em leveduras, nas quais o *splicing* alternativo verdadeiro não ocorre (Varani & Nagai, 1998).

Tipos Básicos de *Splicing* Alternativo

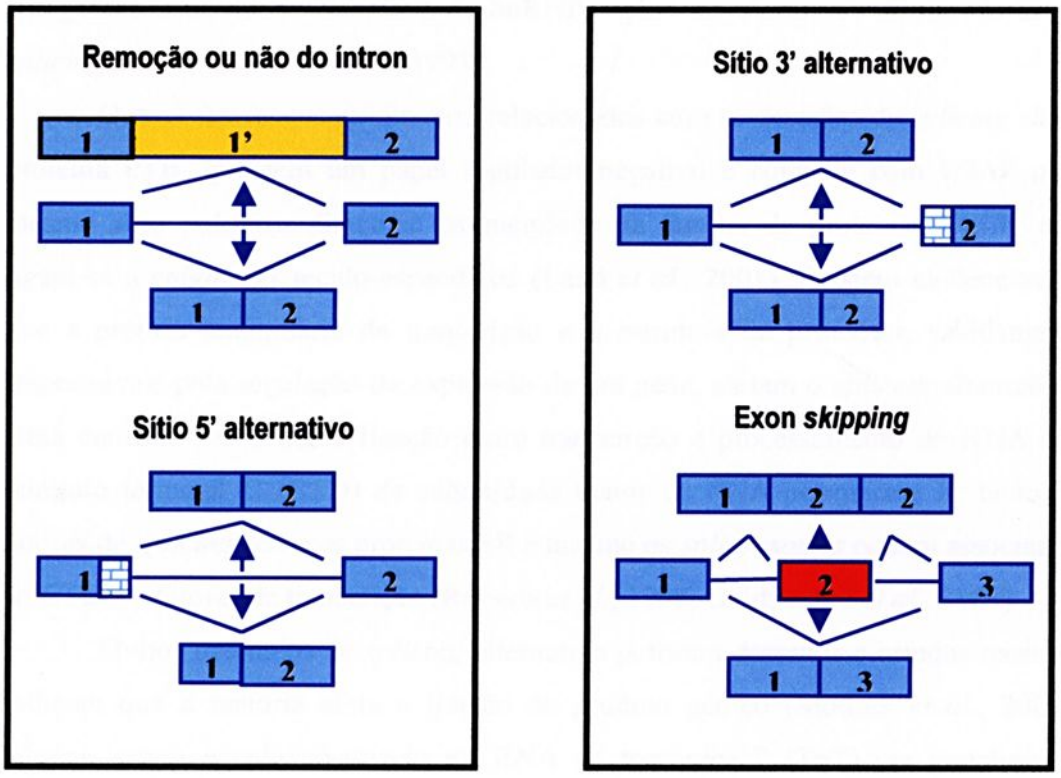


Figura 7. Tipos básicos de *splicing* alternativo. (a) a forma mais comum na qual ocorre a remoção ou não do íntron, (b) a utilização de sítio 5' alternativo levando a mudança no comprimento do exon, (c) a utilização de sítio 3' alternativo também levando a mudança no comprimento do exon, (d) uma forma mais complexa na qual ocorre a inclusão ou a exclusão/*skipping* de um exon. Modificado de Goldstrohm *et al.*, 2001.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

As interações entre as proteínas SR e os pré-mRNAs são críticas para a decisão de *splicing* (Fu, 1993; Tacke & Manley, 1997). Algumas dessas proteínas, em concentrações elevadas, resultam na seleção dos sítios de *splicing* 5' proximais, em pré-mRNAs que contêm dois ou mais desses sítios. Outras, como a hnRNP A/B, mostram efeitos opostos, promovendo a seleção do sítio 5' distal (Cáceres & Kornblihtt, 2002).

As proteínas SR podem ligar-se a ESEs (regiões estimuladoras de *splicing*) e parecem promover o recrutamento do fator U2AF para a seqüência polipirimidínica, levando à ativação de sítios 3' adjacentes. É possível também que essa ligação antagonize a atividade inibidora de hnRNPs sobre os elementos silenciadores de *splicing* ESSs (Wu & Maniatis, 1993).

Outros fatores provavelmente relacionados com as decisões de *splicing* são a proteína PTB, que tem um papel regulador negativo e compete com U2AF pelo mesmo sítio polipirimidínico, e os membros da família de proteínas CELF, que ligam-se a *enhancers* tecido-específicos (Ladd *et al.*, 2001). Existem evidências de que a própria maquinaria de transcrição e a estrutura do promotor, sabidamente responsáveis pela regulação da expressão de um gene, afetam o *splicing* alternativo. Uma conexão física dessa ligação entre transcrição e processamento do RNA é o domínio terminal C (CTD) da subunidade maior da RNA polimerase II: tanto os fatores de *splicing* como as proteínas SR e mesmo os *spliceosomes* podem associar-se ao CTD e a fatores de transcrição (Roberts *et al.*, 1998; Goldstrohm *et al.*, 2001).

Muitos exemplos de *splicing* alternativo já foram descritos e estudos recentes indicam que a maioria afeta a função do produto gênico (Modrek *et al.*, 2001). Alguns, como aquele observado no RNA da troponina-T (TnT) em vertebrados, resultam em isoformas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento ou em tipos celulares distintos (Bucher *et al.*, 1999). Outros parecem participar da transformação maligna. Recentemente, Moyret-Lalle *et al.* (2001) observaram, em linhagens tumorais, que a ativação do gene supressor de tumor *TP53* após estresse por radiação estava relacionada com a modulação do *splicing* de transcritos do gene

unesp

TSG101. É interessante que a expressão do gene *TP53* é regulada por um mecanismo de retroalimentação negativa pelo produto do oncogene *MDM2* (Momand *et al.*, 1992; Oliner *et al.*, 1993), cujo RNA também exibe *splicing* alternativo (Lukas *et al.*, 2001).

Mudanças no padrão de *splicing* são observadas por ação de diferentes estímulos, como inibidores de proteassomos, espécies reativas de oxigênio, agentes que perturbam a homeostasia do cálcio, inibidores de N-glicosilação, citosinas pró-inflamatórias, estresse hormonal e estresse mecânico (Yang *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.* 2002; McCobb *et al*, 2003). Hashimoto et al. (2002), utilizando diferentes estímulos, observaram a síntese de isoformas distintas do fator de transcrição ATF3, cuja expressão elevada é observada em várias condições fisiopatológicas e em diversos tipos de câncer (Chen *et al.*, 1994; Ishiguro *et al.*, 1996; Pimkhaokham, *et al.*, 2000).

Mutações localizadas nas regiões não codificantes, tais como as que afetam o sítio de ramificação, os sítios de *splicing* 5' e 3' ou a seqüência polipirimidínica, podem trazer importantes conseqüências para o produto gênico e resultar em isoformas não funcionais (Maquat & Carmichael, 2001; Cáceres e Kornblihtt, 2002). Acredita-se que essas alterações sejam responsáveis por aproximadamente 15% das mutações que provocam doenças genéticas (Krawczak *et al.*, 1992). Os polimorfismos sinônimos de nucleotídeos simples localizados em regiões codificantes (cSNPs), embora aparentemente silenciosos, devem igualmente influenciar o *splicing* alternativo, criando ou rompendo *enhancers* ou silenciadores exônicos e levando a mudanças no padrão de expressão das isoformas de um gene (Cáceres *et al.*, 2002; Kornblihtt *et al.*, 2002).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

2. OBJETIVOS

Como pode ser deduzido da exposição acima, o *splicing* alternativo é um dos principais mecanismos que levam à diversidade protéica nos vertebrados e sua alteração, causada por fatores endógenos ou exógenos, pode ter importantes conseqüências para o organismo. O presente trabalho teve como objetivo geral estudar o *splicing* alternativo em células normais e neoplásicas. Além de sua análise em diferentes tecidos, foi investigado o papel de fatores físicos e físico-químicos sobre esse processo em linhagens celulares. Os objetivos específicos do trabalho compreenderam:

1) Analisar a expressão de genes com *splicing* alternativo em tecidos de autópsia, biópsia ou material cirúrgico, procedentes de tecidos normais ou neoplásicos.

2) Analisar o efeito de condições de hipertermia (40°C) e de hipotermia (17°C e 5°C) sobre a expressão de genes com *splicing* alternativo em linhagens celulares procedentes de mucosa neoplásica.

3) Analisar o efeito de choque ácido sobre a expressão de genes com *splicing* alternativo em linhagens celulares procedentes de mucosa neoplásica.

4) Analisar o efeito de condições isotônicas e hipertônicas sobre a expressão de genes com *splicing* alternativo em linhagens celulares procedentes de mucosa neoplásica.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS:

No presente trabalho, foi analisada a expressão de genes com *splicing* alternativo em 27 amostras de autópsia, biópsia ou material cirúrgico, procedentes de tecidos normais ou neoplásicos de laringe, língua e tonsila. O material de autópsias foi retirado 6h após a morte de pacientes não portadores de doenças malignas.

Para análise do efeito de fatores físicos e físico-químicos sobre a expressão de genes com *splicing* alternativo, foram estudadas quatro linhagens celulares ATCC (Manassas, Virgínia), uma de carcinoma espinocelular de faringe (Fadu/HTB-43), uma de carcinoma espinocelular de laringe (HEp-2/CCL23), uma de adenocarcinoma cervical (HeLa/CCL-2) e uma de carcinoma de células escamosas de colo de útero (Siha/HTB-35), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Otávia Luisa S. Dammas de Caballero, Instituto Ludwig, SP.

MÉTODOS:

I. Cultivo celular de linhagens

As linhagens celulares foram descongeladas e colocadas em garrafas de cultura de 75mL contendo meio MEM EARLE (Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 100mM de piruvato de sódio, 100 unidades/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Cultilab), sendo mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2. Após um período de 24h, que permite a fixação das células na garrafa de cultura, o meio foi trocado para retirada completa do DMSO presente na solução de congelamento. O meio foi, então, substituído a cada três dias e o crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido. Quando a densidade celular mostrava-se próxima ao estado de confluência, o material dos frascos foi tripsinizado com solução de tripsina/EDTA (Cultilab) e subdividido em quatro réplicas. Os passos anteriores

foram repetidos até que fosse obtido o número de garrafas necessário para cada tratamento.

Os experimentos para estudo do efeito de fatores físicos e físico-químicos sobre a expressão gênica foram realizados antes da confluência completa e em duplicata para cada condição considerada e para seus respectivos controles. Nesses experimentos, foram induzidas mudanças de pH, pressão osmótica e temperatura por diferentes períodos de tempo, referidas como choque ácido, choque osmótico e choque térmico, respectivamente.

Choque Ácido. Para choque ácido, as células foram submetidas, imediatamente após a troca do meio, a uma atmosfera com CO_2 10% por 24h e 72h. As respectivas garrafas controles foram mantidas a 37°C em atmosfera de CO_2 5% por 24h e 72h. O pH do meio foi rigorosa e repetidamente checado a cada 6h.

Choque Osmótico. Para choque osmótico, as culturas foram alimentadas com meio MEM completo contendo glicerol 0,4M e 0,8M (soluto eletricamente neutro) enquanto os respectivos controles foram mantidos em ausência desse soluto. A solução de glicerol foi devidamente esterilizada em unidades filtrantes estéreis descartáveis de 0,22µm (Millex-GP, Millipore) e adicionada gradualmente ao meio. O bloqueio das culturas foi efetuado duas ou cinco horas após iniciado o experimento.

Choque Térmico. Para choque térmico, as linhagens celulares foram submetidas, após a troca do meio, a temperaturas de 17°C ou 5°C por períodos de 64 h, ou a 39-40°C por aproximadamente 3h. Os controles foram mantidos por períodos idênticos a 37°C.

II. Extração de RNA total e obtenção de cDNA por RT-PCR

A extração de RNA e a síntese de DNA complementar (cDNA) seguiram a técnica descrita por Sambrook & Russell (2001) com modificações.

No caso das culturas, o meio celular foi descartado logo após o término do experimento e as células foram tratadas com TRIzol (solução de extração de RNA, Life Technologies, Grand Island, NY). Os restos celulares na massa gelatinosa assim obtida foram transferidos para tubos de centrífuga de 15mL e colocados em geladeira por um período aproximado de cinco dias para uma melhor extração do RNA. No caso de tecidos de autópsia, biópsia e material de cirurgia, as amostras receberam 3-5mL de TRIzol e, dependendo do seu tamanho, foram imediatamente desagregadas com emprego do PolyTron e mantidas em repouso por 5 minutos.

Após o tratamento com TRIzol, 1mL do lisado foi transferido para um tubo *eppendorf* de 1,5mL contendo 400µL de clorofórmio. O material foi homogeneizado por inversão durante 30 segundos, incubado por 3 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Após centrifugação, a fase superior aquosa, com RNA, foi transferida para outro tubo *eppendorf* de 1,5mL e recebeu 600µL de isopropanol para precipitação do RNA. A solução foi homogeneizada e mantida a –20°C por 6 a 20h. Após centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C e descarte do sobrenadante, foram adicionados 500µL de etanol 75% ao *pellet*. O material foi novamente homogeneizado e centrifugado com velocidade e tempo descritos na etapa anterior, o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi colocado em centrífuga a vácuo por 10 minutos para secagem. Foram adicionados 20-50µL de água livre de nucleases em cada tubo (dependendo do tamanho do sedimento) e a solução foi incubada por 10 minutos a 65°C. Os RNAs foram imediatamente estocados a -80°C.

Para quantificação, o RNA foi avaliado por espectrometria e em gel de agarose 1%, posteriormente corado com brometo de etídio. Uma vez avaliada a sua qualidade pela presença das duas bandas ribossômicas 18S e 28S, o RNA foi transcrito a cDNA utilizando-se os kits comerciais ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies) e SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase

unesp

(Invitrogen Life Technologies) com *primers* oligo-dT. Até três cDNAs (I, II e III) foram obtidos em momentos diferentes a partir do mesmo RNA.

III. Controle de qualidade do cDNA

Para análise qualitativa do cDNA, foi realizada amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de fragmentos dos genes *GAPDH* e *TP53*, que serviram de controle para transcritos abundantes e raros, respectivamente. Os *primers*, cuja seqüência está descrita abaixo, geraram produtos de amplificação com 305pb (*GAPDH*) e 340pb (*TP53*).

GAPDH	***TP53***
5' CTGCACCACCAACTGCTTA	5'GGAGGAGCCGCAGTCAGA
5' CATGACGGCAGGTCAGGTC	5'CAAGAAGCCCAGACGGAAAC

IV. Amplificação do cDNA por PCR

Para avaliação do efeito de pH, pressão osmótica e temperatura sobre a expressão gênica, foram estudados 32 genes que exibem *splicing* alternativo (Tabela I). Esses genes foram selecionados a partir da análise de ORESTES procedentes de tumores de cabeça e pescoço pelo grupo *Head and Neck Transcriptome Initiative* (www.lge.ibi.unicamp.br/cancerhn/) e por outros grupos do projeto Genoma Humano do Câncer (FAPESP/Instituto Ludwig).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Tabela I. Categoria funcional de 32 genes com *splicing* alternativo selecionados no presente projeto.

Gene	Categoria*
AF5Q31 *(ALL1 fused gene from 5q31)*	Regulador da transcrição
BIRC6 *[baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)]*	Morte celular
CAD *(carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase)*	Biosíntese de pirimidinas
CCNL1 *(Cyclin L ania-6a)*	Ciclo celular
COL7A1 *(Collagen, type VII, alpha 1)*	Matriz extracelular, membrana, citoesqueleto
CSDA *(cold shock domain protein A)*	Regulador da transcrição
DGKD *(diacylglycerol kinase, delta 130kDa)*	Transdutor de sinal
DHX15 *[(PDE5A) phosphodiesterase 5A, cGMP-specific]*	Regulador intracelular
DKFZp434O0213 *[(LOC 91355: hypothetical protein)]*	Proteína hipotética
E2F5 *(transcription factor 5, p130- binding)*	Ciclo celular
EMS1 *[ems1 sequence (mammary tumor and squamous cell carcinoma-associated (p80 85 src substrate)]*	Adesão celular e processos apoptóticos
ERAL1 *[(HERA-B) Era G-protein-like 1]*	Transdutor de sinal
EWSR1 *(Ewing sarcoma breakpoint region 1)*	Regulador da transcrição
FN1 *(fibronectin 1)*	Adesão e migração celular
FUS *(fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma)*	Regulador da transcrição
MKNK1 *(MAP kinase-interacting serine threonine kinase1)*	Transdutor de sinal
N33 *(putative prostate cancer tumor suppressor)*	Proteína de membrana
NUP54 *(nucleoporin 54kD)*	Transporte núcleo -citoplasma
PDCD8 *(PDCD8: programmed cell death 8 apoptosis-inducing factor)*	Morte celular
PDXK *[pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase]*	Metabolismo dos carboidratos
PFDN5 *(Prefoldin 5)*	Regulador da transcrição
PTK2*(protein tyrosine kinase 2)*	Adesão celular
RIPK2 *[(RICK) receptor-interacting ser-thr kinase 2]*	Transdutor de sinal e apoptose
RSN *(Restin Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)*	Regulador do citoesqueleto
SMARCB1 *(SWI SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, mb 1)*	Regulador da transcrição
TLE2 *(transducin-like enhancer of split 2*	Transdutor de sinal
TPR *[translocated promoter region (to activated MET oncogene)]*	Transporte
TRIP11 *(thyroid hormone receptor interactor 11)*	Regulador da transcrição
TRRAP *(transformation / transcription domain-associated protein)*	Transdutor de sinal
TSPAN *(tetraspan)*	Transdutor de sinal
Tucan *(Tumor up-regulated CARD-containing antagonist of caspase 9)*	Morte celular
VAV2 *(vav 2 oncogene)*	Transdutor de sinal

*Dados obtidos a partir do endereço eletrônico http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

No estudo realizado pelo grupo *Head and Neck Transcriptome Initiative*, uma iniciativa de 50 pesquisadores do Estado de São Paulo, foram utilizadas ferramentas de Bioinformática e anotação manual para definir um conjunto de marcadores candidatos da tumorigênese de cabeça e pescoço. A estratégia empregada foi a criação de um banco de dados com seqüências produzidas no Projeto Genoma Humano do Câncer, a filtragem desses dados para eliminação de segmentos com baixa qualidade e contaminantes e, em seguida, a clusterização das seqüências e o agrupamento de *contigs*. Durante o processo de anotação, foram selecionados genes com formas potencialmente novas de *splicing*, algumas das quais foram validadas pelo grupo utilizando a técnica de RT-PCR em cDNA de tecidos de cabeça e pescoço. Além desses, outros genes foram selecionados por pesquisadores que trabalharam no Jamborestes do Projeto Genoma Humano do Câncer e analisados detalhadamente pela Dra. Janet Kelso (National Bioinformatic Institute – University of the Western Cape, South Africa).

Os *primers* para análise da expressão gênica de 28 desses genes foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Emmanuel Dias Netto e pela Profa Dra. Elida Ojopi (Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisa, USP, SP) e pelo Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior (Hemocentro, USP, Ribeirão Preto). Os *primers* para avaliação dos outros quatro genes (Tabela II), foram desenhados em nosso laboratório utilizando o *software* Primer3, disponível no endereço eletrônico http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi.

A figura 8 mostra a estratégia utilizada no desenho dos *primers* para detecção, após PCR, de isoformas correspondentes aos tipos de *splicing* esperados. Na Figura 9, está esquematizado o gel de eletroforese para produtos de amplificação em caso de exon *skipping*.

A PCR foi processada em volume de 25μL, contendo 100 a 500ng de cDNA, Tris-HCl-KCl 10mM (pH 8.3), $MgCl_2$ 2mM, dNTPs 200μM (dATP, dCTP, dGTP,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

dTTP), 25pmol de cada *primer* e 1U de Taq DNA polimerase. Todas as reações foram efetuadas com um controle de contaminação sem cDNA.

Os programas de PCR variaram de acordo com a temperatura de anelamento de cada par de *primers*. A reação 'consenso' compreendeu uma primeira etapa de 5 minutos a 94°C e 30 a 35 ciclos de 50 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 40 segundos para anelamento dos *primers* em temperaturas de 47°C a 61°C e 50 a 60 segundos a 72°C para extensão das cadeias, além de 10 minutos a 72°C para extensão final.

Alguns fragmentos amplificados que apresentaram tamanho diferente do esperado na eletroforese foram seqüenciados no seqüenciador automático ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems), segundo protocolos padronizados no laboratório.

V. Avaliação qualitativa e semiquantitativa da expressão gênica

Para avaliação da expressão diferencial de isoformas resultantes de *splicing* alternativo, foram realizadas reações de PCR com variação no número de ciclos. Como controles, também foram amplificados com diferentes ciclagens segmentos dos genes *GAPDH* e *TP53* a partir do mesmo cDNA. Para cada gene, foram realizados testes iniciais que permitiram a definição do número de ciclos necessário para obtenção do produto na fase exponencial da reação de amplificação. Nessa fase, ao contrário da fase de *plateau*, a concentração do amplificado é correspondente à concentração do DNA molde.

A reação foi processada de forma semelhante àquela descrita no item IV. Compreendeu uma primeira etapa de 5 minutos a 94°C e 35, 28 ou 21 ciclos de 50 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 40 segundos para anelamento dos *primers* em temperaturas de 47 a 61°C e 50 segundos a 72°C para extensão das cadeias, além de 10 minutos a 72°C para extensão final.

Após a PCR, os amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. A fonte eletroforética foi regulada para

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

uma corrida a 120 volts por aproximadamente uma hora e o marcador molecular utilizado foi de 100pb (Ladder Gibco DNA 100pb). A separação dos produtos de PCR também foi efetuada por eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% a temperaturas de 15°C a 20°C e as respectivas bandas foram evidenciadas por coloração com nitrato de prata. A fonte eletroforética foi regulada para uma pré-corrida a 130 volts por 5 minutos seguida de uma corrida de 90 a 130 volts por períodos de 3 a 4 horas. O marcador molecular utilizado foi de 100pb (Ladder Gibco DNA 100pb).

A avaliação qualitativa da expressão gênica foi realizada por comparação da intensidade de bandas obtidas por eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida dos genes de interesse em relação àquela do produto do gene *GAPDH*.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Tabela II. *Primers* utilizados para avaliação da expressão gênica de 32 genes com *splicing* alternativo e número e tamanho de fragmentos esperados. S: Sense; A: Anti-sense, Fragm: número de fragmentos.

Gene	*Primers*	Fragm	Tamanho (pb)
AF5Q31	S: CCACTAGAATAGGAATGGCAAG / A: GCTTCTGGTGATGTGAGCTG	1 ou 0	227pb**
BIRC6	S: AAAGGGACTGGCTTTGGAAC / A: TCATCCACAGACACATTTACAGG	1 ou 0	307pb**
CAD	S: GCATGAGTGGACAATTCCCA / A: GCCACTTCCGTACATCCTGT	2	400pb e 170pb*
CCNL1	S: CGTAATCAAACCCTGGTTCA / A: TCATAATGGCTGCACAACAAA	1 ou 0	325pb**
COL7A1	S: CTCACCAGCTGGGACGTT / A: GTGTGCACGACTGCTGGT	2	300pb e 225pb**
CSDA	S: CAGAAGCTGCCAATGTGACT / A: CACTGGTGGCTTGCTGATTT	2	501pb e 290pb*
DGKD	S: GCTGTAACCTCTGTAAGTAC / S: GCACCATACACAATGCAGCC	2	355pb e 212pb*
DHX15	S: GGACAGATTTAATTTGCCT / A: GCAATGATGCGGTCCAACT	2	400pb e 230pb*
DKFZp434O0213	S: TGGTGTCAGAGGACATGGA / A: GTGCAGCCACCTGTGCTT	1 ou 0	493bp**
E2F5	S: GAAAGAAGCCAGGCTCTGC / A: TATAGATGCGGGATGACAGC	1 ou 0	293pb**
EMS1	S: CCGACCGAGTAGACAAGAGC / A: GATTACAAGGAGAAGCTGGCC	2	386pb e 164pb
ERAL1	S: CTGCTGATCTTGTTGTGGTT / A: ACACCAGAAGAGATCTGTGC	2	540pb e 350pb*
EWSR1	S: AGGAGGAAACGTCCAGCAC / A: ATCCATGAGGCCACCTCTTC	2	195pb e 208pb**
FN1 var 1	S: TGTTCGTGCAGCTGTTTACC / A: CAGAACTATGATGCCGACCA	2	504pb e 324pb
FN1 var 2	S: ATTCTGTAGGCCGTTGGAAG / A: GAGGATGGGGAGCAGAGTTT	2	457pb e 280pb
FUS	S: GCTATTCCCAGCAGAGCAGT / A: TGGTCCTTTTTATTCATCAGTGC	1 ou 0	180pb**
MKNK1	S: CTGCCCAAGTCAAAGTCACA / A: TGGCCTCAGACACCAACTTG	1 ou 0	157pb**
N33	S: GAAGCAGCAACTTCGAAAGG / A: CAGTGTGTGCCACAGGATT	2	454pb e 389pb
NUP54	S: TACATCTGTAGCCAAAATTGCAC / A: GACAGTTCACAAACTTGTGTAAAGG	2	450pb e 219pb
PDCD8	S: GGGCCAGCAGTTCTGATACC / A: CATTGGGCATCACCTTAACC	1 ou 0	346pb**
PDXK	S: GGTTATTGGGGTGCTTGTGT / A: GCCGCTTGCAGACATTATCA	2	330pb e 235pb*
PFDN5	S: CATGAACCCTTTGCATGTTG / A: TGAAGAAGTCCTTGGCATCC	1 ou 0	319pb**
PTK2	S: GCAGCGTTATGTGGGACTTC / A: TCCATGTGAACCAGGGTAGC	1 ou 0	273pb**
RIPK2	S: CGCCTCTGGCACTGTGTCGT / A: CGTGACTGTGAGAGGGACAT	2	500pb e 350pb*
RSN	S: GAGCTTCTCAACCAGCTTGA / A: TAGAAGTCACCCGTACTGAC	2	492pb e 387pb*
SMARCB1	S: GAGGAAGGAACTGAAACGTG / A: TGTGTCCATCAGCACAGAGC	1 ou 0	283pb**
TLE2	S: AATACCAGCTGCACCTCCAC / A: GGCTGCTAGGATGTCTGTCC	2	241pb e 318pb**
TPR	S: GGTGTTTGTTTCATTGCCTCA / A: TATCTTCAGGTGGCCCAAAC	1 ou 0	278pb**
TRIP11	S: AACCTCTGGATTCACCAGGA / A: GCAAACACTTGCTCCTGACA	1 ou 0	466pb**
TRRAP	S: TGTATCCCCAAGCGGTCTAC / A: ATCTGATCGACGATGCCTTC	2	250pb e 196pb**
TSPAN-1	S: GCCATGCAGTTTGTCAACGT / A: GCAGCTGCAACCTCAGCAAT	2	360pb e 170pb*
Tucan	S: TCCCAACCTCCAGTGTATCAG / A: CTTCAGGCCCCAGAAACTG	1 ou 0	159pb**
VAV2	S: TGCTGTTCCACAAGATGACC / A: ACTGCTCCATCCACTTCCTC	2	150pb e 165pb**

*Segundo W. A. Silva Jr. (comunicação pessoal). **Segundo E. Dias Netto e E. Ojopi (comunicação pessoal).

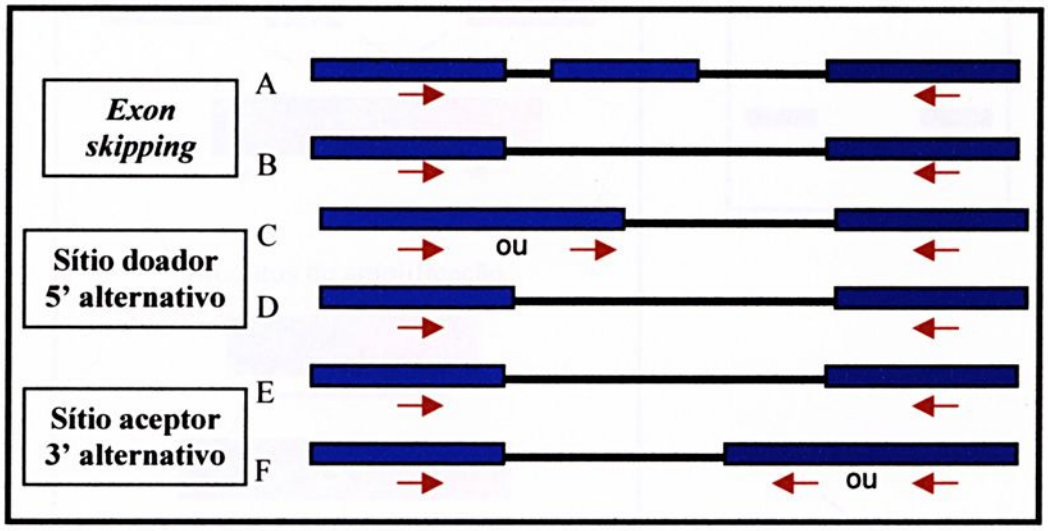


Figura 8. Estratégia utilizada no desenho de *primers* para detecção de isoformas correspondentes a diferentes tipos de *splicing* alternativo. A e B: exon *skipping*; C e D: sítio doador 5' alternativo; E e F: sítio aceptor 3' alternativo; caixas fechadas: exons; linhas negras: íntrons; setas: *primers*.

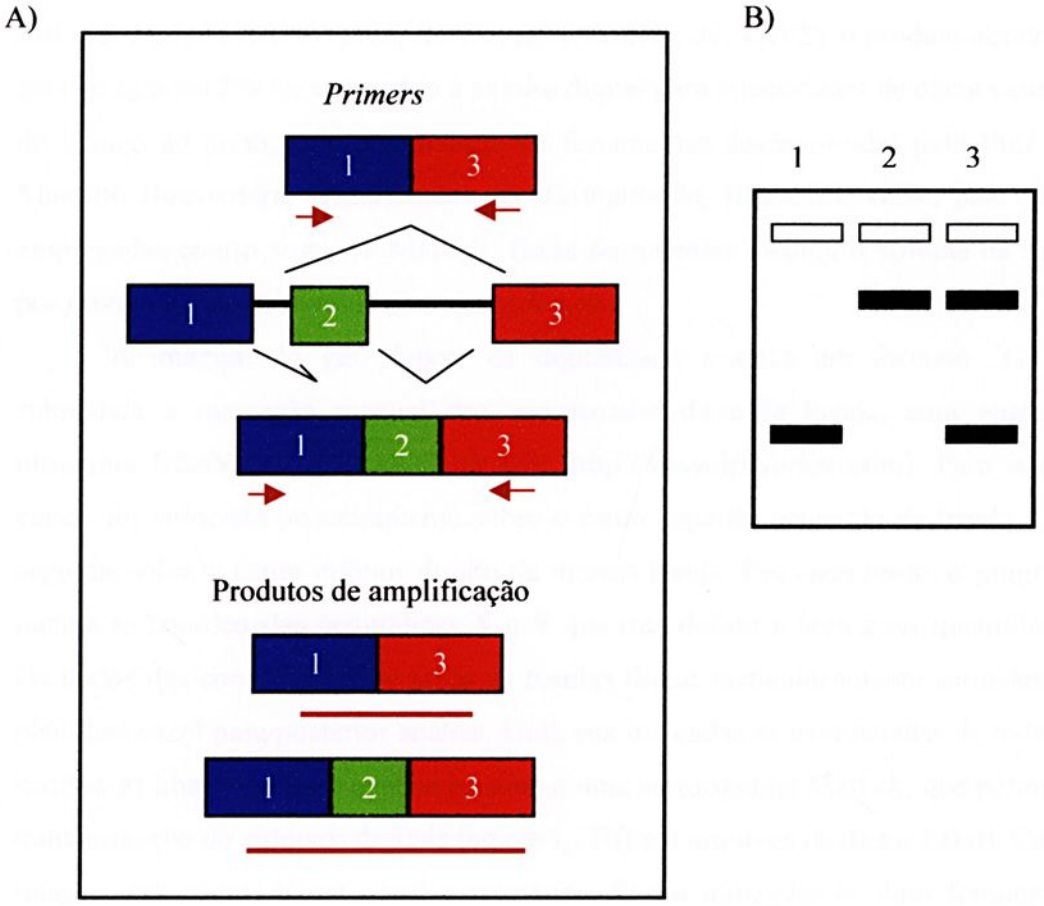


Figura 9. (A) *Primers* desenhados para detecção de produtos de amplificação obtidos em caso de exon *skipping*. (B) Esquema de gel após eletroforese de produtos de PCR em situações de (1) *splicing* constitutivo, (2) exon *skipping* e (3) presença de ambas as formas de *splicing*.

Para avaliação semi-quantitiva da expressão de dez genes (*CCNL1, CSDA, DHX15, N33, PDXK, PFDN5, RIPK2, RSN, SMARCB1, VAV2*), o produto obtido em géis de agarose 2% foi submetido à análise digital para intensidades de cinza variando do branco ao preto, com a utilização de ferramentas desenvolvidas pelo Prof. Dr. Maurílio Boaventura, Departamento de Computação, IBILCE/UNESP, para serem empregadas com o *software* MatLab. Essas ferramentas medem o volume da banda por *pixels* na área delimitada para quantificação.

A imagem do gel, depois de digitalizada e salva em formato .Tif, foi submetida a marcação manual das coordenadas de cada banda, com ajuda do programa IrfanView (disponível *on line*: http://www.irfanview.com). Para isso, o cursor foi colocado primeiramente sobre o canto superior esquerdo da banda e, em seguida, sobre o canto inferior direito da mesma banda. Em cada canto, o programa mostra as coordenadas geográficas **X** e **Y** que irão definir a área a ser quantificada. Os dados das coordenadas de todas as bandas foram meticulosamente anotados em planilhas excel para posterior análise. Uma vez marcadas as coordenadas de todas as bandas, as imagens foram analisadas uma a uma no programa MatLab, que permite a transformação de arquivos digitais (no caso, .Tif) em arquivos de dados (.Dat). Com a imagem transformada em arquivo numérico, foram utilizadas as duas ferramentas desenvolvidas pelo Professor Maurílio Boaventura, que permitem a soma dos valores correspondentes aos *pixels* de uma área selecionada para quantificação. Os valores finais obtidos foram anotados em outras planilhas excel para posterior desenho de gráficos.



4. RESULTADOS

I. Cultivo celular

As quatro linhagens celulares (Fadu, HEp-2, HeLa, Siha) foram cultivadas por períodos que variaram de seis a dez semanas. Esse período ocorreu em função da necessidade de um grande número de duplicatas para os diferentes experimentos.

II. Extração de RNA e obtenção de cDNA

O RNA obtido das amostras procedentes de linhagens e amostras frescas mostrou qualidade e quantidade satisfatórias, como pode ser observado na Figura 10, relativa a géis de agarose exibindo as bandas ribossômicas 18S e 28S. As Tabelas III e IV mostram a concentração de RNA medida em espectrofotômetro, correspondente às linhagens. Em relação às amostras frescas estudadas, o RNA apresentou boa qualidade, sem degradação significativa, com concentração entre 1.5μg/μL a 14.5μg/μL.

Os cDNAs obtidos também exibiram qualidade satisfatória na avaliação de transcritos raros e abundantes (*TP53 e GAPDH*, respectivamente) após PCR com 35 ciclos, exceto para os experimentos de choque osmótico (2h) com a linhagem Fadu (Figura 11). Os cDNAs das duplicatas de culturas foram reunidos em um mesmo tubo após sua obtenção.

III. PCR e Eletroforese

A grande heterogeneidade de seqüências de *primers* e a diversidade de fragmentos a serem obtidos fizeram da otimização da PCR uma tarefa laboriosa. A padronização da eletroforese para cada gene também necessitou de repetições de corrida, com mudanças na intensidade da corrente e nas quantidades de produto. As temperaturas e os tempos de anelamento e extensão foram específicos para cada par de *primers*, em função de sua seqüência e do tamanho esperado dos fragmentos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Em relação à eletroforese em gel de poliacrilamida, as melhores condições compreenderam corridas de 90 a 110 volts, corante com concentração elevada de glicerol e aplicação não submersa das amostras.

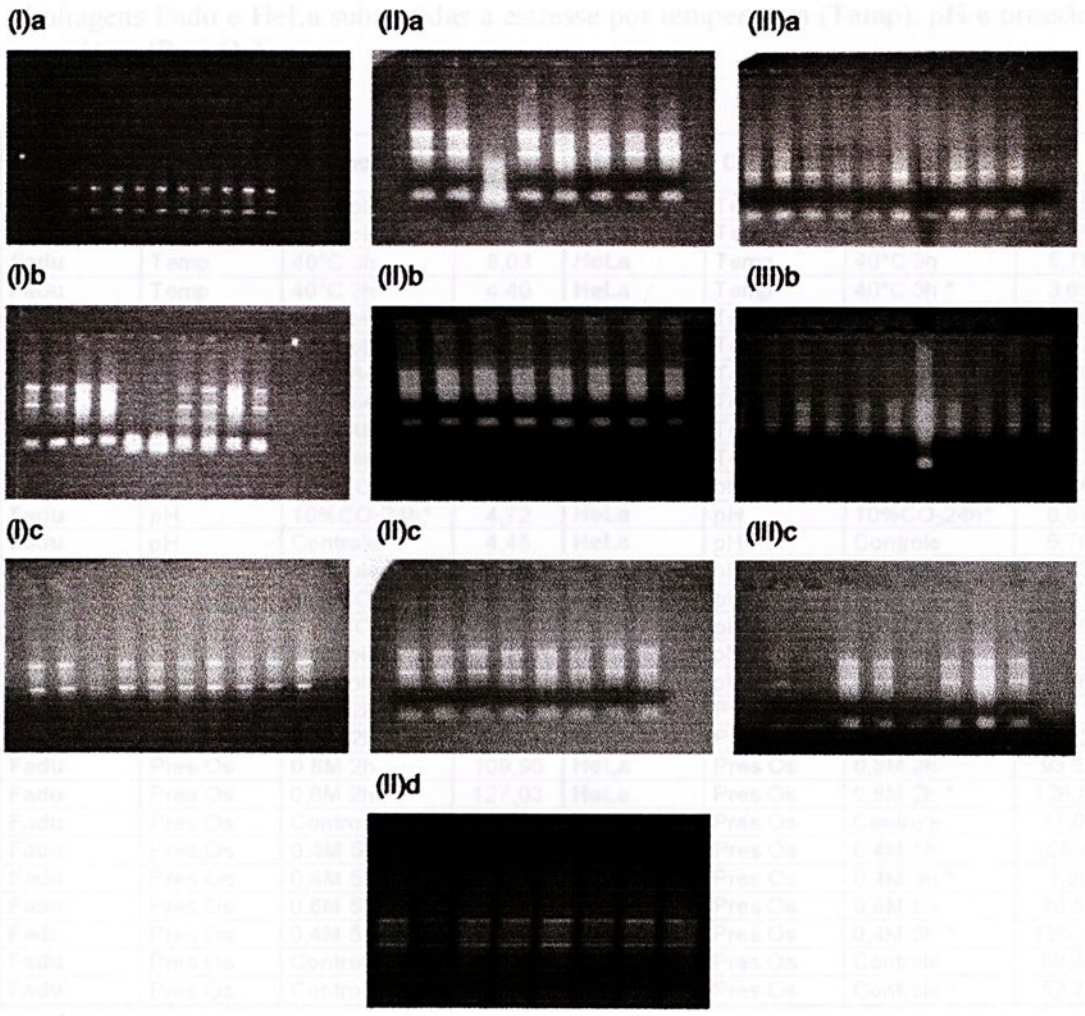


Figura 10. Foto de géis de agarose 1% corados com brometo de etídio para visualização das bandas ribossomais 18S e 28S: linhagens Fadu (a), HeLa (b) Siha (c) e HEp-2 (d), após tratamento com (I) choque térmico, (II) choque ácido e (III) choque osmótico.

Tabela III. Concentração (C) de RNA (μg/μL) medida em espectrofotômetro das linhagens Fadu e HeLa submetidas a estresse por temperatura (Temp), pH e pressão osmótica (Pres Os).

Linhagem	Condição	Amostra	C (μg/μL)	Linhagem	Condição	Amostra	C (μg/μL)
Fadu	Temp	Controle	1,90	**HeLa**	Temp	Controle	6,45
Fadu	Temp	Controle *	5,36	**HeLa**	Temp	Controle *	6,25
Fadu	Temp	40°C 3h	8,03	**HeLa**	Temp	40°C 3h	5,19
Fadu	Temp	40°C 3h *	4,40	**HeLa**	Temp	40°C 3h *	3,65
Fadu	Temp	Controle	4,18	**HeLa**	Temp	Controle	4,46
Fadu	Temp	Controle *	1,17	**HeLa**	Temp	Controle *	3,37
Fadu	Temp	17°C 64h	3,55	**HeLa**	Temp	17°C 64h	3,20
Fadu	Temp	17°C 64h *	3,07	**HeLa**	Temp	17°C 64h *	3,00
Fadu	Temp	5°C 64h	1,49	**HeLa**	Temp	5°C 64h	3,56
Fadu	Temp	5°C 64h *	2,14	**HeLa**	Temp	5°C 64h *	4,02
Fadu	pH	10%$CO_2$24h	5,07	**HeLa**	pH	10%$CO_2$24h	7,16
Fadu	pH	10%$CO_2$24h*	4,72	**HeLa**	pH	10%$CO_2$24h*	6,69
Fadu	pH	Controle	4,45	**HeLa**	pH	Controle	6,70
Fadu	pH	Controle *	6,30	**HeLa**	pH	Controle *	5,03
Fadu	pH	10%$CO_2$72h	4,84	**HeLa**	pH	10%$CO_2$72h	5,01
Fadu	pH	10%$CO_2$72h*	5,03	**HeLa**	pH	10%$CO_2$72h*	4,70
Fadu	pH	Controle	5,12	**HeLa**	pH	Controle	7,05
Fadu	pH	Controle	5,33	**HeLa**	pH	Controle	7,06
Fadu	Pres Os	0,4M 2h	94,60	**HeLa**	Pres Os	0,4M 2h	112,10
Fadu	Pres Os	0,4M 2h *	88,90	**HeLa**	Pres Os	0,4M 2h *	100,20
Fadu	Pres Os	0,8M 2h	109,90	**HeLa**	Pres Os	0,8M 2h	93,30
Fadu	Pres Os	0,8M 2h *	127,03	**HeLa**	Pres Os	0,8M 2h *	126,80
Fadu	Pres Os	Controle	105,30	**HeLa**	Pres Os	Controle	71,00
Fadu	Pres Os	0,4M 5h	79,12	**HeLa**	Pres Os	0,4M 5h	100,80
Fadu	Pres Os	0,4M 5h *	86,70	**HeLa**	Pres Os	0,4M 5h *	1,89
Fadu	Pres Os	0,8M 5h	103,70	**HeLa**	Pres Os	0,8M 5h	86,56
Fadu	Pres Os	0,4M 5h *	112,08	**HeLa**	Pres Os	0,4M 5h *	126,35
Fadu	Pres Os	Controle	108,02	**HeLa**	Pres Os	Controle	88,45
Fadu	Pres Os	Controle *	106,40	**HeLa**	Pres Os	Controle *	52,70

*Duplicata

Tabela IV. Concentração (C) de RNA (μg/μL) medida em espectrofotômetro das linhagens Siha e HEp-2 submetidas a estresse por temperatura (Temp), pH e pressão osmótica (Pres Os).

Linhagem	Condição	Amostra	C (μg/μL)	Linhagem	Condição	Amostra	C (μg/μL)
Siha	Temp	Controle	108,03	**HEp-2**	Temp	Controle	5,45
Siha	Temp	Controle *	60,60	**HEp-2**	Temp	Controle *	6,42
Siha	Temp	40°C 3h	60,22	**HEp-2**	Temp	40°C 3h	8,44
Siha	Temp	40°C 3h *	51,50	**HEp-2**	Temp	40°C 3h *	7,71
Siha	Temp	Controle	61,90	**HEp-2**	Temp	Controle	4,60
Siha	Temp	Controle *	64,30	**HEp-2**	Temp	Controle *	4,31
Siha	Temp	17°C 64h	35,30	**HEp-2**	Temp	17°C 64h	5,78
Siha	Temp	17°C 64h *	33,15	**HEp-2**	Temp	17°C 64h *	4,81
Siha	Temp	5°C 64h	49,76	**HEp-2**	Temp	5°C 64h	3,53
Siha	Temp	5°C 64h *	55,60	**HEp-2**	Temp	5°C 64h *	4,39
Siha	pH	10%$CO_2$24h	5,00	**HEp-2**	pH	10%$CO_2$24h	2,70
Siha	pH	10%$CO_2$24h*	3,99	**HEp-2**	pH	10%$CO_2$24h*	5,09
Siha	pH	Controle	8,48	**HEp-2**	pH	Controle	3,12
Siha	pH	Controle *	6,05	**HEp-2**	pH	Controle *	2,50
Siha	pH	10%$CO_2$72h	5,02	**HEp-2**	pH	10%$CO_2$72h	9,54
Siha	pH	10%$CO_2$72h*	4,38	**HEp-2**	pH	10%$CO_2$72h*	8,38
Siha	pH	Controle	6,07	**HEp-2**	pH	Controle	9,92
Siha	pH	Controle	5,79	**HEp-2**	pH	Controle	9,60
Siha	Pres Os	0,4M 2h	7,45	**HEp-2**	Pres Os	0,4M 2h	4,10
Siha	Pres Os	0,4M 2h	-	**HEp-2**	Pres Os	0,4M 2h	4,04
Siha	Pres Os	0,8M 2h	5,37	**HEp-2**	Pres Os	0,8M 2h	3,93
Siha	Pres Os	0,8M 2h	-	**HEp-2**	Pres Os	0,8M 2h	5,20
Siha	Pres Os	Controle 2h	3,28	**HEp-2**	Pres Os	Controle 2h	3,60
Siha	Pres Os	Controle* 5h	3,73	**HEp-2**	Pres Os	Controle* 2h	3,52
Siha	Pres Os	0,4M 5h	4,64	**HEp-2**	Pres Os	0,4M 5h	4,55
Siha	Pres Os	0,4M 5h	-	**HEp-2**	Pres Os	0,4M 5h	3,71
Siha	Pres Os	0,8M 5h	4,06	**HEp-2**	Pres Os	0,8M 5h	3,75
Siha	Pres Os	0,8M 5h	3,88	**HEp-2**	Pres Os	0,8M 5h	2,90
Siha	Pres Os	Controle 5h	3,11	**HEp-2**	Pres Os	Controle 5h	3,30
Siha	Pres Os	Controle* 5h	-	**HEp-2**	Pres Os	Controle* 5h	4,21

*Duplicata

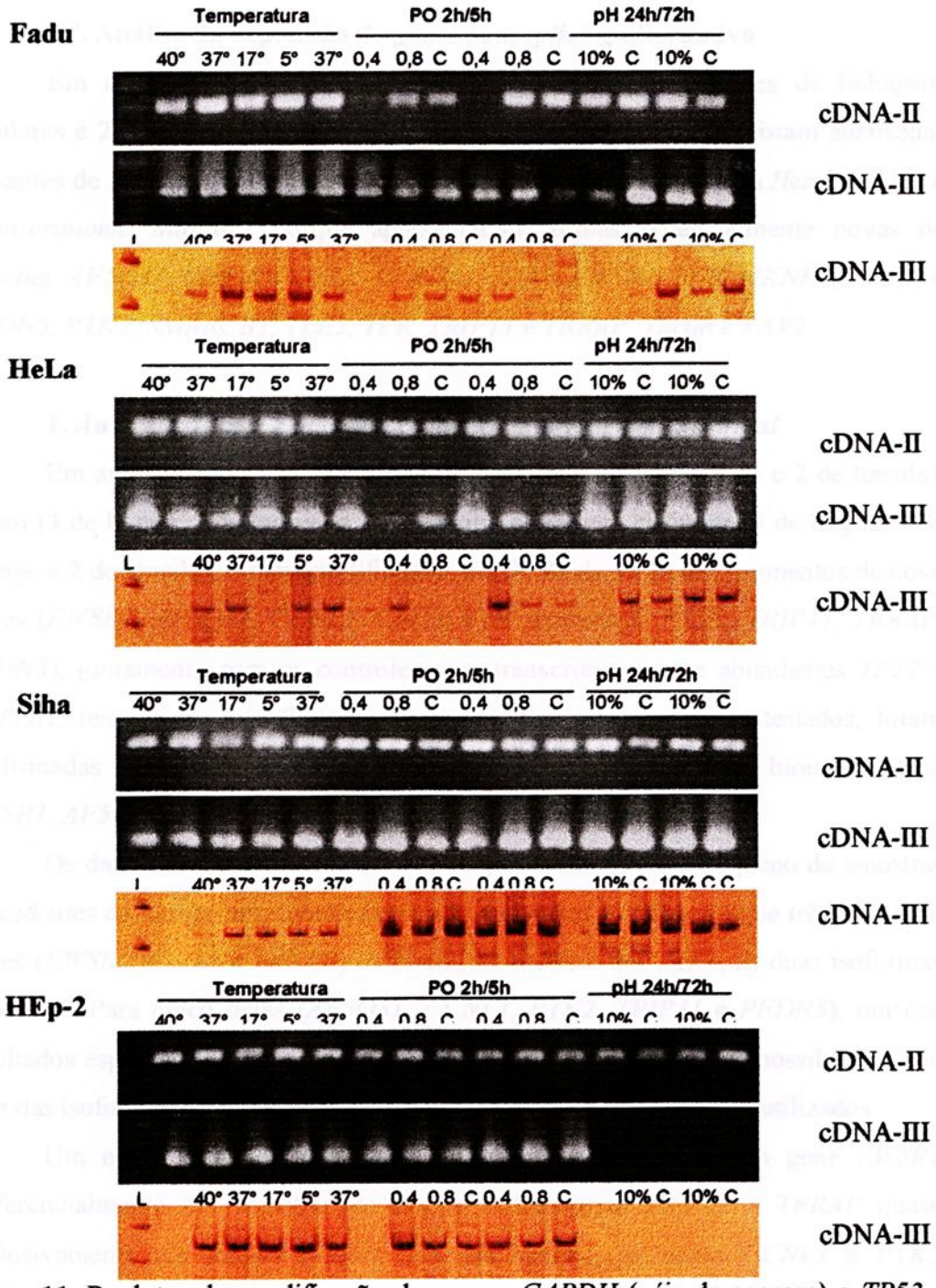


Figura 11. Produtos de amplificação dos genes *GAPDH* (géis de agarose) e *TP53* (géis de poliacrilamida) após PCR com 35 ciclos de cDNAs preparados em momentos diferentes (II e III) a partir do mesmo RNA. C: Controle; PO: Pressão Osmótica.

IV. Análise da expressão de genes com *splicing* alternativo

Em um total de 141 amostras estudadas (114 procedentes de linhagens celulares e 27 de tecidos de autópsia, tumor e margem cirúrgica), foram analisadas variantes de *splicing* de 32 genes. Desses, 18 foram selecionados pela *Head and Neck Transcriptome Initiative* porque apresentaram formas potencialmente novas de *splicing*: *AF5Q31, BIRC6, CCNL1, COL7A1, E2F5, EWSR1, FUS, MKNK1, PDCD8, PFDN5, PTK2, SMARCB1, TLE2, TPR, TRIP11* e *TRRAP, Tucan e VAV2*.

1. *Autópsia, tumor e margem cirúrgica aparentemente normal*

Em amostras de cDNA de autópsia (6 de língua, 3 de laringe e 2 de tonsila), tumor (3 de língua, 3 de laringe e 2 de tonsila) e margem cirúrgica (3 de língua, 3 de laringe e 2 de tonsila), foram amplificados, em PCRs de 35 ciclos, segmentos de nove genes (*EWSR1, AF5Q31, CCNL1, CSDA, FN1* variante 1, *PTK2, TRIP11, TRRAP, PFDN5*), juntamente com os controles para transcritos raros e abundantes *TP53* e *GAPDH*, respectivamente (Figuras 12 e 13). Em sete dos genes testados, foram confirmadas isoformas consideradas novas por ferramentas de bioinformática: *EWSR1, AF5Q31, CCNL1, PTK2, TRIP11, TRRAP* e *PFDN5*.

Os dados da Tabela V mostram que apenas um número pequeno de amostras procedentes de laringe apresentou expressão dos genes estudados e que três de quatro genes (*EWSR1, CSDA* e *TRRAP*) exibiram, na maioria dos casos, as duas isoformas esperadas. Para cinco deles (*AF5Q31, CCNL1, PTK2, TRIP11* e *PFDN5*), um dos resultados esperados era a ausência de produto, o que não elimina a possibilidade de uma das isoformas estar presente, mas não detectável com os *primers* utilizados.

Um outro resultado observado foi a expressão elevada do gene *EWSR1* preferencialmente em amostras de língua e dos genes *TRIP11* e *TRRAP* quase exclusivamente em tonsila (Figura 12). Na laringe, os genes *CCNL1* e *PTK2* estiveram expressos apenas em tumores e margens cirúrgicas enquanto o *CSDA* apenas em tecidos de autópsia (Figura 13).



Nesse conjunto de amostras, não foi realizada a avaliação qualitativa ou semiquantitativa da intensidade de expressão dos nove genes e de suas variantes de *splicing* utilizando produtos de PCR na fase exponencial. Mesmo na ausência dessa abordagem mais estringente, foram evidentes as diferenças de intensidade de expressão entre as várias amostras, porém sem padrão definido, talvez por causa do número amostral pequeno.

As principais diferenças notadas foram aquelas entre tumores e margens versus autópsias para o gene *CCNL1* (tonsila e laringe), para os genes *CSDA* e *TRRAP* (tonsila) e para o gene *FN1* (língua).

unesp

Tabela V. Número de amostras de autópsia (Au), tumor (Tu) e margem cirúrgica (Ma) procedentes de língua, laringe e tonsila com amplificação para fragmentos de nove genes com *splicing* alternativo.

Gene	Tamanho de Fragmentos (pb)	Língua			Laringe			Tonsila		
		Au	Tu	Ma	Au	Tu	Ma	Au	Tu	Ma
EWSR1	208	6	3	3				1	2	2
	195	6	1	3				1	2	2
AF5Q31	227	4	3	1				1	1	2
	0									
CCNL1	325	6	3	1		2	2		2	2
	0									
CSDA	501	6	2	2				2	1	2
	290	6	2	2	2				2	2
FN1 var1	504	5	3	3				1	1	2
	324									
PTK2	273	2	2	3		2	2	1		
	0									
TRIP11	466	5	1	1				2	2	2
	0									
TRRAP	250	5	1	1				1	2	2
	196	2							2	2
PFDN5	319	6	3	3				1	2	2
	0									
Total de amostras		6	3	3	3	3	3	2	2	2

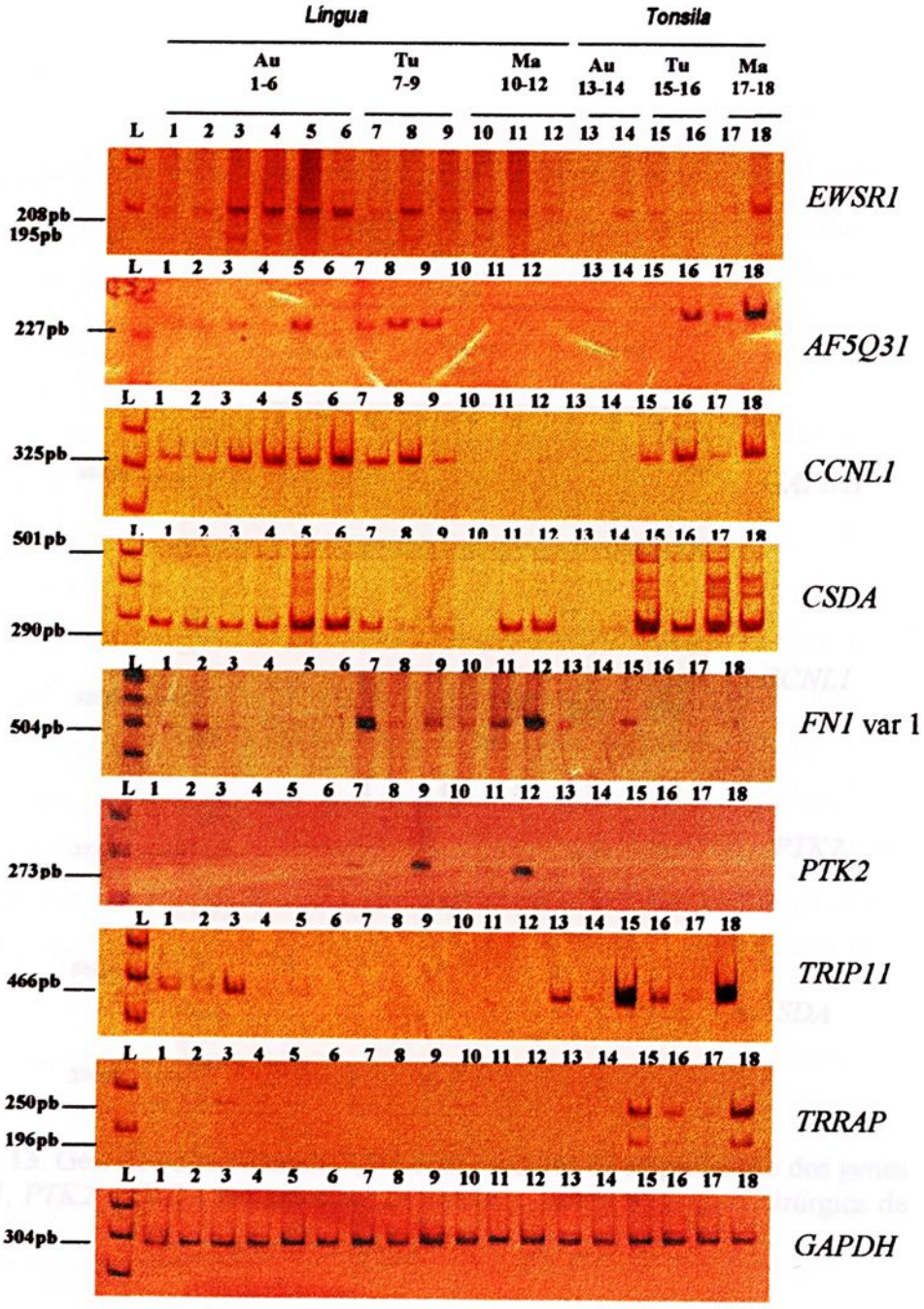


Figura 12. Géis de poliacrilamida 7,5% com produtos de amplificação dos genes *EWSR1*, *AF5Q31*, *CCNL1*, *CSDA*, *FN1 variante 1*, *TRIP11*, *PTK2*, *TRRAP* e *GAPDH*, em amostras de autópsia (Au), tumor (Tu) e margem cirúrgica (Ma) de língua e tonsila. Os dados do gene *PFDN5* não estão apresentados em função da qualidade de coloração do gel.

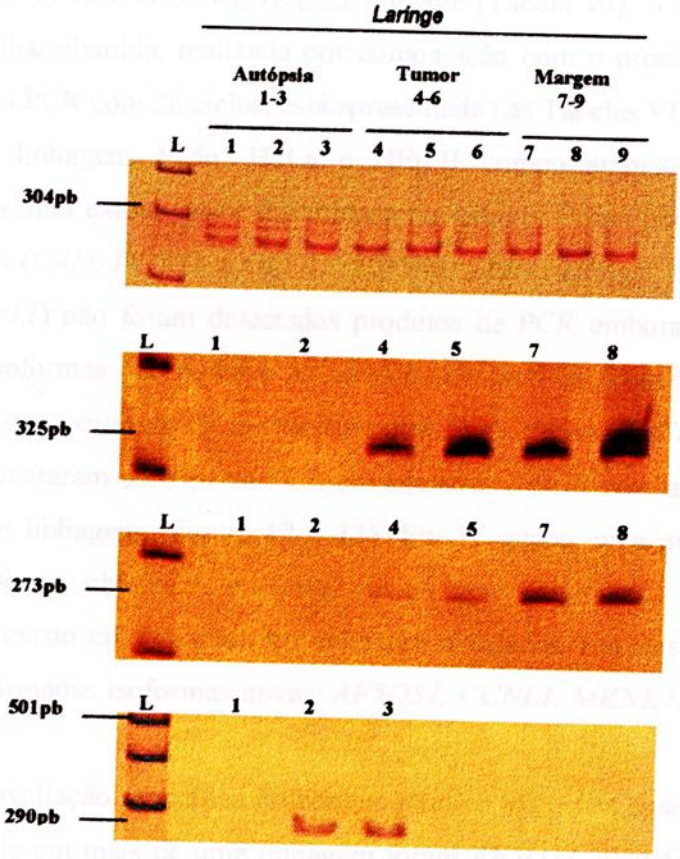


Figura 13. Géis de poliacrilamida 7,5% com produtos de amplificação dos genes *CCNL1*, *PTK2* e *CSDA* em amostras de autópsia, tumor e margem cirúrgica de laringe.

2. Linhagens celulares submetidas a estresse por temperatura, pressão osmótica e pH

Em amostras de cDNA das linhagens celulares Fadu, HEp-II, HeLa e Siha submetidas a estresse por temperatura, pressão osmótica e pH, foram amplificados segmentos de 32 genes, juntamente com os controles para transcritos raros e abundantes, *TP53* e *GAPDH*, respectivamente (Tabela VI). A análise qualitativa de géis de poliacrilamida, realizada por comparação com o produto do gene *GAPDH* obtido após PCR com 28 ciclos, está apresentada nas Tabelas VII - X.

As linhagens Fadu, HeLa e HEp-II comportaram-se de forma similar, enquanto a Siha exibiu maior dificuldade no cultivo. Como pode ser observado, em onze genes (*CAD, DGKD, COL7A1, EWSR1, TLE2, TRRAP, BIRC6, E2F5, PTK2, TPR, TRIP11*) não foram detectados produtos de PCR embora, nos cinco últimos, uma das isoformas não poderia ser amplificada com os *primers* desenhados, o que não exclui sua expressão. É interessante que quatro deles (*EWSR1, PTK2, TRIP11* e *TRRAP*) mostraram sucesso na PCR em amostras frescas com as mesmas condições testadas em linhagens (Figura 12 e 13). Em 16 genes, uma ou as duas isoformas esperadas foram obtidas e, em oito, um ou mais fragmentos não apresentaram o tamanho previsto em qualquer das amostras analisadas. Em seis dos genes testados, foram confirmadas isoformas novas: *AF5Q31, CCNL1, MKNK1, PDCD8, PFDN5* e *Tucan*.

Na avaliação específica do choque térmico, os genes aparentemente sensíveis à hipertermia em mais de uma linhagem foram *AF5Q31, NUP54, PDXK, PFDN5* e *RIPK2* e à hipotermia foram *DHX15* e *RIPK2*, sendo a temperatura de 17°C mais drástica que a de 5°C. Dois genes (*CSDA* e *RIPK2*) mudaram sua expressão sob estresse osmótico e um (*FUS*) sob estresse ácido em mais de uma linhagem celular.

A temperatura foi o fator que mais provocou alterações de expressão e o pH o que menos provocou mudanças, com poucas exceções (Tabelas VII, VIII e X, e Figuras 14-17). De maneira geral, as isoformas, quando presentes, apresentaram o mesmo comportamento frente a um dado fator. Uma exceção foi o gene *RIPK2*, para



o qual foram observadas, freqüentemente, respostas opostas das duas isoformas, sugerindo que a hipertermia, a hipotermia e a pressão osmótica afetam o *splicing* alternativo desse gene (Figura 18).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

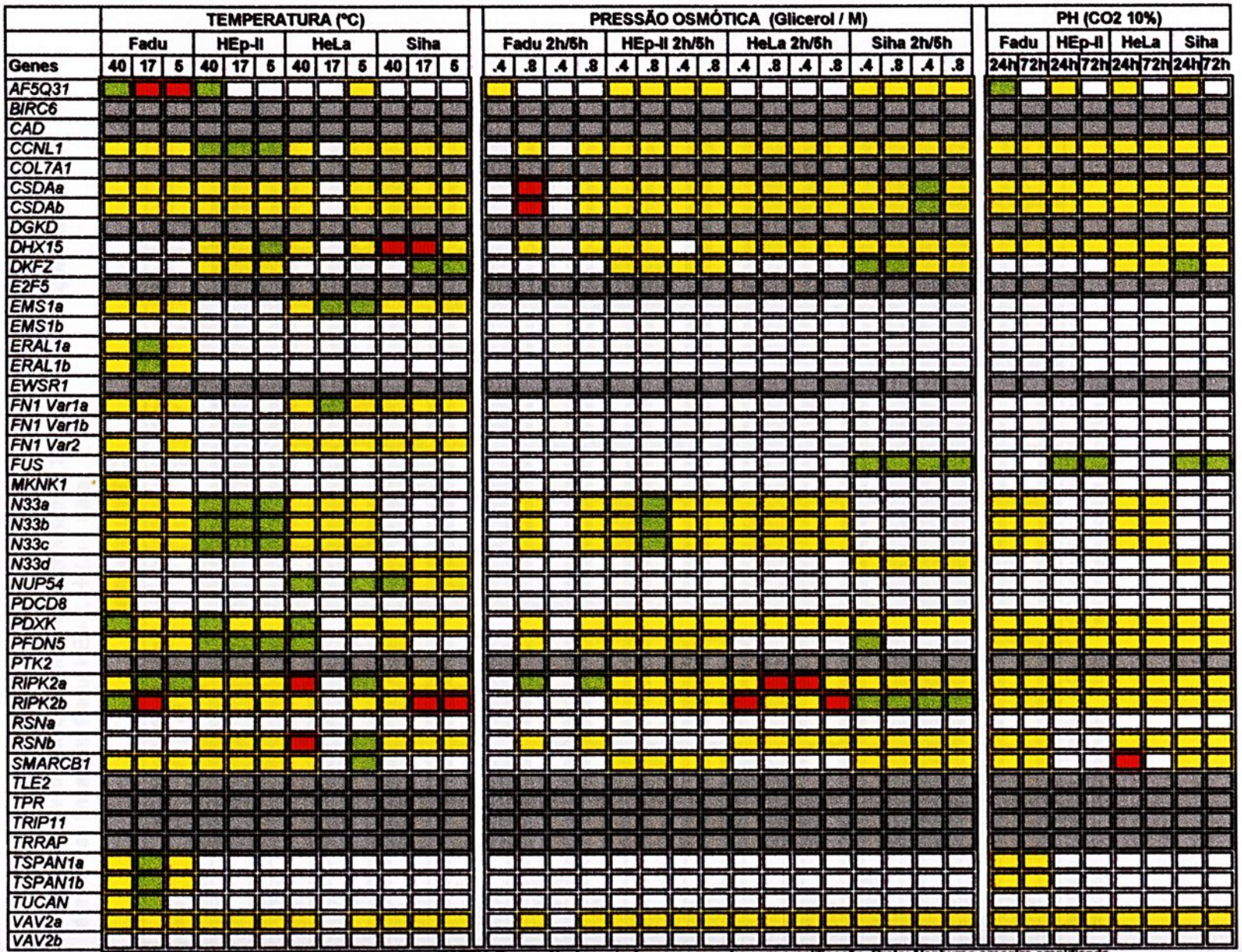
Tabela VI. Produtos de PCR de 32 genes obtidos em amostras de cDNA das linhagens celulares Fadu, HEp-2, HeLa e Siha submetidas a estresse por temperatura, pressão osmótica e pH.

Gene	Fragmentos esperados	Tamanho esperado(pb)	Tamanho observado (pb)
AF5Q31	1 ou 0	227pb	227pb
BIRC6	1 ou 0	307pb	SP
CAD	2	400pb e 170pb	SP
CCNL1	1 ou 0	325pb	325pb
COL7A1	2	300pb e 225pb	SP
CSDA	2	501pb e 290pb	501pb e 290pb
DGKD	2	355pb e 212pb	SP
DHX15	2	400pb e 230pb	351pb
DKFZp434O0213	1 ou 0	493bp	493bp e 320pb
E2F5	1 ou 0	293pb	SP
EMS1	2	386pb e 164pb	386pb
ERAL1	2	540pb e 350pb	460pb e 205pb
EWSR1	2	208pb e 195pb	SP*
FN1 var 1	2	504pb e 324pb	504pb
FN1 var 2	2	457pb e 280pb	457pb
FUS	1 ou 0	180pb	280pb
MKNK1	1 ou 0	157pb	157pb
N33	2	454pb e 389pb	600pb, 490pb, 400pb e 310pb
NUP54	2	450pb e 219pb	450pb
PDCD8	1 ou 0	346pb	346pb
PDXK	2	330pb e 235pb	330pb
PFDN5	1 ou 0	319pb	319pb
PTK2	1 ou 0	273pb	SP*
RIPK2	2	500pb e 350pb	500pb e 302pb
RSN	2	492pb e 387pb	282pb
SMARCB1	1 ou 0	283pb	240pb
TLE2	2	241pb e 318pb	SP
TPR	1 ou 0	278pb	SP
TRIP11	1 ou 0	466pb	SP*
TRRAP	2	250pb e 196pb	SP*
TSPAN	2	360pb e 170pb	360pb e 170pb
Tucan	1 ou 0	159pb	159pb
VAV2	2	150pb e 165pb	165pb

SP: sem produto; em vermelho: banda mais intensa. *: Produto observado apenas em amostras frescas.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Tabela VII. Avaliação qualitativa da expressão de 32 genes em condições de estresse (Temp, PO e pH) nas linhagens Fadu, HEp-2, HeLa e Siha



Amarelo = GAPDH, Verde: < GAPDH, Vermelho: > GAPDH, Branco: Nenhuma isoforma ou amostra sem amplificação. Preto: Nenhuma amostra amplificada

Tabela VIII. Avaliação qualitativa da expressão de 32 genes em condições de estresse térmico nas linhagens Fadu, HEp-2, HeLa e Siha.

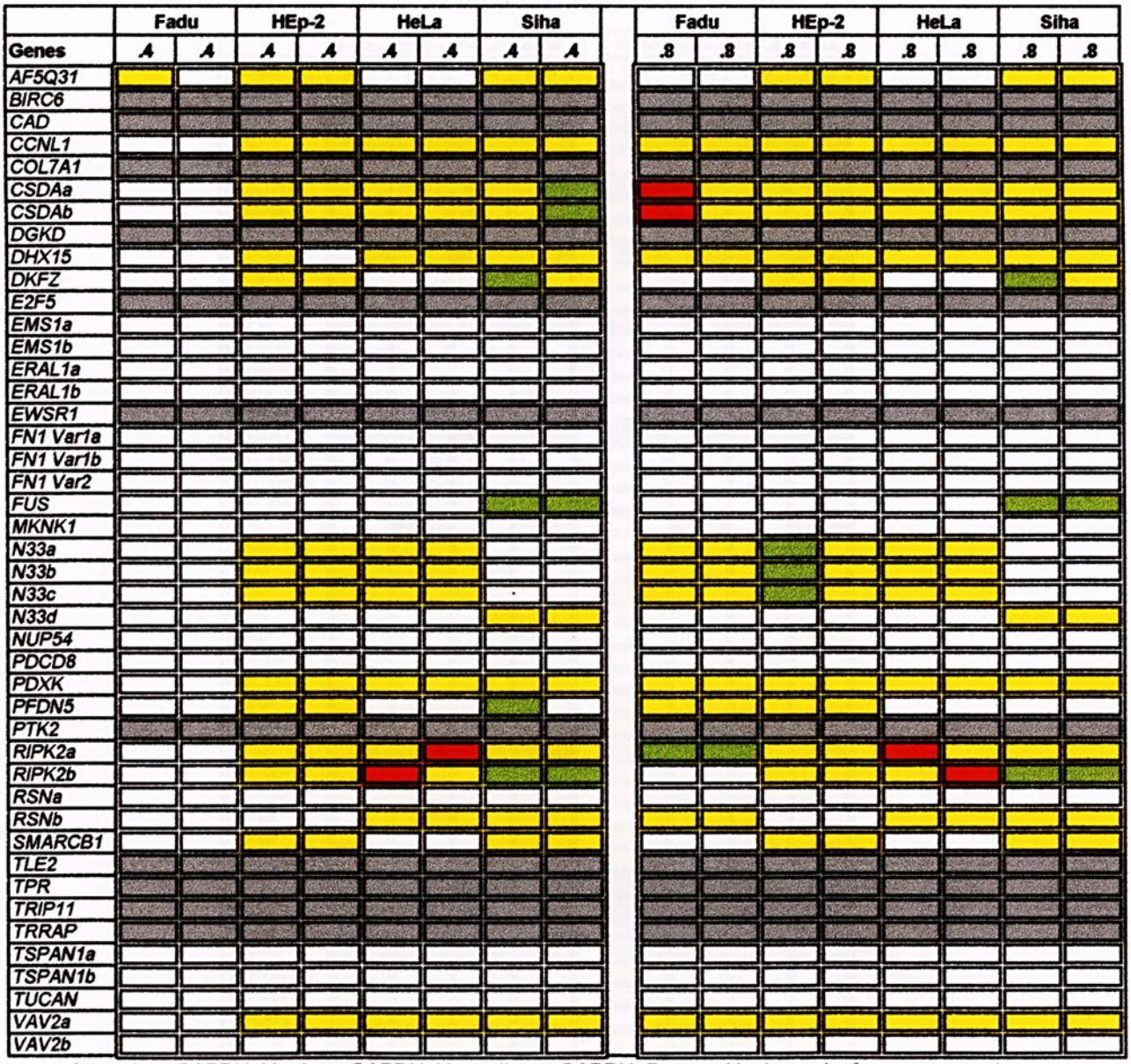
Temperatura (°C)

	Fadu	HEp-2	HeLa	Siha	Fadu	HEp-2	HeLa	Siha	Fadu	HEp-2	HeLa	Siha
Genes	**40**	**40**	**40**	**40**	**17**	**17**	**17**	**17**	**5**	**5**	**5**	**5**
AF5Q31												
BIRC6												
CAD												
CCNL1												
COL7A1												
CSDAa												
CSDAb												
DGKD												
DHX15												
DKFZ												
E2F5												
EMS1a												
EMS1b												
ERAL1a												
ERAL1b												
EWSR1												
FN1 Var1a												
FN1 Var1b												
FN1 Var2												
FUS												
MKNK1												
N33a												
N33b												
N33c												
N33d												
NUP54												
PDCD8												
PDXK												
PFDN5												
PTK2												
RIPK2a												
RIPK2b												
RSNa												
RSNb												
SMARCB1												
TLE2												
TPR												
TRIP11												
TRRAP												
TSPAN1a												
TSPAN1b												
TUCAN												
VAV2a												
VAV2b												

Amarelo = GAPDH, Verde: < GAPDH, Vermelho: > GAPDH, Branco: Nenhuma isoforma ou amostra sem amplificação. Cinza: Nenhuma amostra amplificada

Tabela IX. Avaliação qualitativa da expressão de 32 genes em condições de estresse osmótico nas linhagens Fadu, HEp-2, HeLa e Siha.

Pressão Osmótica (Glicerol/M)



Amarelo = GAPDH, Verde: < GAPDH, Vermelho: > GAPDH, Branco: Nenhuma isoforma ou amostra sem amplificação. Preto: Nenhuma amostra amplificada

Tabela X. Avaliação qualitativa da expressão de 32 genes em condições de estresse ácido nas linhagens Fadu, Hep-2, HeLa e Siha.

pH (CO2 10%)

Genes	Fadu 24h	HEp-2 24h	HeLa 24h	Siha 24h	Fadu 72h	HEp-2 72h	HeLa 72h	Siha 72h
AF5Q31								
BIRC6								
CAD								
CCNL1								
COL7A1								
CSDAa								
CSDAb								
DGKD								
DHX15								
DKFZ								
E2F5								
EMS1a								
EMS1b								
ERAL1a								
ERAL1b								
EWSR1								
FN1 Var1a								
FN1 Var1b								
FN1 Var2								
FUS								
MKNK1								
N33a								
N33b								
N33c								
N33d								
NUP54								
PDCD8								
PDXK								
PFDN5								
PTK2								
RIPK2a								
RIPK2b								
RSNa								
RSNb								
SMARCB1								
TLE2								
TPR								
TRIP11								
TRRAP								
TSPAN1a								
TSPAN1b								
TUCAN								
VAV2a								
VAV2b								

Amarelo = GAPDH, Verde: < GAPDH, Vermelho: > GAPDH, Branco: Nenhuma isoforma ou amostra sem amplificação. Preto: Nenhuma amostra amplificada

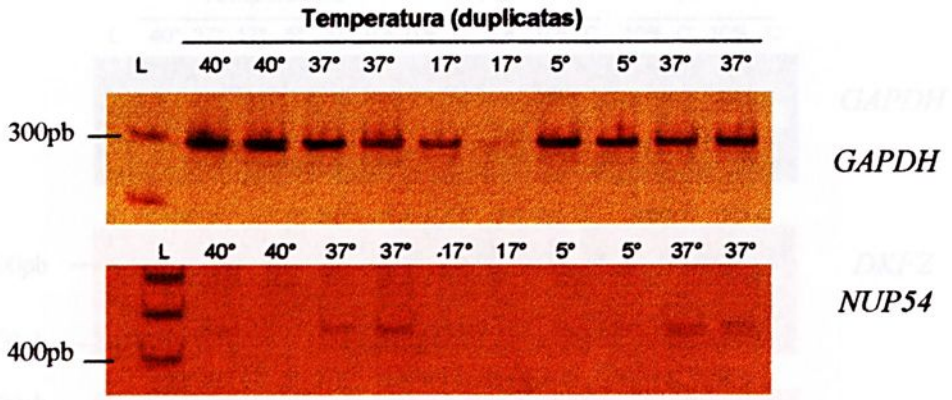


Figura 14. Géis de poliacrilamida com produtos de amplificação dos genes *GAPDH* e *NUP54* na linhagem HeLa. Observa-se diminuição da expressão do produto de 450pb nas duplicatas a 40°C, 17°C e 5°C.

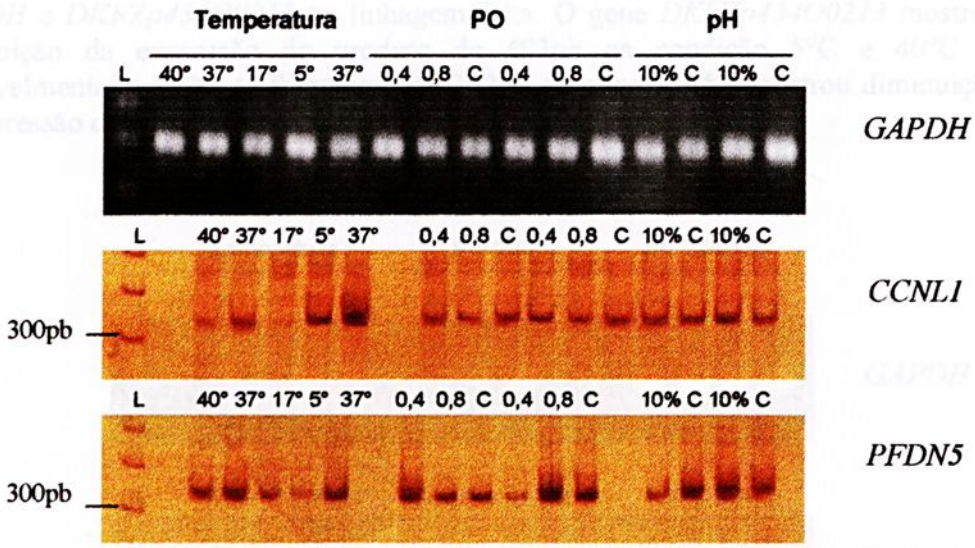


Figura 15. Géis de agarose e poliacrilamida com produtos de amplificação dos genes *GAPDH*, *CCNL1* e *PFDN5* na linhagem HEp-2. Os genes *CCNL1* e *PFDN5* mostraram expressão diminuída a 5°C, 17°C e 40°C.

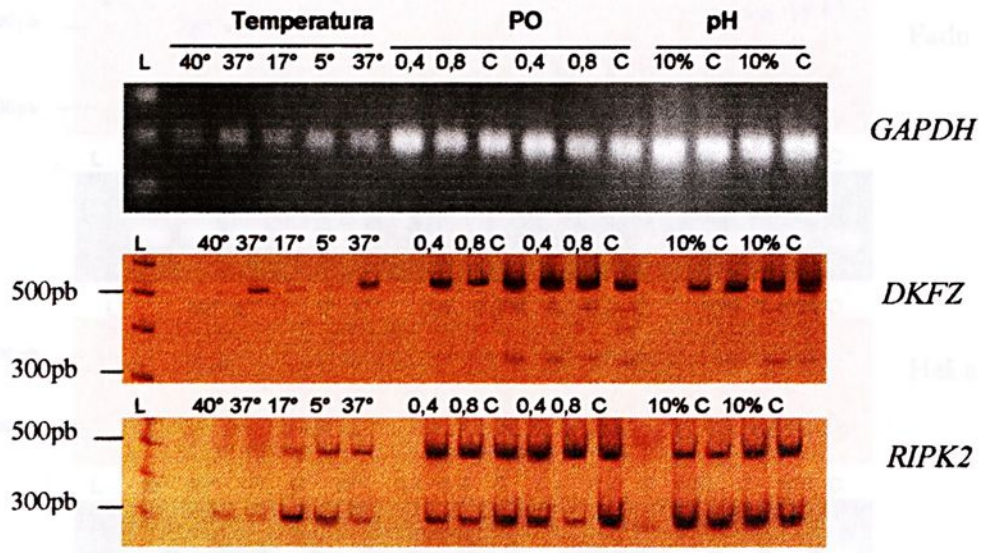


Figura 16. Géis de agarose e poliacrilamida com produtos de amplificação dos genes *GAPDH* e *DKFZp434O0213* na linhagem Siha. O gene *DKFZp434O0213* mostrou diminuição da expressão do produto de 493pb na condição 5°C e 40°C e, provavelmente, a 17°C. O fragmento de 302pb do gene *RIPK2* mostrou diminuição de expressão com estresse osmótico.

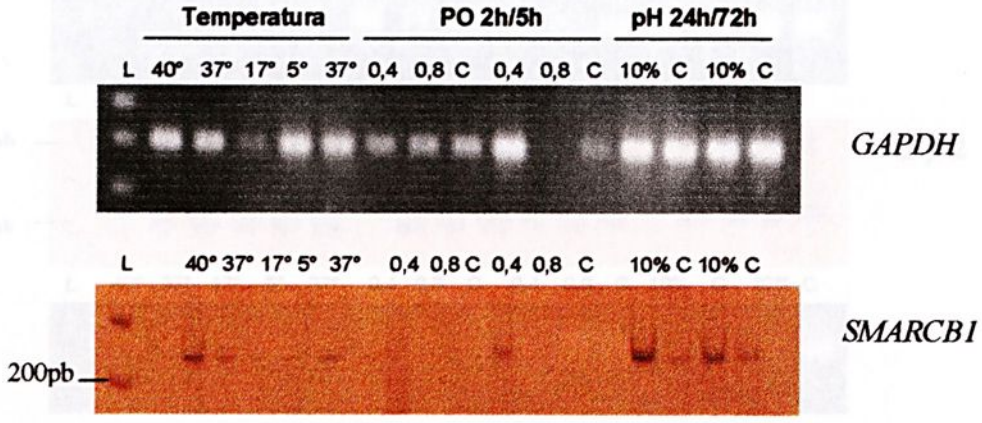


Figura 17. Géis de agarose e poliacrilamida com produtos de amplificação dos genes *GAPDH* e *SMARCB1* na linhagem HeLa. O gene *SMARCB1* mostrou expressão aumentada do produto de 240pb em condições de hipertermia e acidez.

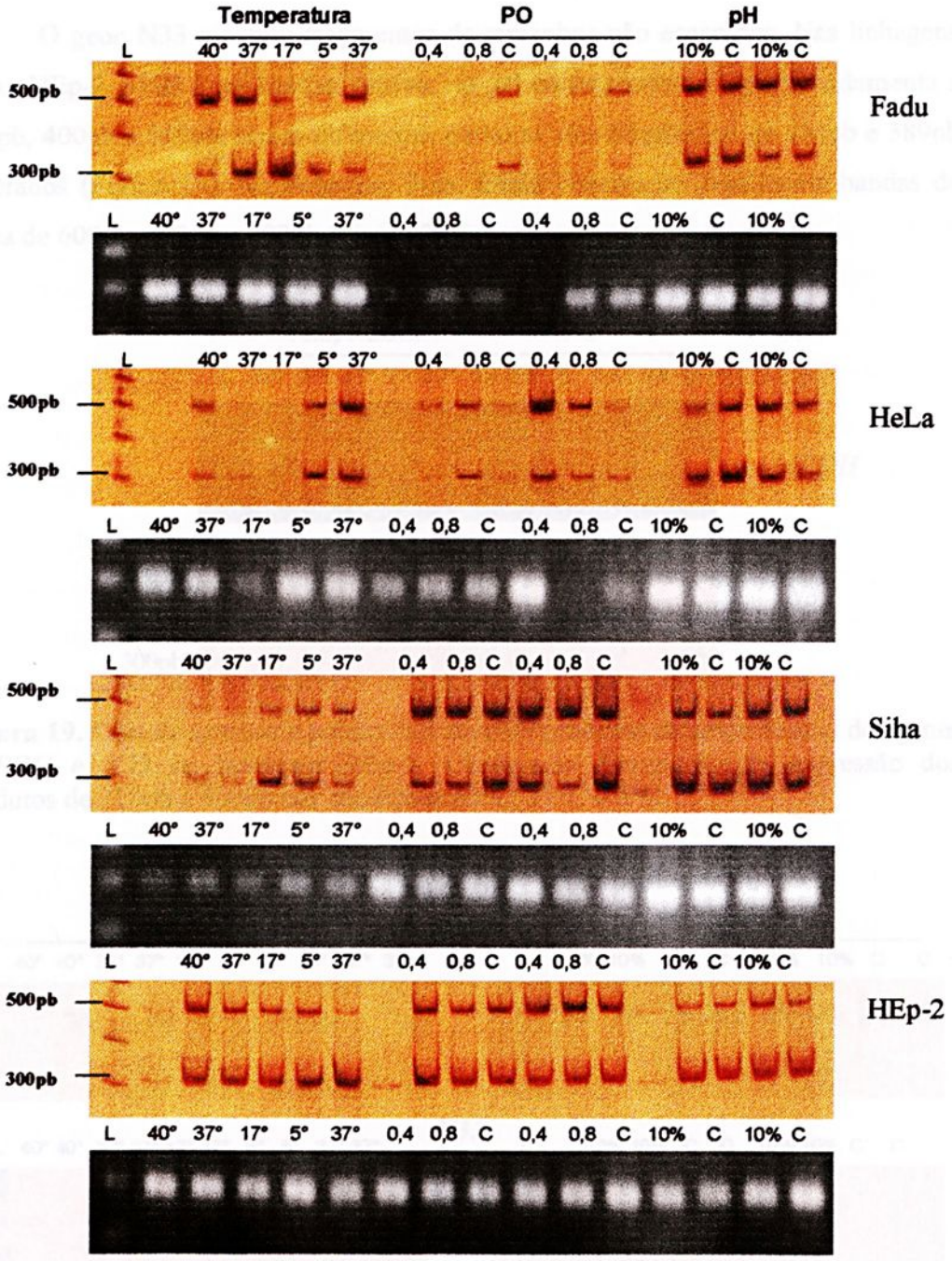


Figura 18. Géis de poliacrilamida e de agarose com produtos de amplificação dos genes *RIPK2* e *GAPDH*, respectivamente, nas linhagens Fadu, HeLa, Siha e HEp-2. O gene *RIPK2* mostrou, em geral, diminuição da expressão do fragmento de 500pb a 17°C e 5°C e aumento a 40°C. Por outro lado, o fragmento de 302pb aumentou sua expressão com hipotermia em Fadu e Siha.

O gene N33 mostrou fragmentos de tamanhos não esperados. Nas linhagens Fadu, HEp-2 e HeLa, as bandas visíveis no gel corresponderam aproximadamente a 490pb, 400pb e 310pb, muito diferentes, portanto, dos fragmentos de 454pb e 389pb esperados (Figura 19). Na linhagem Siha, foram observadas geralmente bandas de cerca de 600pb, 490pb e 400pb (Figura 20).

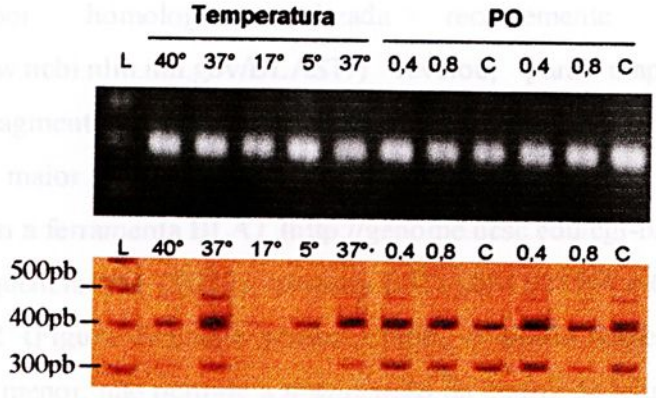


Figura 19. Géis de agarose e poliacrilamida com produtos de amplificação dos genes *GAPDH* e *N33* na linhagem HEp-2. Observa-se diminuição da expressão dos produtos de 310pb e 400pb nas condições 40°C, 17°C e 5°C.

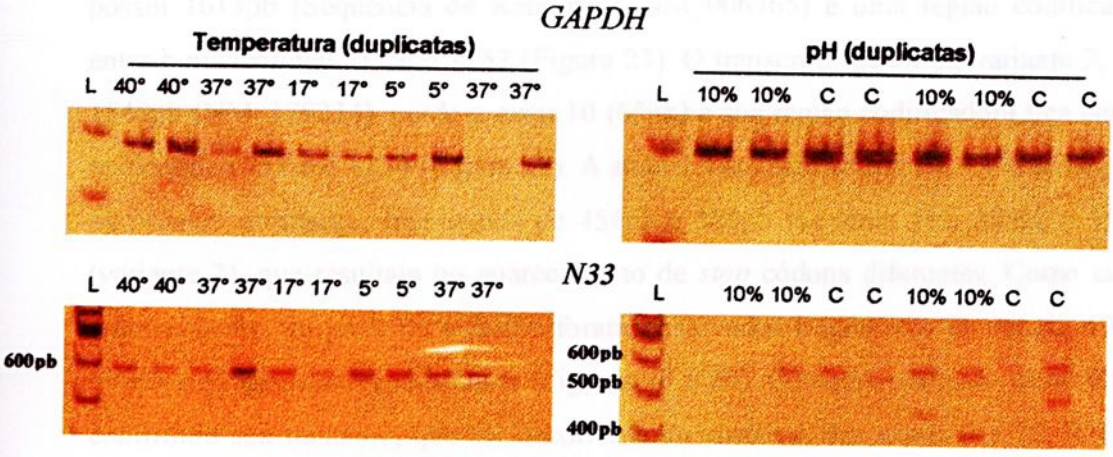


Figura 20. Géis de poliacrilamida com produtos de amplificação do gene *GAPDH* e com produtos de 400pb, 490pb e 600pb do gene *N33* na linhagem Siha.

O produto de *RIPK2* é uma quinase serina treonina que interage com o receptor do fator de necrose tumoral alfa (TNFR-1). Possui 540 resíduos e, além do domínio quinase, apresenta um domínio de recrutamento de caspase. O mRNA contém 1898 nucleotídeos (Seqüência de Referência NM_003821) e os *primers* utilizados para sua amplificação foram desenhados entre os exons 1 e 4, para gerar produtos com 500pb e 350pb (W.A. Silva Junior, comunicação pessoal). Entretanto, a busca por homologia realizada recentemente com o BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) revelou, para amplificação com esses *primers*, fragmentos possíveis de 456pb e 302pb (Figura 21). No presente trabalho, o fragmento maior foi discordante e exibiu aproximadamente 500pb (Figura 18). A análise com a ferramenta BLAT (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat), utilizando a mesma seqüência NM_003821, mostrou ESTs (BM 923968 e CB 140789) com perda do exon 2 (Figura 22), que possui 154pb. A perda desse exon, que explica o fragmento menor, não permite a manutenção da matriz de leitura (*frame* 2 no exon 2 e *frame* 3 no exon 3) e leva ao aparecimento de um *stop* códon 69pb *downstream*.

O gene *N33* é um candidato a supressor de tumor cuja região carboxila terminal pode ser afetada por *splicing* alternativo. O transcrito maior ou variante 1 possui 1613pb (Seqüência de Referência NM_006765) e uma região codificadora entre o nucleotídeo 211 e o 1257 (Figura 23). O transcrito menor ou variante 2, com 1548pb (NM_178234), perde o exon 10 (65pb) e sua região codificadora fica entre o nucleotídeo 211 e o 1254 (Figura 24). A análise realizada com o BLAT indicou, para os *primers* utilizados, fragmentos de 454pb e 389pb (variante 1) e 389pb e 298pb (variante 2), que resultam no aparecimento de *stop* códons diferentes. Como citado anteriormente, no presente trabalho foram observados fragmentos de 660pb, 490pb, 400pb e 310pb, aproximadamente (Figuras 19 e 20). O seqüenciamento desse último confirmou seu tamanho, que foi decorrente da ausência dos exons 9 e 10. RNAs e ESTs humanos com perda desses dois exons já foram descritos para o gene *N33* (Figura 25), o que deve alterar a extremidade correspondente da proteína e levar à

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

adição de apenas mais dois códons antes do aparecimento de um códon de terminação.

Como previamente citado, em outros seis genes (*DHX15*, *DKFZp434O0213*, *ERAL1*, *FUS*, *RSN* e *SMARCB1*), um ou mais fragmentos não apresentaram o tamanho previsto em qualquer das amostras analisadas. A utilização das ferramentas BLAST e BLAT confirmou os tamanhos esperados, mas também evidenciou a presença de mRNAs e ESTs com deleções e inserções na região amplificada. O seqüenciamento de um dos fragmentos de *RSN* (282pb) confirmou o seu tamanho e a análise por BLAT revelou a ausência dos exons 9 e 10, o que não acarreta mudança na matriz de leitura (Figura 26).

De maneira geral, as mudanças de intensidade de bandas de interesse acompanharam a tendência observada na análise qualitativa (Figura 27). Entretanto, em função de sua sensibilidade, essa abordagem subestimou o efeito do estímulo, em alguns casos. Em outros, superestimou o efeito (Figura 28).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

ggcacgaggG TCAGCTCTGG TTCGGAGAAG CAGCGGCTGG CGTGGGCCAT CCGGGGAATG 60
GGCGCCCTCG TGACCTAGTG TTGCGGGGCA AAAAGGGTCT TGCCGGCCTC GCTCGTGCAG 120
GGGCGTATCT GGGCGCCTGA GCGCGGCGTG GGAGCCTTGG GAGCCGCCGC AGCAGGGGGC 180
ACACCCGGAA CCGGCCTGAG CGCCCGGGAC CATGAACGGG GAGGCCATCT GCAGCGCCCT 240
GCCCACCATT CCCTACCACA AACTCGCCGA CCTGCGCTAC CTGAGCCGCG GCGCCTCTGG 300
CACTGTGTCG TCCGCCCGCC ACGCAGACTG GCGCGTCCAG GTGGCCGTGA AGCACCTGCA 360
CATCCACACT CCGCTGCTCG ACAGTGAAAG AAAGGATGTC TTAAGAGAAG CTGAAATTTT 420
ACACAAAGCT AGATTTAGTT ACATTCTTCC AATTTTGGGA ATTTGCAATG AGCCTGAATT 480
TTTGGGAATA GTTACTGAAT ACATGCCAAA TGGATCATTA AATGAACTCC TACATAGGAA 540
AACTGAATAT CCTGATGTTG CTTGGCCATT GAGATTTCGC ATCCTGCATG AAATTGCCCT 600
TGGTGTAAAT TACCTGCACA ATATGACTCC TCCTTTACTT CATCATGACT TGAAGACTCA 660
GAATATCTTA TTGGACAATG AATTTCATGT TAAGATTGCA GATTTTGGTT TATCAAAGTG 720
GCGCATGATG TCCCTCTCAC AGTCACGAAG TAGCAAATCT GCACCAGAAG GAGGGACAAT 780
TATCTATATG CCACCTGAAA ACTATGAACC TGGACAAAAA TCAAGGGCCA GTATCAAGCA 840
CGATATATAT AGCTATGCAG TTATCACATG GGAAGTGTTA TCCAGAAAAC AGCCTTTTGA 900
AGATGTCACC AATCCTTTGC AGATAATGTA TAGTGTGTCA CAAGGACATC GACCTGTTAT 960
TAATGAAGAA AGTTTGCCAT ATGATATACC TCACCGAGCA CGTATGATCT CTCTAATAGA 1020
AAGTGGATGG GCACAAAATC CAGATGAAAG ACCATCTTTC TTAAAATGTT TAATAGAACT 1080
TGAACCAGTT TTGAGAACAT TTGAAGAGAT AACTTTTCTT GAAGCTGTTA TTCAGCTAAA 1140
GAAAACAAAG TTACAGAGTG TTTCAAGTGC CATTCACCTA TGTGACAAGA AGAAAATGGA 1200
ATTATCTCTG AACATACCTG TAAATCATGG TCCACAAGAG GAATCATGTG GATCCTCTCA 1260
GCTCCATGAA AATAGTGGTT CTCCTGAAAC TTCAAGGTCC CTGCCAGCTC CTCAAGACAA 1320
TGATTTTTTA TCTAGAAAAG CTCAAGACTG TTATTTTATG AAGCTGCATC ACTGTCCTGG 1380
AAATCACAGT TGGGATAGCA CCATTTCTGG ATCTCAAAGG GCTGCATTCT GTGATCACAA 1440
GACCACTCCA TGCTCTTCAG CAATAATAAA TCCACTCTCA ACTGCAGGAA ACTCAGAACG 1500
TCTGCAGCCT GGTATAGCCC AGCAGTGGAT CCAGAGCAAA AGGGAAGACA TTGTGAACCA 1560
AATGACAGAA GCCTGCCTTA ACCAGTCGCT AGATGCCCTT CTGTCCAGGG ACTTGATCAT 1620
GAAAGAGGAC TATGAACTTG TTAGTACCAA GCCTACAAGG ACCTCAAAAG TCAGACAATT 1680
ACTAGACACT ACTGACATCC AAGGAGAAGA ATTTGCCAAA GTTATAGTAC AAAAATTGAA 1740
AGATAACAAA CAAATGGGTC TTCAGCCTTA CCCGGAAATA CTTGTGGTTT CTAGATCACC 1800
ATCTTTAAAT TTACTTCAAA ATAAAAGCAT GTAAGTGACT GTTTTTCAAG AAGAAATGTG 1860
TTTCATAAAA GGATATTTAT Aaaaaaaaaa aaaaaaaa 1898

Figura 21. Seqüência do mRNA do gene *RIPK2* (NM_003821). Em vermelho, as junções dos 11 exons, em cinza a região codificante (nucleotídeos 212-1834), que inclui os domínios quinase (nucleotídeos 272-1072) e recrutamento de caspase (nucleotídeos 1517-1783). As regiões de anelamento de *primers* estão sublinhadas e, em azul, está a seqüência nucleotídica do exon 2 que sofre *splicing* alternativo, determinando a formação de produtos de 456pb e 302pb. O códon de iniciação e os *stop* códons estão assinalados em verde.



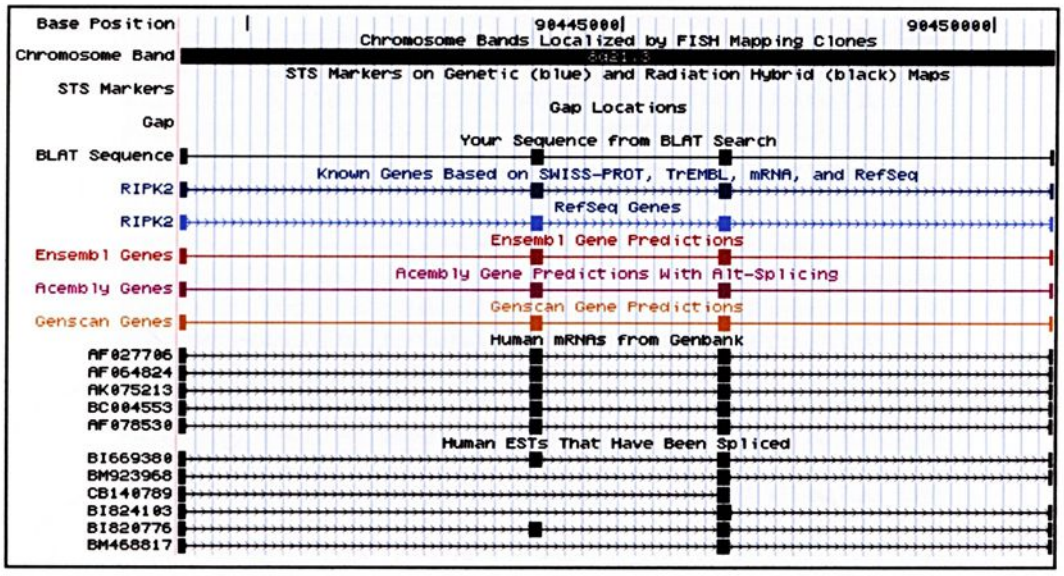


Figura 22. Gráfico obtido com a ferramenta BLAT para o fragmento entre *primers* da seqüência NM_003821 do gene *RIPK2*. Os *primers* são complementares aos exons 1 e 4 (extremidades da seqüência submetida a análise).

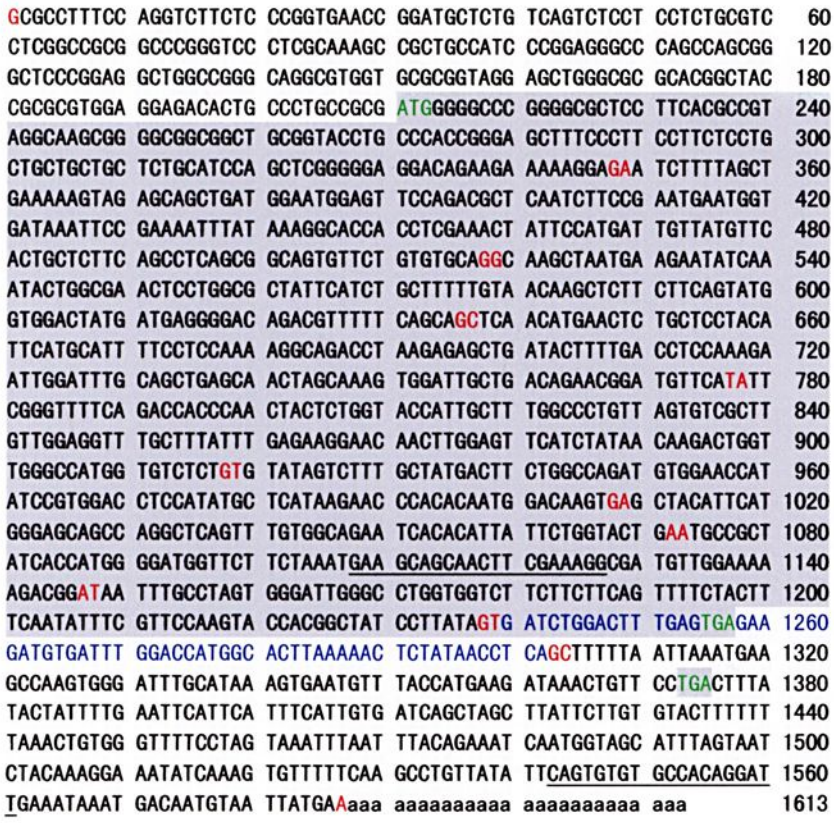


Figura 23. Seqüência do mRNA do gene *N33* variante 1 (NM_006765). Em vermelho as junções dos 11 exons, em cinza a região codificadora (nucleotídeos 211-1257). As regiões de anelamento de *primers* estão representadas por sublimado e, em azul, está a seqüência do exon 10 que sofre *splicing* alternativo, determinando a formação de produtos de 454pb e 389pb. O códon de iniciação e os *stop* códons estão assinalados em verde.



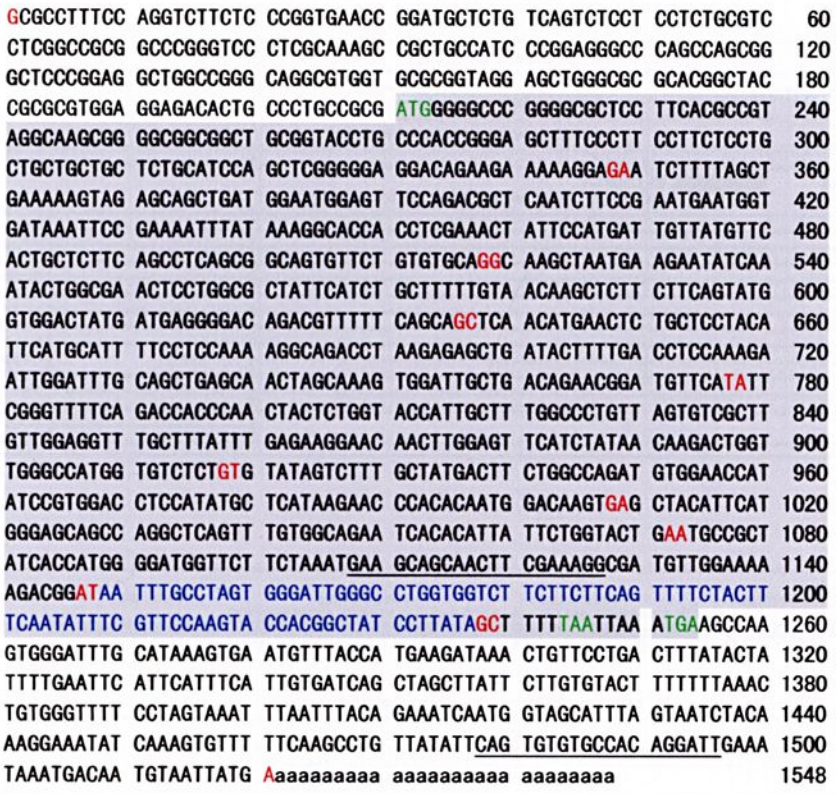
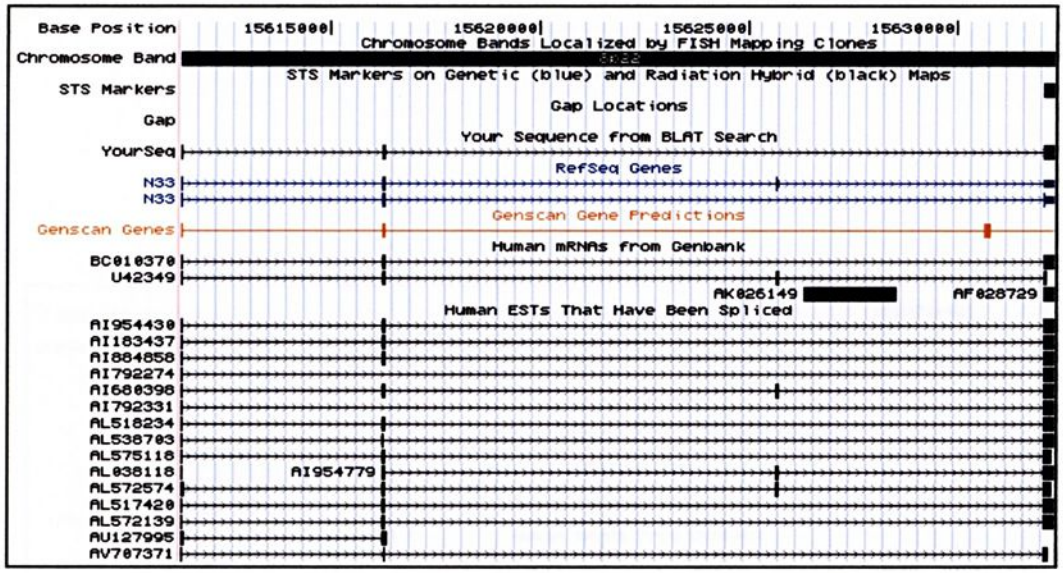


Figura 24. Seqüência do mRNA do gene *N33* variante 2 (NM_178234). Em vermelho, estão as junções dos 10 exons, em cinza a região codificadora (nucleotídeos 211-1254). As regiões de anelamento de *primers* estão sublinhadas e, em azul, está a seqüência do exon 9, que pode estar ausente, determinando a formação de produtos de 389pb e 298pb. O códon de iniciação e os *stop* códons estão assinalados em amarelo.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

A



B

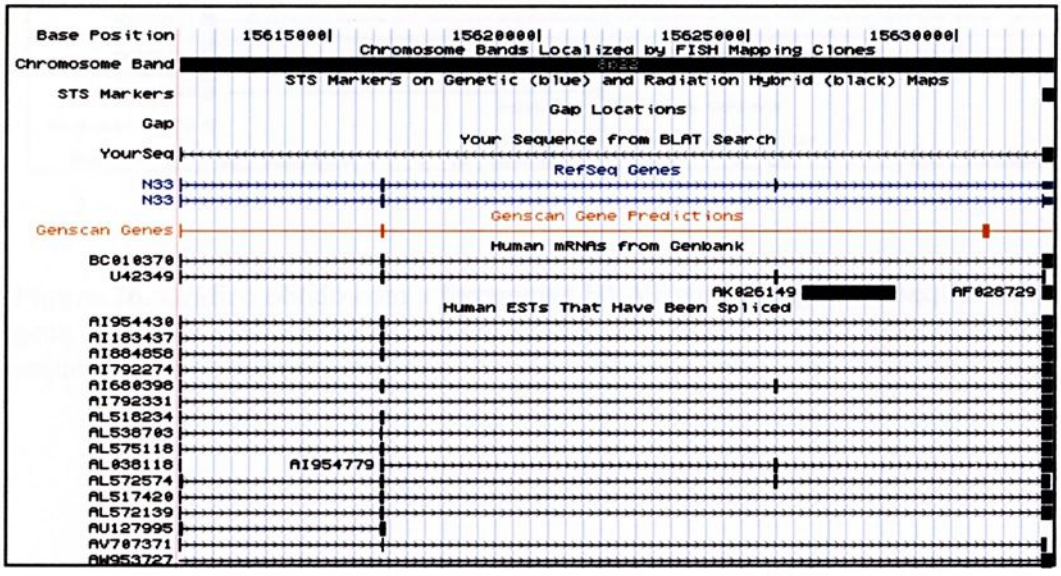


Figura 25. (A) Gráfico obtido com a ferramenta BLAT para o fragmento entre *primers* da seqüência NM_006765 do gene *N33*. Os *primers* são complementares aos exons 8 e 11 (extremidades da seqüência submetida para análise). (B) Gráfico obtido para o fragmento seqüenciado.

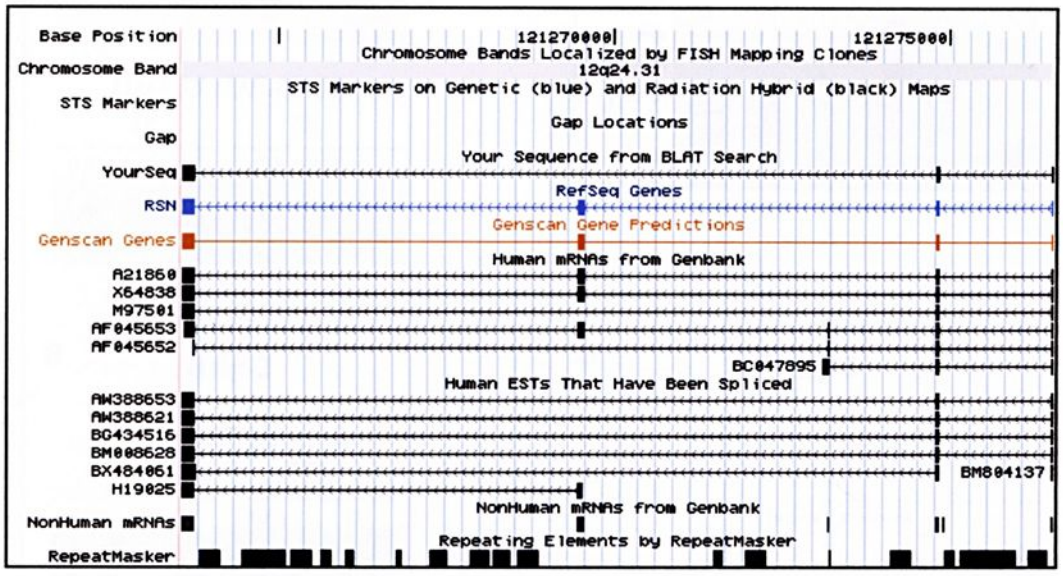


Figura 26. Gráfico obtido com a ferramenta BLAT para o fragmento seqüenciado do gene *RSN*. Os *primers* são complementares aos exons 7 e 11 (extremidades da seqüência submetida para análise).

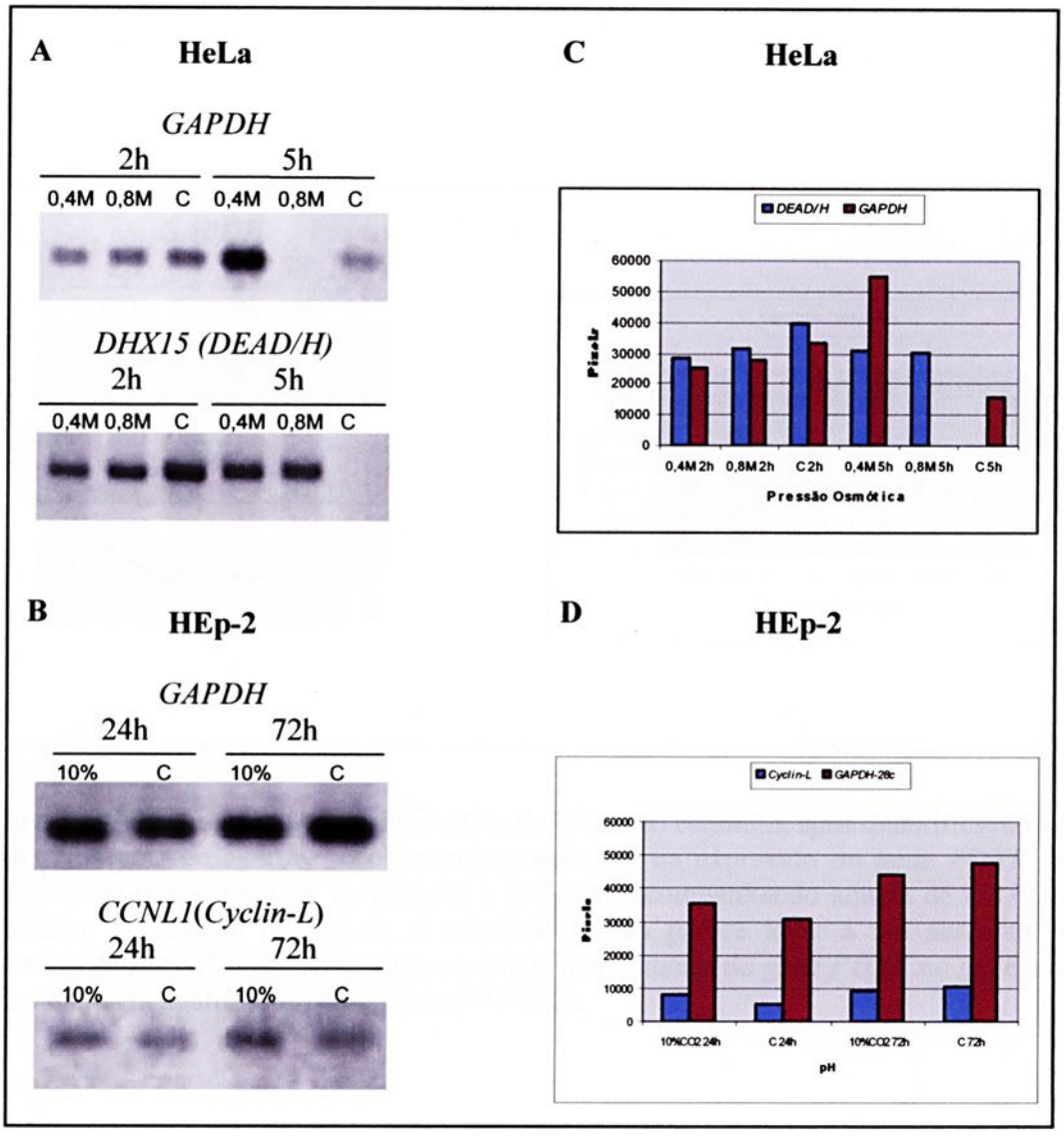


Figura 27. As mudanças qualitativas na intensidade das bandas de géis de agarose acompanharam a tendência observada na análise semi-quantitativa. A e B mostram fragmentos amplificados dos genes *DHX15* e *CCNL1* (com seus correspondentes controles *GAPDH*-28 ciclos) para o experimento de pressão osmótica (HeLa) e pH (Hep-2), respectivamente. C e D representam os valores de quantificação por *pixels* dessas bandas.

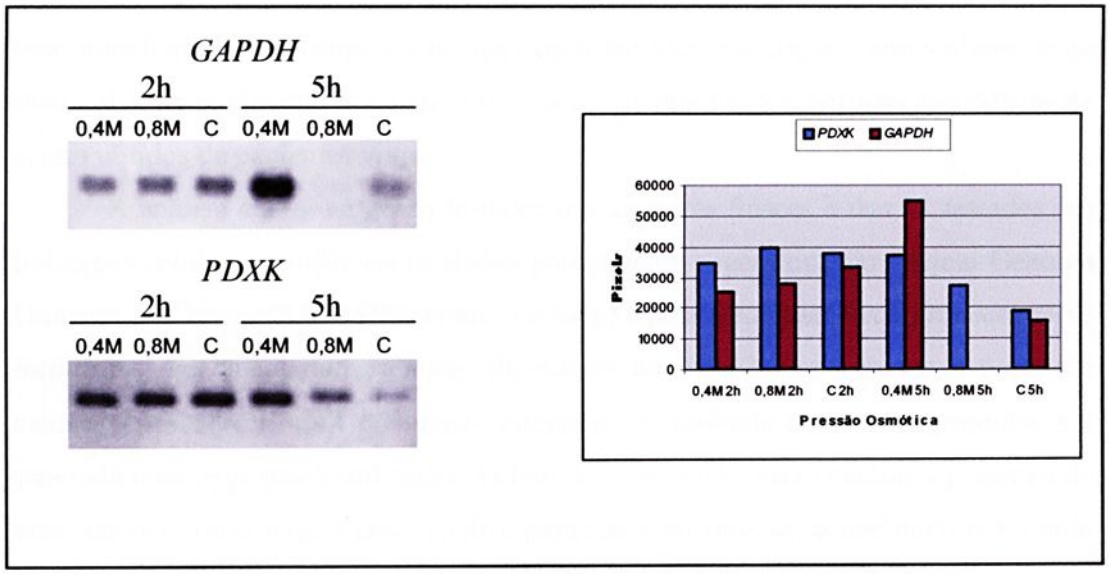


Figura 28. Subestimativa e superestimativa do efeito do estimulo, após quantificação por *pixels*. Nos géis de agarose, é observada constância na expressão do gene *PDXK* em condições de 0.4 e 0.8M/2h de glicerol e 0.4M/5h, acompanhando aquela de *GAPDH*. Entretanto, na análise por *pixels*, a condição 0.8/2h parece levar a um aumento de expressão do gene PDXK. Além disso, a banda mais intensa do gene *PDXK* no gel é a do controle 2h. Na análise por *pixels*, é a de 0.8M/2h.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi analisada a expressão de 32 genes com *splicing* alternativo em amostras obtidas de autópsias, tumores e margens cirúrgicas procedentes de tecidos de cabeça e pescoço e de linhagens celulares. Os resultados mostraram que os tecidos *post-mortem* humanos podem fornecer RNA intacto e de boa qualidade, que permite a aplicação de diferentes abordagens moleculares. Esse material é especialmente importante nos casos em que tecidos normais são difíceis de serem obtidos de pacientes vivos.

A análise dos nove genes testados em amostras frescas e dos 21 testados em linhagens celulares confirmou os dados previamente sugeridos pelo Projeto Genoma Humano do Câncer (FAPESP/Instituto Ludwig) e pela *Head and Neck Transcriptome Initiative*, que detectaram *splicing* alternativo em seqüências geradas a partir de cabeça e pescoço. Em 14 dos genes estudados, a ausência de um dos produtos era esperada com os *primers* utilizados. O fato dessa estratégia não excluir a presença de uma das isoformas requer nova análise para sua confirmação, o que poderia ter sido evitado se os *primers* tivessem sido desenhados para gerar os dois tipos de transcritos. Entretanto, como em 18 genes uma das formas de *splicing* era potencialmente nova, a abordagem proposta permitiu a validação de dez delas, sem a interferência de competição por reagentes durante a PCR.

Nenhum dos produtos mostrou-se exclusivo de célula tumoral e, em alguns casos, o tumor e a margem apresentaram o mesmo padrão de expressão. Embora a cancerização de campo (Slaughter *et al*, 1953) proposta para explicar o desenvolvimento de múltiplos tumores primários e a recorrência do câncer seja bem aceita para a tumorigênese de cabeça e pescoço, é pouco provável que todas as amostras de margens cirúrgicas nesses casos estivessem comprometidas. Uma explicação mais coerente é que os tecidos do sítio anatômico considerado expressaram o gene estudado enquanto as autópsias, por problemas inerentes à colheita, não revelaram essa expressão. Deve ser citado também que, para alguns

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

genes, o grupo de amostras positivas e negativas variaram, reforçando a idéia de que ocorreram dificuldades de amplificação em alguns casos, porém sem um padrão definido. De qualquer maneira, foi evidente a ausência ou nível baixo de expressão desses genes em amostras frescas de laringe, o que sugere atividade tecido-específica.

Fatores de estresse e expressão gênica

A adaptação da célula a estímulos externos é importante e deve ocorrer por meio de vias complexas de transdução de sinais. Entre os estímulos externos, estão agentes físicos e físico-químicos, que influenciam a expressão de determinados genes, ativando ou inibindo a síntese de transcritos distintos e, em alguns casos, atuando sobre o padrão de *splicing* (Wei & Roepe, 1994; Gorner *et al.*, 1998; Katschinski *et al.*, 1999; Takashi *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Obata *et al.*, 2000; Yasuhito *et al.*, 2000; Theuns & Van Broeckhoven, 2000; Sonna et al., 2002). Entre as respostas celulares a mudanças externas está a apoptose, que pode ser observada após estresse fisiológico, como carência de fatores de crescimento, hipóxia ou calor (Schmaltz *et al.*, 1998; Takasu *et al.*, 1998).

Os resultados do presente trabalho sugeriram que, dos três fatores físicos e físico-químicos utilizados, a temperatura foi o fator de estresse com maior influência sobre a expressão gênica. Esse resultado não surpreende considerando que o ser humano é um organismo homeotermo e emprega uma grande quantidade de energia para manter constante a sua temperatura corporal e, portanto, suas funções fisiológicas. Esse grande investimento energético assegura, entre outras coisas, seu crescimento e desenvolvimento normais. É evidente, portanto, que alterações nesse padrão devem causar modificações profundas.

Na literatura, existem vários exemplos do efeito da temperatura sobre a expressão gênica. Por exemplo, Katschinski *et al.* (1999) verificaram indução da expressão do *TNFα* (*tumor necrosis factor alpha*) por hipertermia, o que foi, por sua vez, diretamente correlacionado com a apoptose em linhagens celulares de leucemia mieloblástica. Esses dados abrem a possibilidade de utilização da hipertermia com a

unesp

radioterapia ou a quimioterapia em câncer, localmente ou sistemicamente. Entretanto, os mecanismos envolvidos na apoptose desencadeada por calor não são bem entendidos, o que torna a importância de seu potencial clínico ainda incerta.

A hipertermia também tem sido relacionada com o bloqueio da invasão do tumor nos tecidos vizinhos e da formação de metástases. Sato *et al.* (1999) observaram que essa condição suprime a expressão da metaloproteinase MT1-MMP, uma enzima que tem um importante papel na degradação de componentes da matriz extracelular e que está presente em níveis elevados em carcinomas invasivos.

Não apenas a hipertermia mas também a hipotermia induz respostas celulares causando, por exemplo, retardo no crescimento celular (Delmas *et al.*, 1995) e aumento na expressão de genes como o *IL-8* e o *WAF1* (Gon *et al.*, 1998; Ohnishi *et al.*, 1998). Tem sido igualmente referido que o estresse causado por baixas temperaturas eleva os níveis de expressão de proteínas de choque térmico, de proteínas de ligação ao RNA, de certas subunidades do complexo ATPase mitocondrial e de vários genes ainda não identificados (Holland *et al.*, 1993; Danno *et al.*, 1997; Nishiyama *et al.*, 1997a; 1997b; Madden *et al.*, 1997; Ohsaka *et al.*, 2000).

Ars *et al.* (2000) verificaram, por meio de choque com baixas temperaturas, a inserção de um exon críptico de 31pb no mRNA do gene da neurofibromatose tipo1 (*NF1*). Esse *splicing* alternativo não foi específico do tipo celular e não foi induzido por outras condições de estresse como hipertermia ou hiperosmolaridade.

Outro caso de *splicing* alternativo dependente da temperatura foi descrito em fibroblastos de um paciente com síndrome de Ehlers-Danlos (EDS) tipo VII (Weil *et al.*, 1989). Esse indivíduo apresentou uma mutação no último nucleotídeo do exon 6 do gene *COLIA1*, o que resulta em *splicing* aberrante e transcrito não detectável a 31°C mas com expressão gradualmente elevada em condições de hipertermia. Kimura *et al.* (1996) também descreveram mudanças no processo de *splicing* do gene *Testosterone-Repressed Prostate Message-2* (*TRPM-2*) logo após o tratamento de ratos com temperaturas elevadas, resultando em RNAs mensageiros sem o exon 5.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Mesmo em organismos pecilotermos, o efeito térmico sobre o *splicing* já foi detectado, o que fala a favor de um mecanismo geral com atuação sobre a maquinaria celular envolvida nesse processo. Por exemplo, Kinoshita *et al.* (2001), estudando a diatomácea *Chaetoceros compressum*, observaram que o gene *HI-5a*, após estresse por hipertermia, produz dois mRNAs por *splicing* alternativo. O primeiro produto desses mRNAs é uma proteína com domínio catalítico característico de protease semelhante à tripsina, enquanto, no segundo, a inserção de uma seqüência de 112 nucleotídeos com um códon de terminação na sua região central determina a ausência desse domínio.

No presente trabalho, o gene *RIPK2* se destacou nas respostas à temperatura. O seu fragmento de 500pb mostrou expressão elevada a 40°C e diminuída a 17°C e 5°C. O fragmento menor de 302pb, por outro lado, exibiu um comportamento inverso nas condições hipotérmicas. O produto do *RIPK2* é um potente indutor de apoptose e ativador do fator NFκβ, e também um componente do padrão de sinalização do TNFR-1 (receptor do fator de necrose tumoral alfa). Essa proteína encontra-se reduzida durante a diferenciação de células musculares e existem evidências de que sua expressão pode estar elevada em caquexia, uma condição caracterizada por diminuição de massa muscular e presente em pacientes com câncer (Munz *et al*, 2002).

Mudanças em outras condições homeostáticas, como pressão osmótica, também afetaram o padrão normal de expressão e/ou de *splicing* alternativo do gene *RIPK2*. Chen & Clark (2003) demonstraram que o enrolamento do domínio de recrutamento de caspase desse gene é diretamente dependente da concentração molar de sal presente no meio celular. Também observaram que concentrações baixas de sais (menores que 200mM) diminuem a estabilidade da proteína e vice-versa. Se a modificação do produto do gene fizer parte de uma resposta mais ampla ao ambiente, é possível que o aumento ou a diminuição de solutos provoque, de forma similar, alterações nas estruturas terciárias do pré-mRNA e no seu processamento normal.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Um exemplo de resposta ampla da célula à pressão osmótica é dado pelo trabalho de van der Houven van Oordt *et al.* (2000). Esses autores observaram, em linhagens celulares submetidas a estresse por choque osmótico, um acúmulo de hnRNP A1 (ribonucleoproteína heterogênea nuclear A1) no citoplasma e sua concomitante diminuição no núcleo, resultando em mudanças no padrão de *splicing* de um gene *reporter*. A hnRNP A1 é uma proteína envolvida no processamento de transcritos primários e pode regular o *splicing* alternativo *in vitro* e *in vivo* de diferentes RNAs dependendo de sua concentração (Cáceres *et al.*, 1994).

Além da temperatura e da pressão osmótica, o pH externo também atua sobre a expressão de alguns genes e pode regular o *splicing* alternativo. Hayakawa *et al.* (1998) observaram que, em condições de acidez, um fator regulador negativo afeta o *splicing* alternativo de um exon da subunidade γ da ATP sintetase humana em linhagem celulares de fibrossarcoma. Esse *splicing*, que é tecido-especifico, leva à síntese de duas isoformas, uma presente em tecido muscular (sem o exon 9) e outra presente nos demais tecidos (com o exon 9).

Mauduit *et al.* (1999) verificaram que a acidificação do meio de cultura afeta igualmente o *splicing* do RNA do fator da célula tronco (SCF), um regulador essencial da espermatogênese. Esse fator existe em duas isoformas (solúvel ou ligada à membrana plasmática) que são geradas por *splicing* alternativo do exon 6. Em testículos de camundongos, o SCF é regulado durante o desenvolvimento, predominando a isoforma solúvel (com o exon 6) nas gônadas fetais e neonatais, posteriormente substituída pela isoforma ligada à membrana (que não inclui o exon 6). A síntese dessa última pode ser induzida *in vitro* nas células de Sertoli por diminuição do pH para 6.3 no meio de cultura, enquanto a elevação do pH para 7.6 favorece a síntese da primeira isoforma. Esse achado indica que mesmo pequenas mudanças de pH no micro-ambiente celular podem ter influência no *splicing* e, portanto, na expressão gênica.

unesp

Mudanças de temperatura talvez sejam mais traumáticas para a célula que mudanças na pressão osmótica e pH e as respostas induzidas àquelas compreendam um recurso extremo para sobrevivência ante tal circunstância. É provável que o controle da osmolaridade e da acidez esteja centrado, principalmente, em modificações dos canais iônicos e no transporte de eletrólitos. O controle da temperatura, por sua vez, pode resultar em uma resposta mais abrangente que, dependendo se hipertermia ou hipotermia, deve envolver grandes mudanças no padrão de expressão gênica. Entre essas mudanças estão, provavelmente, a ativação de *clusters* de genes normalmente transcritos em níveis basais (como chaperonas e ubiqüitinas) o aumento ou a diminuição da atividade metabólica geral (o que inclui a maquinaria de transcrição e tradução) e, indiretamente, o controle sobre a pressão osmótica e o pH, tendo em consideração que a solubilidade dos metabólitos no meio é diretamente dependente da temperatura (Sonna *et al.*, 2002).

Nas linhagens estudadas no presente trabalho, foram observadas novas isoformas em dez genes (*AF5Q31, TUCAN, PDCD8, TRRAP, PTK2, EWSR1, TRIP11, PFDN5, MKNK1* e *CCNL1*), cuja análise foi repetida várias vezes para a maioria deles. Outro resultado interessante foi relativo ao gene *N33*, um candidato a supressor de tumor, que sempre mostrou um padrão de bandas diferente na linhagem Siha em relação às outras linhagens. Essas últimas, por outro lado, também mostraram bandas com tamanhos de fragmentos não esperados pela avaliação realizada com o BLAST. O seqüenciamento de cada uma deverá esclarecer o porquê dessas diferenças.

Em seis dos 33 genes, foi observada a presença simultânea de duas (ou mais) isoformas, o que supõe, na situação mais simples, a ocorrência constitucional de *splicing* alternativo no mesmo tecido. Para cinco deles, a banda correspondente a uma das isoformas exibiu intensidade muito maior. Esse resultado parece ser decorrente, no caso do gene *RIPK2*, dos estímulos externos empregados. Para outros genes, as duas isoformas eram aparentemente excludentes, talvez em função de *splicing* tecido-específico, como nos casos de *DHX15, EMS1, FN1* (duas variantes), *NUP54, PDXK,*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

RSN e *VAV2*. Entretanto, nas situações *in vitro*, não deve ser excluída a possibilidade de competição dos fragmentos em relação aos componentes da reação de PCR e o resultado não refletir a situação *in vivo*.

A análise mais detalhada dos sítios de *splicing* no caso dos genes *RIPK2*, *N33* e *RSN* revelou possível mudança de matriz de leitura com aparecimento de um *stop* códon prematuro em uma das isoformas do *RIPK2* e perda de segmentos nos outros dois genes. A mudança na matriz de leitura tem um efeito drástico na proteína e deve inativar seu domínio quinase. Seria interessante confirmar por seqüenciamento se não ocorre a utilização de um sítio de *splicing* alternativo próximo que impeça essa mudança.

As mudanças de intensidade de bandas de interesse na análise semiquantitativa dos genes acompanharam a tendência observada na análise qualitativa, o que aumenta a confiabilidade dos resultados. O programa de análise de *pixels* para intensidade de cinza (preto a branco) mostrou-se, em função de sua sensibilidade, uma ferramenta muito útil. Entretanto, os resultados obtidos nem sempre acompanharam aquele observado na análise qualitativa, ou visual, das bandas presentes nos géis. Certamente, a introdução do erro 'manual' na seleção das s que determinam os contornos das bandas no gel foi o fator mais importante para as diferenças observadas com essa análise. O desenvolvimento de uma outra ferramenta que utilize um critério unificador e automatizado na determinação dos contornos das bandas deve resultar na redução de erros.

O presente trabalho teve com objetivo geral a análise de expressão gênica e *splicing* alternativo em células neoplásicas, um assunto bastante amplo e complexo. Nos últimos anos, duas hipóteses acoplando esses mecanismos foram propostas: o modelo de recrutamento e o modelo de elongação. Em relação ao primeiro, existem muitas evidências indicando que os promotores gênicos são responsáveis pelo recrutamento de fatores de *splicing* (tais como proteínas SR) para o sítio de transcrição. O fato do co-ativador transcricional p52 interagir diretamente com o fator de *splicing* SF2/ASF estimulando o *splicing* do pré-mRNA é consistente com esse

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

modelo (Ge *et al*, 1998). Além disso, algumas proteínas atuam em ambos os processos, como o ativador transcricional do papilomavírus humano (Lai *et al.*, 1999) o PGC-1 e o produto do gene *WT1*. Esse último é um fator transcricional fundamental para o desenvolvimento do rim e suas isoformas interagem com o fator essencial de *splicing* U2AF^{65} *in vitro* (Davies *et al.*, 1998). O co-ativador de transcrição PGC-1 é um regulador termogênico que também apresenta motivos característicos de fator de *splicing* (Monsalve *et al.*, 2000).

A própria RNA polimerase II (RNA pol II) parece ser responsável pelo recrutamento de outras proteínas relacionadas com *splicing*, provavelmente pelo seu domínio carboxila terminal (CTD). Entre elas estão o co-fator de *splicing* Prp40, a isomerase Ess1 e o fator de elongação CA150 (Morris & Greenleaf, 2000; Myers *et al*, 2001 e Carty *et al*, 2000). O domínio CTD consiste em múltiplas repetições de uma seqüência consenso que sofre ciclos de fosforilação e defosforilação durante cada evento de transcrição e seu truncamento causa alterações no processamento do RNA (Dubois *et al.*, 1997; McCracken *et al.*, 1997).

Um modelo alternativo, mas não exclusivo, sugere que o promotor gênico controla o *splicing* alternativo via regulação da taxa de elongação ou processividade da RNApol II. A processividade da polimerase é definida como a capacidade de elongação do transcrito através de sítios onde a enzima mostra tendência a pausar ou a terminar a transcrição prematuramente (Nogués *et al.*, 2003).

Uma baixa processividade favoreceria a inclusão de exons alternativos enquanto o inverso levaria à sua exclusão (Figura 30). Essa exclusão dependeria da presença de um sítio 3' mais forte no íntron *downstream* que no íntron *upstream*. Muitas evidências a favor desse modelo já foram obtidas a partir da análise do efeito de fatores *cis* e *trans* em células de mamíferos transfectadas com minigenes carregando o exon EDI da fibronectina. Esse exon pode sofrer *splicing* e contém uma seqüência estimuladora que é alvo de proteínas SR (Nogués *et al.*, 2002). Entre os fatores *cis* que regulam o *splicing* nessa condição experimental está a compactação da cromatina que, durante a divisão celular, leva à diminuição da processividade da

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

RNApol II. Entre os elementos *trans* estão vários fatores de crescimento, algumas drogas e a própria matriz extracelular (Nogués *et al*, 2003).

Em relação a esse segundo modelo, existem dados mostrando que a temperatura e a concentração salina afetam a taxa de elongação da polimerase (Goldring *et al.*, 1992). Outras evidências indicam que o *splicing* é interrompido durante o estresse térmico, concomitantemente à inibição da fosforilação ativadora do domínio CTD da polimerase (Yost & Lindquist, 1986; Dubois *et al.*, 1997).

É interessante que seis genes estudados (*CSDA, DKFZ434O0213, ERAL1, N33, TRRAP* e *TSPAN*) mostraram expressão mais elevada de uma das isoformas, sugerindo, por exemplo, a presença de sítios de *splicing* fortes nos íntrons envolvidos. É possível, porém, que alguns dos fragmentos sejam, na verdade, inespecíficos, o que poderá ser confirmado após seu seqüenciamento. No caso do gene *RIPK2*, durante o estresse por hipertermia, a isoforma maior exibiu diminuição de expressão, o que pode significar variação da processividade da RNApol II dependendo da condição. O questionamento do significado desses resultados e daqueles relativos à função das novas isoformas validadas no presente trabalho abrem novas possibilidades de análises que podem contribuir para o entendimento do *splicing* alternativo em condições normais e neoplásicas.



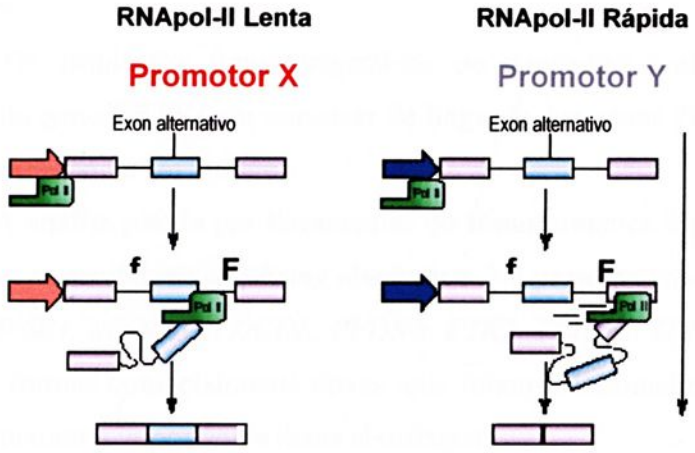


Figura 29. Modelos da elongação da RNApol II. O promotor X promove uma processividade lenta da RNApol II, que leva à eliminação do íntron *upstream* e à inclusão do exon alternativo. O promotor Y promove uma processividade rápida da RNApol II. Nessa condição, o sítio aceptor forte (**F**) do íntron *downstream* compete com o sítio aceptor fraco (**f**) do íntron *upstream* resultando na exclusão do exon alternativo. Modificado de Cáceres & Kornblihtt, 2002.

6. CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas no presente trabalho estão relacionas a seguir:

1- Tanto o RNA como os cDNAs obtidos a partir de amostras de autópsia não apresentaram degradação significativa, reforçando assim o seu potencial em estudos moleculares.

2- Os resultados foram sugestivos de expressão preferencial ou tecido especifica do gene *EWSR1* em amostras de língua e dos genes *TRIP11* e *TRRAP* em tonsila e sua ausência em laringe.

3- A análise prévia por ferramentas de Bioinformática é poderosa na seleção de novos genes candidatos a *splicing* alternativo. No presente trabalho, dez (*AF5Q31, CCNL1, EWSR1, MKNK1, PDCD8, PFDN5, PTK2, TRIP11, TRRAP e Tucan*) de 20 genes com formas potencialmente novas, que foram selecionados por estudos desse tipo, confirmaram a importância dessa abordagem.

4- As mudanças de temperatura provocaram mais alterações na expressão gênica que as de pressão osmótica e pH.

5- Na avaliação do choque térmico, os genes aparentemente sensíveis à hipertermia foram *AF5Q31, NUP54, PDXK, PFDN5* e *RIPK2* e à hipotermia foram *DHX15* e *RIPK2*, sendo a temperatura de 17°C mais drástica no seu efeito que a de 5°C. Os genes *CSDA* e *RIPK2* e o gene *FUS* mudaram sua expressão sob estresse osmótico e sob estresse ácido, respectivamente.

6- De maneira geral, as isoformas dos genes analisados apresentaram o mesmo comportamento sob choque térmico, osmótico e ácido, sendo o gene *RIPK2* uma das exceções a essa regra. O splicing alternativo desse gene parece ser afetado por temperatura e pressão osmótica.

7- As mudanças de expressão gênica avaliadas por análise semiquantitativa de imagens acompanharam a tendência observada da análise qualitativa de géis de

unesp

agarose e poliacrilamida obtidos após eletroforese na fase exponencial. O programa de imagens mostrou-se, em função de sua sensibilidade, uma ferramenta muito útil. Entretanto, os resultados obtidos nem sempre acompanharam aquele observado na análise qualitativa. Certamente, a introdução do erro 'manual' na seleção das coordenadas que determinam os contornos das bandas no gel foi o fator mais importante para as diferenças observadas com essa análise.

unesp

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing; 3rd ed. 1994.

ARS, E.; SERRA, E.; DE LA LUNA, S.; ESTIVILL, X.; LAZARO, C. Cold shock induces the insertion of a cryptic exon in the neurofibromatosis typel (NF1) mRNA. *Nucleic Acid Res.*, v. 28, no 6, p. 1307-1312, 2000.

BLACK, D.L. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell.*, v. 103, p. 367-370, 2000.

BONEN, L. Trans-splicing of pre-mRNA in plants, animals, and protists. *FASEB J.*, v. 7, no. 1, p. 40-46, 1993.

BRUDNO, M.; GELFAND, M.S.; SPENGLER, S.; ZORN, M.; DUBCHAK, I.; CONBOY, J.G. Computational analysis of candidate intron regulatory elements for tissue-specific alternative pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.*, v. 29, no. 11, p. 2338-2348, 2001.

BUCHER, E.A; DHOOT, G.K; EMERSON, M.M; OBER, M; EMERSON, P.E. Structure and evolution of the alternatively spliced fast troponin T isoform gene. *J Biol Chem.*, v. 274, no. 25, p. 17661-17670, 1999.

CÁCERES, J.F; STAMM, S; HELFMAN, D.M; KRAINER, A.R. Regulation of alternative splicing *in vivo* by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science*, v. 256 p. 1706-1709, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

CÁCERES, J.F; KORNBLIHTT, A.R. Alternative *splicing*: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet*, v. 18, no. 4, p. 186-193, 2002.

CARTY, S.M; GOLDSTROHM, A.C; SUNE, C GARCIA-BLANCO, M.A; GREENLEAF, A.L. Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II. Proc *Natl Acad Sci USA*, v. 97, no. 16, p. 9015-9020, 2000.

CAUDEVILLA, C; SERRA, D; MILIAR, A; CODONY, C; ASINS, G; BACH, M; HEGARDT, F.G. Natural trans-splicing in carnitine octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, no. 21, p. 12185-12190, 1998.

CAUDEVILLA, C; DA SILVA-AZEVEDO, L; BERG, B; GUHL, E; GRAESSMANN, M; GRAESSMANN, A. Heterologous HIV-nef mRNA trans-splicing: a new principle how mammalian cells generate hybrid mRNA and protein molecules. *FEBS Lett.*, v. 507, no 3, p. 269-279, 2001.

CHEN, B.P; LIANG, G; WHELAN, J; HAI, T. ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem.*, v. 269, no. 22, p. 15819-15826. 1994.

CHEN, Y.R; CLARK, A.C. Equilibrium and kinetic folding of an alpha-helical Greek key protein domain: caspase recruitment domain (CARD) of RICK. *Biochemistry*, v. 42 no. 20. p 6310-6320, 2003.

DANNO, S; NISHIYAMA, H; HIGASHITSUJI, H; YOKOI, H; XUE, J.H; ITOH, K; MATSUDA, T; FUJITA, J. Increased transcript level of RBM3, a member of the

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 236, p. 804-807, 1997.

DAVIES, R.C; CALVIO, C; BRATT, E; LARSSON, S.H; LAMOND, A.I; HASTIE, N.D. WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev.*, v. 12, no. 20, p. 3217-3225, 1998.

DELMAS, F; TROCHERIS, V; MURAT, J.C. Expression of stress proteins in cultured HT29 human cell-line: A model for studying environmental aggression. *Int J Biochem Cell Biol.*, v 27, p. 385-391, 1995.

DREYFUSS, G; MATUNIS, M.J; PINOL-ROMA, S; BURD, C.G. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.*, v 62, p. 289-321, 1993.

DUBOIS, M.F; VINCENT; M, VIGNERON, M; ADAMCZEWSKI, J; EGLY J.M; BENSAUDE, O. Heat-shock inactivation of the TFIIH-associated kinase and change in the phosphorylation sites on the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, no 4, p. 694-700, 1997.

EARLY, P; ROGERS, J; DAVIS, M; CALAME, K; BOND M; WALL, R; HOOD, L. Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell.* v. 20, no. 2, p. 313-319, 1980.

EUL, J; GRAESSMANN, M; GRAESSMANN, A. Experimental evidence for RNA trans-splicing in mammalian cells. *EMBO J*, v. 14, no. 13, p. 3226-3235, 1995.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

FUJIEDA, S; LIN, Y.Q; SAXON, A; ZHANG, K. Multiple types of chimeric germ-line Ig heavy chain transcripts in human B cells: evidence for trans-splicing of human Ig RNA. *J Immunol.*, v. 157. no. 8, p. 3450-3459, 1996.

GE, H; SI, Y; WOLFFE, A.P. A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2. *Mol Cell.*, v. 2, no. 6, p. 751-759, 1998.

GILBERT, W. Why genes in pieces? *Nature*, 271, no. 5645, p. 501, 1978.

GOLDSTROHM, A.C; GREENLEAF, A.L; GARCIA-BLANCO, M.A. Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing. *Gene*, v. 277, no. 1-2, p. 31-47. 2001.

GOLDRING, N.B; KESSLER, M; ALONI, Y. Parameters affecting the elongation block by RNA polymerase II at the SV40 attenuator 1 in vitro. *Biochemistry*, v. 31, no. 35, p. 8369-8376, 1992.

GON, Y; HASHIMOTO, S; MATSUMOTO, K; NAKAYAMA, T; TAKESHITA, I; HORIE, T. Cooling and rewarming-induced IL8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 MAP kinase-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 249, p. 156-160, 1998.

GORNER, W; DURCHSCHLAG, E; MARTINEZ-PASTOR, M.T; ESTRUCH, F; AMMERER, G; HAMILTON, B; RUIS, H; SCHULLER, C. Nuclear localization of the C_2H_2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.*, v. 12, p. 586-597, 1998.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

GRAVELEY, B.R. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, v. 9, p. 1197-1211, 2000.

GRAVELEY, B.R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.*, v. 17, no. 2, p.100-107, 2001.

HASHIMOTO, Y; ZHANG, C; KAWAUCHI, J; IMOTO, I; ADACHI, M.T; INAZAWA, J; AMAGASA, T; HAI, T; KITAJIMA, S. An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its induction by stress stimuli. *Nucleic Acids Res.*, v. 30, no. 11, p. 2398-406, 2002.

HAYAKAWA, M; ENDO, H; HAMAMOTO, T; KAGAWA, Y. Acid stimulation induces a negative regulatory factor that affects alternative exon selection in vitro in human ATP synthase gamma-subunit pre-mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 251, no. 2, p. 603-608, 1998.

HOLLAND, D.B; ROBERTS, S.G; WOOD, E.J; CUNLIFE, W.J. Cold shock induces the synthesis of stress protein in human keratinocytes. *J Inves Dermatol.*, v. 101, p. 196-199, 1993.

HUANG, Q; HU, J.K; LOHR, F; ZHANG, L; BRAUN, R; LANZEN, J; LITLE, J.B; DEWHIRTS, M.W; LI C.Y. Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy. *Cancer Res.*, v. 60, p. 3435-3439, 2000.

ISHIGURO, T; NAKAJIMA, M; NAITO, M; MUTO, T; TSURUO, T. Identification of genes differentially expressed in B16 murine melanoma sublines with different metastatic potentials. *Cancer Res.*, v. 56, no. 4, p. 875-879, 1996.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

KATSCHINSKI, D.M; ROBINS, H.I; SCHAD, M; FREDE, S; FANDREY, J. Role of tumor necrosis factor α in hyperthermia-induced Apoptosis of human leukemia cells. *Cancer Res.*, v. 59, p. 3404-3410, 1999.

KIMURA, K & YAMAMOTO, M. Modification of the alternative *splicing* process of testosterone-repressed prostate message-2 (TRPM-2) gene by protein synthesis inhibitors and heat shock treatment. *Biochem Biophys Acta*, v. 1307. p. 83-88, 1996.

KINOSHITA, S; KANEKO, G; LEE, J.H; KIKUCHI, K; YAMADA, H; HARA, T; ITOH, Y; WATABE S. A novel heat stress-responsive gene in the marine diatom Chaetoceros compressum encoding two types of transcripts, a trypsin-like protease and its related protein, by alternative RNA splicing. *Eur J Biochem.*, v. 268, no. 17, p. 4599-609, 2001.

KOHTZ, J.D; JAMISON, S.F; WILL, C.L; ZUO, P; LUHRMANN, R; GARCIA-BLANCO, M.A; MANLEY, J.L. Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature*, v. 10, no. 368, p. 119-124, 1994.

KRAMER, A. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem.*, v. 65, p. 367-409, 1996.

KRAWCZAK, M; REISS, J; COOPER, D.N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet.*, v. 90, no. 1-2, p. 41-54, 1992.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

LADD, A.N; CHARLET, N; COOPER, T.A. The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol.*, v. 21, p. 1285-1296, 2001.

LAI, M.C; THE, B.H; TARN, W.Y. A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *J Biol Chem.*, v. 274, no. 17, p. 11832-11841, 1999.

LANDER, E.S, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, v. 15, no. 409(6822), p. 860-921, 2001; v. 2, no. 412(6846), p. 565, 2001 and v. 7, no. 411(6838), p. 720, 2001.

LEWIN B, **Genes VII**. Oxford University Press. 2000.

LI, B.L; L.I, XL; DUAN, Z.J; LEE, O; LIN, S; MA, Z.M; CHANG, C.C; YANG, X.Y; PARK, J.P; MOHANDAS, T.K; NOLL, W; CHAN, L; CHANG, T.Y. Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) gene organization and evidence that the 4.3-kilobase ACAT-1 mRNA is produced from two different chromosomes. *J Biol Chem.*, v. 274, no. 16, p. 11060-11071, 1999.

LODISH, H; BERK, A; ZIPURSKY, S.L; MATSUDAIRA, P; BALTIMORE, D; DARNELL, J.E. **Molecular Cell Biology,** 4th ed. W. H. Freeman & Co. 2000.

LOPEZ, A.J. Alternative *splicing* of pre-mRNA: developmental consequences and Mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet.*, v. 32, p. 279-305, 1998.

LUKAS, J; GAO, D.Q; KESHMESHIAN, M; WEN, W.H; TSAO-WEI, D; SHOSHANA, R; PRESS, M.F. Alternative and aberrant messenger RNA *splicing* of

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

the *mdm2* oncogene in invasive breast cancer. *Cancer Res.*, v. 61, p. 3212-3219, 2001.

MADDEN, S.L; GALELLA, E.A; ZHU J; BERTELSEN, A.H; BEAUDRY, G.A. SAGE transcript profiles for p53-dependent growth regulation. *Oncogene*, v. 15, p. 1079-1085, 1997.

MANIATIS, T & TASIC, B. Alternative pre-mRNA *splicing* and proteome expansion in metazoans. *Nature*, v. 11, no. 418(6894), p. 236-243, 2002.

MAUDUIT, C; CHATELAIN, G; MAGRE, S; BRUN, G; BENAHMED, M; MICHEL, D. Regulation by pH of the alternative *splicing* of the stem cell factor pre-mRNA in the testis. *J Biol Chem.*, v. 274, no. 2, p. 770-775, 1999.

MAQUAT L.E & CARMICHAEL G.G. Quality control of mRNA function. *Cell*, v. 104, no. 2, p. 173-176, 2001.

MCCOBB, D.P; HARA, Y; LAI, G.J; MAHMOUD, S.F; FLUGGE, G; Subordination stress alters alternative splicing of the Slo gene in tree shrew adrenals. *Horm Beha.*, v. 43, no. 1, p. 180-186, 2003.

MCCRACKEN, S; FONG, N; ROSONINA, E; YANKULOV, K; BROTHERS, G; SIDEROVSKI, D; HESSEL, A; FOSTER, S; SHUMAN, S; BENTLEY, D.L. 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev.*, v. 11, no. 24, p. 3306-3318, 1997.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

MODREK, B; RESCH, A; GRASSO, C; LEE, C. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res.*, v. 29, no. 13, p. 2850-2859, 2001.

MODREK, B & LEE, C. A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet.*, v. 30, no. 1, p. 13-19, 2002.

MOMAND, J; ZAMBETTI, G; OLSON, D; GEORGE, D; LEVINE, A. The *mdm2* oncogene products forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, v. 69, p. 1237-1245, 1992.

MONSALVE, M; W.U, Z; ADELMANT, G; PUIGSERVER, P; FAN, M; SPIEGELMAN, B.M. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell.*, v. 6, no. 2, p. 307-316, 2000.

Morris DP, Greenleaf AL. The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. **J Biol Chem**, 275(51):39935-43, 2000.

MOYRET-LALLE, C; DURIEZ, C; VAN KERCKHOVE, J; GILBERT, C; WANG, Q; PUISIEUX, A. p53 induction prevents accumulation of aberrant transcripts in cancer cells. *Cancer Res.*, v. 61, p. 486-488, 2001.

MUNZ, B; HILDT, E; SPRINGER, M.L; BLAU, H.M. RIP2, a checkpoint in myogenic differentiation. *Mol Cell Biol.*, v. 16, p. 5879-86. 2002.

MYERS, J.K; MORRIS, D.P; GREENLEAF, A.L; OAS, T.G. Phosphorylation of RNA polymerase II CTD fragments results in tight binding to the WW domain from the yeast prolyl isomerase Ess1. *Biochemistry*, v. 40, no. 29, p. 8479-8486, 2001.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

NELSON D.L. & COX M.M. **Principles of Biochemestry**. Third Edition. Worth Publishers. 2000.

NISHIYAMA, H; HIGASHITSUJI, H; YOKOI, H; ITOH, K; DANNO, S; MATSUDA, T; FUJITA, J. Cloning and characterization of human *CIRP* (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene. *Gene*, v. 204, p. 115-120, 1997.

NISHIYAMA, H; ITOH, K; KANEKO, Y; KISHISHITA, M; YOSHIDA, O; FUJITA, J. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold inducible suppression of mammalian cell growth. *J Cell Biol.*, v. 137, p. 899-908, 1997.

NOGUES, G; KADENER, S; CRAMER, P; BENTLEY, D; KORNBLIHTT, A.R. Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *J Biol Chem.*, v. 277, no. 45, p. 43110-43114, 2002.

NOGUES, G; KADENER, S; CRAMER, P; DE LA MATA, M; FEDEDA, J.P; BLAUSTEIN, M; SREBROW, A; KORNBLIHTT, A.R. Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: faster is not always better. *IUBMB Life*, v. 55, no. 4-5, p. 235-41, 2003.

OBATA, T; BROWN, G.E; YAFFE, M.B. MAP kinase pathways activated by stress: The *p38* MAPK pathway. *Crit Care Med.*, v. 28, p. 67-77, 2000.

OHNISHI, T; WANG, X; OHNISHI, K; TAKAHASHI, A. p53-dependent induction of *WAF1* by cold shock in human glioblastoma cells. *Oncogene*, v. 16, p. 1507-1511, 1998.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

OHSAKA Y; OHGIYA S; HOSHINO T; ISHIZAKI K. Mitocondrial genome-encoded ATPase subunit 6+8 mRNA increases in human hepatoblastoma cells in response to nonfatal cold stress. *Cryobiology*, v. 40, p. 92-101, 2000.

OLINER, J; PIETENPOL, J; THIANGALINGAM, S; GYURIS, J; KINZLER, K; VOGELSTEIN, B. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, v. 362, p. 857-860, 1993.

PIMKHAOKHAM, A; SHIMADA, Y; FUKUDA, Y; KURIHARA, N; IMOTO, I; YANG, ZQ; IMAMURA, M; NAKAMURA, Y; AMAGASA, T; INAZAWA, J. Nonrandom chromosomal imbalances in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: possible involvement of the ATF3 and CENPF genes in the 1q32 amplicon. *Jpn J Cancer Res*, v. 91, no. 11, p. 1126-1133, 2000.

ROBERTS, G.C; GOODING, C; MAK, H.Y; PROUDFOOT, N.J; SMITH, C.W. Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic Acids Res.*, v. 26, no. 24, p. 5568-5572, 1998.

ROGERS, J; EARLY, P; CARTER, C; CALAME, K; BOND, M; HOOD, L; WALL, R. Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell*, v. 20, no. 2, p. 303-312, 1980.

ROWEN, L; YOUNG, J; BIRDITT, B; KAUR, A; MADAN, A; PHILIPPS, D.L; QIN, S; MINX, P; WILSON, R.K; HOOD, L; GRAVELEY, B.R. Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity. *Genomics*, v. 79, no. 4, p. 587-597, 2002.

SAMBROOK, J. Adenovirus amazes at Cold Spring Harbor. *Nature*, v. 14, no. 268, p. 101-104, 1977.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning, a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Third Edition, 2001.

SATO, T; SAWAJI, Y; MATSUI, N; SATO, H; SEIKI, M; MORI, Y; ITO, A. Heat shock suppresses membrane type 1-matrix metalloproteinase production and progelatinase A activation in human fibrosarcoma HT-1080 cells and thereby inhibits cellular invasion. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 265, p. 189-193, 1999.

SHMALTZ, C; HARRIGAN, HARDENBERG, P; WELLS, A; FISHER, D.E. Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia. *Mol Cell Biol*, v. 18, p. 2845-2854, 1998.

SLAUGHTER D.P; SOUTHWICK, H. W; SMEJKAL, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer (Phila)*, v. 6, p. 963-968, 1953.

SMITH, C.W; VALCARCEL J. Alternative pre-mRNA *splicing*: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci.*, v. 25, no. 8, p.381-388. 2000.

SCHMUCKER, D; CLEMENS, J.C; SHU, H; WORBY, C.A; XIAO, J; MUDA, M; DIXON, J.E; ZIPURSKY, S.L. Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell.* v. 101, no. 6, p. 671-684, 2000.

SONNA, L.A; FUJITA, J; GAFFIN, S.L; LILLY, C.M. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol.*, v. 92, no. 4, p. 1725-1742, 2002.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

TAKASHI, S; YASUNOBU, S; NORIMITSU, M; HIROSHI, S; MOTOHARU, S; YO, M; AKIRA, I. Heat shock suppresses membrane type 1-matrix metalloproteinase production and progelatinase A activation in human fibrosarcoma HT-1080 cells and thereby inhibits cellular invasion. *Biochem Biophys Res Comm.*, v. 265, p. 189-193, 1999.

TAKASU, T; LYONS, J.C; PARK, H.J; SONG, C.W. Apoptosis and perturbation of cell cycle progression in an acidic environment after hyperthermia. *Cancer Res.*, v. 58, p. 2504-2508, 1998.

TACKE, R & MANLEY, J.L. The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. *EMBO J.*, v. 14, no. 14, p. 3540-3551, 1995.

The Caenorhabditis. elegans Sequencing Consortium** (See www.genome.wustl.edu/gsc/C_elegans/ and www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/ for a list of authors). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, v. 11, no. 282(5396), p. 2012-2018, 1998; v. 1, no. 283(5398), p. 35, 1999; v. 26, no. 283(5410), p. 2103, 1999 and v. 3, no. 285(5433), p. 1493, 1999.

THEUNS, J. & VAN BROECKHOVEN, C. Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility. *Human Molec Gen.*, v. 16, p. 2383-2394, 2000.

VAN DER HOUVEN VAN OORDT, W; DIAS-MECO, M.T; LOZANO, J; KRAINER, A.R; MOSCAT, J; CÁSERES, F.J. The $MKK_{3/6}$-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative *splicing* regulation. *J Cell Biol.*, v. 149, no. 2, p. 307-316, 2000.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

VARANI, G. & NAGAI, K. RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, v. 27, p. 407-445, 1998.

VENTER, J.C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science*, v. 16, no. 291(5507), p. 1304-1351, 2001 and *Science*, v. 5, no. 292(5523), p. 1838, 2001.

WEI, L.Y. & ROEPE, P.D. Low external pH and osmotic shock increase the expression of human MDR protein. *Biochemistry*, v. 33, p. 7229-7238, 1994.

WEIL, D; D'ALESSIO, M; RAMIREZ, F; STEINMANN, B; WIRTZ, M.K; GLANVILLE, R.W; HOLLISTER, D.W. Temperature-dependent expression of a collagen splicing defect in the fibroblasts of a patient with Ehlers-Danlos syndrome type VII. *J Biol Chem.*, v. 264, no. 28, p. 16804-16809, 1989.

WU, J.Y. & MANIATIS, T. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell*, v. 75, no. 6, p. 1061-1070, 1993.

YANG, Y; BEQAJ, S; KEMP, P; ARIEL, I; SCHUGER, L. Stretch-induced alternative splicing of serum response factor promotes bronchial myogenesis and is defective in lung hypoplasia. *J Clin Invest.*, v. 106, no. 11, p. 1321-1330, 2000.

YASUHITO, O; SATORU, O; TAMOTSU, H; KOSO, I. Mitochondrial genome encoded ATPase subunit 6+8 mRNA increases in human hepatoblastoma cells in response to nonfatal cold stress. *Cryobiology*, v. 40, p. 92-101, 2000.

YOST, H.J & LINDQUIST, S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell*, v. 45, no. 2, p. 185-193, 1986.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

APÊNDICE I

Tabelas de dados (em unidades *pixels*) obtidos por quantificação de *amplicons*

unesp

Quantificação das amostras para *GAPDH* 28 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH 28c*	Razão
Fadu	*GAPDH*	Temp	40°C 3h	**26625**	26625	**1**
Fadu	*GAPDH*	Temp	C 3h	**23609**	23609	**1**
Fadu	*GAPDH*	Temp	17°C 64h	**23751**	23751	**1**
Fadu	*GAPDH*	Temp	5°C 64h	**17882**	17882	**1**
Fadu	*GAPDH*	Temp	C 64h	**17586**	17586	**1**
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	0	**0**
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 2h	**0**	0	**0**
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	C 2h	**0**	0	**0**
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	0	**0**
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 5h	**11739**	11739	**1**
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	C 5h	**15215**	15215	**1**
Fadu	*GAPDH*	pH	10%CO_2 24h	**9864**	9864	**1**
Fadu	*GAPDH*	pH	C 24h	**15971**	15971	**1**
Fadu	*GAPDH*	pH	10%CO_2 72h	**13178**	13178	**1**
Fadu	*GAPDH*	pH	C 72h	**14737**	14737	**1**
HeLa	*GAPDH*	Temp	40°C 3h	**41248**	41248	**1**
HeLa	*GAPDH*	Temp	C 3h	**46034**	46034	**1**
HeLa	*GAPDH*	Temp	17°C 64h	**32467**	32467	**1**
HeLa	*GAPDH*	Temp	5°C 64h	**64191**	64191	**1**
HeLa	*GAPDH*	Temp	C 64h	**47000**	47000	**1**
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 2h	**25457**	25457	**1**
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 2h	**27944**	27944	**1**
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	C 2h	**33631**	33631	**1**
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 5h	**55235**	55235	**1**
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 5h	**0**	0	**0**
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	C 5h	**15600**	15600	**1**
HeLa	*GAPDH*	pH	10%CO_2 24h	**52136**	52136	**1**
HeLa	*GAPDH*	pH	C 24h	**53063**	53063	**1**
HeLa	*GAPDH*	pH	10%CO_2 72h	**46661**	46661	**1**
HeLa	*GAPDH*	pH	C 72h	**48930**	48930	**1**
Siha	*GAPDH*	Temp	40°C 3h	**25794**	25794	**1**
Siha	*GAPDH*	Temp	C 3h	**26169**	26169	**1**
Siha	*GAPDH*	Temp	17°C 64h	**24829**	24829	**1**
Siha	*GAPDH*	Temp	5°C 64h	**23842**	23842	**1**
Siha	*GAPDH*	Temp	C 64h	**24871**	24871	**1**
Siha	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 2h	**51485**	51485	**1**
Siha	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 2h	**47575**	47575	**1**
Siha	*GAPDH*	Pres Os	C 2h	**43802**	43802	**1**
Siha	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 5h	**47037**	47037	**1**
Siha	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 5h	**47066**	47066	**1**
Siha	*GAPDH*	Pres Os	C 5h	**46067**	46067	**1**
Siha	*GAPDH*	pH	10%CO_2 24h	**47906**	47906	**1**
Siha	*GAPDH*	pH	C 24h	**50017**	50017	**1**
Siha	*GAPDH*	pH	10%CO_2 72h	**41845**	41845	**1**
Siha	*GAPDH*	pH	C 72h	**55507**	55507	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Temp	40°C 3h	**45427**	45427	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Temp	C 3h	**40652**	40652	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Temp	17°C 64h	**39810**	39810	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Temp	5°C 64h	**44158**	44158	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Temp	C 64h	**33622**	33622	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 2h	**45516**	45516	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 2h	**35398**	35398	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	C 2h	**41906**	41906	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 5h	**40598**	40598	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 5h	**48398**	48398	**1**
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	C 5h	**54659**	54659	**1**
HEp-II	*GAPDH*	pH	10%CO_2 24h	**30572**	30572	**1**
HEp-II	*GAPDH*	pH	C 24h	**30918**	30918	**1**
HEp-II	*GAPDH*	pH	10%CO_2 72h	**44025**	44025	**1**
HEp-II	*GAPDH*	pH	C 72h	**47713**	47713	**1**

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Quantificação das amostras para *GAPDH* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH 28c*	Razão
Fadu	*GAPDH*	Temp	40°C 3h	75928	26625	2,851755869
Fadu	*GAPDH*	Temp	C 3h	97924	23609	4,147740269
Fadu	*GAPDH*	Temp	17°C 64h	96007	23751	4,042229801
Fadu	*GAPDH*	Temp	5°C 64h	90730	17882	5,073817246
Fadu	*GAPDH*	Temp	C 64h	93434	17586	5,312976231
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 2h	0	0	0
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 2h	76417	0	0
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	C 2h	70785	0	0
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 5h	0	0	0
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 5h	90231	11739	7,686429849
Fadu	*GAPDH*	Pres Os	C 5h	86837	15215	5,707328294
Fadu	*GAPDH*	pH	10%CO_2 24h	81383	9864	8,250506894
Fadu	*GAPDH*	pH	C 24h	86643	15971	5,425020349
Fadu	*GAPDH*	pH	10%CO_2 72h	96973	13178	7,3587039
Fadu	*GAPDH*	pH	C 72h	62216	14737	4,221754767
HeLa	*GAPDH*	Temp	40°C 3h	111579	41248	2,70507661
HeLa	*GAPDH*	Temp	C 3h	103562	46034	2,249685015
HeLa	*GAPDH*	Temp	17°C 64h	92939	32467	2,862568146
HeLa	*GAPDH*	Temp	5°C 64h	108960	64191	1,69743422
HeLa	*GAPDH*	Temp	C 64h	106181	47000	2,259170213
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 2h	76615	25457	3,00958479
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 2h	85168	27944	3,047809906
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	C 2h	71920	33631	2,138503167
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 5h	87741	55235	1,588503666
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 5h	88492	0	0
HeLa	*GAPDH*	Pres Os	C 5h	92808	15600	5,949230769
HeLa	*GAPDH*	pH	10%CO_2 24h	95045	52136	1,823020562
HeLa	*GAPDH*	pH	C 24h	101402	53063	1,910973748
HeLa	*GAPDH*	pH	10%CO_2 72h	90853	46661	1,947086432
HeLa	*GAPDH*	pH	C 72h	105317	48930	2,15240139
Siha	*GAPDH*	Temp	40°C 3h	72985	25794	2,829534
Siha	*GAPDH*	Temp	C 3h	89569	26169	3,422713898
Siha	*GAPDH*	Temp	17°C 64h	87074	24829	3,506947521
Siha	*GAPDH*	Temp	5°C 64h	96871	23842	4,063040013
Siha	*GAPDH*	Temp	C 64h	89830	24871	3,611837079
Siha	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 2h	85271	51485	1,65622997
Siha	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 2h	80555	47575	1,69322123
Siha	*GAPDH*	Pres Os	C 2h	75929	43802	1,733459659
Siha	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 5h	86392	47037	1,836681761
Siha	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 5h	88007	47066	1,869863596
Siha	*GAPDH*	Pres Os	C 5h	97203	46067	2,110035383
Siha	*GAPDH*	pH	10%CO_2 24h	94820	47906	1,979292782
Siha	*GAPDH*	pH	C 24h	72756	50017	1,454625427
Siha	*GAPDH*	pH	10%CO_2 72h	90438	41845	2,161261799
Siha	*GAPDH*	pH	C 72h	83186	55507	1,498657827
HEp-II	*GAPDH*	Temp	40°C 3h	58386	45427	1,285270874
HEp-II	*GAPDH*	Temp	C 3h	57027	40652	1,40280921
HEp-II	*GAPDH*	Temp	17°C 64h	57840	39810	1,452901281
HEp-II	*GAPDH*	Temp	5°C 64h	68780	44158	1,557588659
HEp-II	*GAPDH*	Temp	C 64h	53857	33622	1,601838082
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 2h	48438	45516	1,064197205
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 2h	55746	35398	1,574834736
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	C 2h	40468	41906	0,965685105
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	0,4M 5h	38303	40598	0,943470122
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	0,8M 5h	51192	48398	1,057729658
HEp-II	*GAPDH*	Pres Os	C 5h	41275	54659	0,755136391
HEp-II	*GAPDH*	pH	10%CO_2 24h	40776	30572	1,333769462
HEp-II	*GAPDH*	pH	C 24h	32777	30918	1,060126787
HEp-II	*GAPDH*	pH	10%CO_2 72h	34600	44025	0,785917093
HEp-II	*GAPDH*	pH	C 72h	55228	47713	1,157504244



Quantificação das amostras para *N33a* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH 28c*	Razão
Fadu	*N33*	Temp	40°C 3h	**24164**	26625	**0,907568075**
Fadu	*N33*	Temp	C 3h	**16145**	23609	**0,683849379**
Fadu	*N33*	Temp	17°C 64h	**24281**	23751	**1,02231485**
Fadu	*N33*	Temp	5°C 64h	**25295**	17882	**1,414550945**
Fadu	*N33*	Temp	C 64h	**0**	17586	**0**
Fadu	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	0	**0**
Fadu	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	**9504**	0	**0**
Fadu	*N33*	Pres Os	C 2h	**0**	0	**0**
Fadu	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	0	**0**
Fadu	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	**17944**	11739	**1,528579947**
Fadu	*N33*	Pres Os	C 5h	**20400**	15215	**1,340782123**
Fadu	*N33*	pH	10% 24h	**18245**	9864	**1,849655312**
Fadu	*N33*	pH	C 24h	**16220**	15971	**1,015590758**
Fadu	*N33*	pH	10% 72h	**15937**	13178	**1,209364092**
Fadu	*N33*	pH	C 72h	**24555**	14737	**1,666214291**
HeLa	*N33*	Temp	40°C 3h	**0**	41248	**0**
HeLa	*N33*	Temp	C 3h	**0**	46034	**0**
HeLa	*N33*	Temp	17°C 64h	**0**	32467	**0**
HeLa	*N33*	Temp	5°C 64h	**0**	64191	**0**
HeLa	*N33*	Temp	C 64h	**0**	47000	**0**
HeLa	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	25457	**0**
HeLa	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	**0**	27944	**0**
HeLa	*N33*	Pres Os	C 2h	**0**	33631	**0**
HeLa	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	55235	**0**
HeLa	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	**0**	0	**0**
HeLa	*N33*	Pres Os	C 5h	**0**	15600	**0**
HeLa	*N33*	pH	10% 24h	**0**	52136	**0**
HeLa	*N33*	pH	C 24h	**0**	53063	**0**
HeLa	*N33*	pH	10% 72h	**0**	46661	**0**
HeLa	*N33*	pH	C 72h	**0**	48930	**0**
Siha	*N33*	Temp	40°C 3h	**0**	25794	**0**
Siha	*N33*	Temp	C 3h	**0**	26169	**0**
Siha	*N33*	Temp	17°C 64h	**0**	24829	**0**
Siha	*N33*	Temp	5°C 64h	**0**	23842	**0**
Siha	*N33*	Temp	C 64h	**0**	24871	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	51485	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	**0**	47575	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	C 2h	**0**	43802	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	47037	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	**0**	47066	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	C 5h	**0**	46067	**0**
Siha	*N33*	pH	10% 24h	**0**	47906	**0**
Siha	*N33*	pH	C 24h	**0**	50017	**0**
Siha	*N33*	pH	10% 72h	**0**	41845	**0**
Siha	*N33*	pH	C 72h	**0**	55507	**0**
HEp-II	*N33*	Temp	40°C 3h	**0**	45427	**0**
HEp-II	*N33*	Temp	C 3h	**0**	40652	**0**
HEp-II	*N33*	Temp	17°C 64h	**0**	39810	**0**
HEp-II	*N33*	Temp	5°C 64h	**0**	44158	**0**
HEp-II	*N33*	Temp	C 64h	**0**	33622	**0**
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	45516	**0**
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	**0**	35398	**0**
HEp-II	*N33*	Pres Os	C 2h	**0**	41906	**0**
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	40598	**0**
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	**0**	48398	**0**
HEp-II	*N33*	Pres Os	C 5h	**0**	54659	**0**
HEp-II	*N33*	pH	10% 24h	**0**	30572	**0**
HEp-II	*N33*	pH	C 24h	**0**	30918	**0**
HEp-II	*N33*	pH	10% 72h	**0**	44025	**0**
HEp-II	*N33*	pH	C 72h	**0**	47713	**0**

Quantificação das amostras para *N33b* 35 ciclos



Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH 28c*	Razão
Fadu	*N33*	Temp	40°C 3h	**43979**	26625	**1,651793427**
Fadu	*N33*	Temp	C 3h	**23396**	23609	**0,990978017**
Fadu	*N33*	Temp	17°C 64h	**40053**	23751	**1,6863711**
Fadu	*N33*	Temp	5°C 64h	**44497**	17882	**2,488368191**
Fadu	*N33*	Temp	C 64h	**11706**	17586	**0,665643125**
Fadu	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	**15546**	0	**0**
Fadu	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	**28573**	0	**0**
Fadu	*N33*	Pres Os	C 2h	**10022**	0	**0**
Fadu	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	0	**0**
Fadu	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	**21648**	11739	**1,844109379**
Fadu	*N33*	Pres Os	C 5h	**22895**	15215	**1,504765035**
Fadu	*N33*	pH	10% 24h	**19058**	9864	**1,932076237**
Fadu	*N33*	pH	C 24h	**33304**	15971	**2,085279569**
Fadu	*N33*	pH	10% 72h	**28030**	13178	**2,127029898**
Fadu	*N33*	pH	C 72h	**55927**	14737	**3,795005768**
HeLa	*N33*	Temp	40°C 3h	**55735**	41248	**1,351217029**
HeLa	*N33*	Temp	C 3h	**57525**	46034	**1,249619846**
HeLa	*N33*	Temp	17°C 64h	**39852**	32467	**1,22746173**
HeLa	*N33*	Temp	5°C 64h	**52069**	64191	**0,811157327**
HeLa	*N33*	Temp	C 64h	**57554**	47000	**1,224553191**
HeLa	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	**49297**	25457	**1,936481125**
HeLa	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	**49900**	27944	**1,785714286**
HeLa	*N33*	Pres Os	C 2h	**49912**	33631	**1,484106925**
HeLa	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	**67662**	55235	**1,224984159**
HeLa	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	**38797**	0	**0**
HeLa	*N33*	Pres Os	C 5h	**49389**	15600	**3,165961538**
HeLa	*N33*	pH	10% 24h	**39244**	52136	**0,752723646**
HeLa	*N33*	pH	C 24h	**55365**	53063	**1,043382395**
HeLa	*N33*	pH	10% 72h	**51994**	46661	**1,11429245**
HeLa	*N33*	pH	C 72h	**55704**	48930	**1,138442673**
Siha	*N33*	Temp	40°C 3h	**0**	25794	**0**
Siha	*N33*	Temp	C 3h	**0**	26169	**0**
Siha	*N33*	Temp	17°C 64h	**0**	24829	**0**
Siha	*N33*	Temp	5°C 64h	**0**	23842	**0**
Siha	*N33*	Temp	C 64h	**0**	24871	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	51485	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	**0**	47575	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	C 2h	**0**	43802	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	47037	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	**0**	47066	**0**
Siha	*N33*	Pres Os	C 5h	**0**	46067	**0**
Siha	*N33*	pH	10% 24h	**16199**	47906	**0,33814136**
Siha	*N33*	pH	C 24h	**18008**	50017	**0,360037587**
Siha	*N33*	pH	10% 72h	**0**	41845	**0**
Siha	*N33*	pH	C 72h	**0**	55507	**0**
HEp-II	*N33*	Temp	40°C 3h	**24224**	45427	**0,53325115**
HEp-II	*N33*	Temp	C 3h	**28421**	40652	**0,699129194**
HEp-II	*N33*	Temp	17°C 64h	**25734**	39810	**0,646420497**
HEp-II	*N33*	Temp	5°C 64h	**29455**	44158	**0,667036551**
HEp-II	*N33*	Temp	C 64h	**12810**	33622	**0,381000535**
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	45516	**0**
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	**23448**	35398	**0,662410306**
HEp-II	*N33*	Pres Os	C 2h	**28814**	41906	**0,687586503**
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	**25135**	40598	**0,619119168**
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	**28562**	48398	**0,590148353**
HEp-II	*N33*	Pres Os	C 5h	**30534**	54659	**0,558627125**
HEp-II	*N33*	pH	10% 24h	**33875**	30572	**1,108040037**
HEp-II	*N33*	pH	C 24h	**21752**	30918	**0,703538392**
HEp-II	*N33*	pH	10% 72h	**37323**	44025	**0,847768313**
HEp-II	*N33*	pH	C 72h	**26854**	47713	**0,562823549**



Quantificação das amostras para *N33c* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH 28c*	Razão
Fadu	*N33*	Temp	40°C 3h	11133	26625	0,418140845
Fadu	*N33*	Temp	C 3h	0	23609	0
Fadu	*N33*	Temp	17°C 64h	12858	23751	0,541366679
Fadu	*N33*	Temp	5°C 64h	13758	17882	0,769377027
Fadu	*N33*	Temp	C 64h	0	17586	0
Fadu	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	0	0	0
Fadu	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	0	0	0
Fadu	*N33*	Pres Os	C 2h	0	0	0
Fadu	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	0	0	0
Fadu	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	0	11739	0
Fadu	*N33*	Pres Os	C 5h	12366	15215	0,812750575
Fadu	*N33*	pH	10% 24h	0	9864	0
Fadu	*N33*	pH	C 24h	11649	15971	0,729384509
Fadu	*N33*	pH	10% 72h	0	13178	0
Fadu	*N33*	pH	C 72h	0	14737	0
HeLa	*N33*	Temp	40°C 3h	26593	41248	0,644710047
HeLa	*N33*	Temp	C 3h	22280	46034	0,483990094
HeLa	*N33*	Temp	17°C 64h	19212	32467	0,591739305
HeLa	*N33*	Temp	5°C 64h	28895	64191	0,450140985
HeLa	*N33*	Temp	C 64h	38210	47000	0,812978723
HeLa	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	27756	25457	1,090309149
HeLa	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	35005	27944	1,252683939
HeLa	*N33*	Pres Os	C 2h	31711	33631	0,942909815
HeLa	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	42307	55235	0,765945506
HeLa	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	23607	0	0
HeLa	*N33*	Pres Os	C 5h	25444	15600	1,631025641
HeLa	*N33*	pH	10% 24h	27102	52136	0,519832745
HeLa	*N33*	pH	C 24h	40008	53063	0,753971694
HeLa	*N33*	pH	10% 72h	38556	46661	0,826300336
HeLa	*N33*	pH	C 72h	40999	48930	0,837911302
Siha	*N33*	Temp	40°C 3h	0	25794	0
Siha	*N33*	Temp	C 3h	0	26169	0
Siha	*N33*	Temp	17°C 64h	0	24829	0
Siha	*N33*	Temp	5°C 64h	0	23842	0
Siha	*N33*	Temp	C 64h	0	24871	0
Siha	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	0	51485	0
Siha	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	0	47575	0
Siha	*N33*	Pres Os	C 2h	0	43802	0
Siha	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	0	47037	0
Siha	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	0	47066	0
Siha	*N33*	Pres Os	C 5h	0	46067	0
Siha	*N33*	pH	10% 24h	0	47906	0
Siha	*N33*	pH	C 24h	0	50017	0
Siha	*N33*	pH	10% 72h	0	41845	0
Siha	*N33*	pH	C 72h	0	55507	0
HEp-II	*N33*	Temp	40°C 3h	0	45427	0
HEp-II	*N33*	Temp	C 3h	0	40652	0
HEp-II	*N33*	Temp	17°C 64h	0	39810	0
HEp-II	*N33*	Temp	5°C 64h	0	44158	0
HEp-II	*N33*	Temp	C 64h	0	33622	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	0	45516	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	0	35398	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	C 2h	0	41906	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	0	40598	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	0	48398	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	C 5h	0	54659	0
HEp-II	*N33*	pH	10% 24h	0	30572	0
HEp-II	*N33*	pH	C 24h	0	30918	0
HEp-II	*N33*	pH	10% 72h	0	44025	0
HEp-II	*N33*	pH	C 72h	0	47713	0

Quantificação das amostras para *N33d* 35 ciclos



Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH 28c*	Razão
Fadu	*N33*	Temp	40°C 3h	0	26625	0
Fadu	*N33*	Temp	C 3h	0	23609	0
Fadu	*N33*	Temp	17°C 64h	0	23751	0
Fadu	*N33*	Temp	5°C 64h	0	17882	0
Fadu	*N33*	Temp	C 64h	0	17586	0
Fadu	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	0	0	0
Fadu	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	0	0	0
Fadu	*N33*	Pres Os	C 2h	0	0	0
Fadu	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	0	0	0
Fadu	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	0	11739	0
Fadu	*N33*	Pres Os	C 5h	0	15215	0
Fadu	*N33*	pH	10% 24h	0	9864	0
Fadu	*N33*	pH	C 24h	0	15971	0
Fadu	*N33*	pH	10% 72h	0	13178	0
Fadu	*N33*	pH	C 72h	0	14737	0
HeLa	*N33*	Temp	40°C 3h	0	41248	0
HeLa	*N33*	Temp	C 3h	0	46034	0
HeLa	*N33*	Temp	17°C 64h	0	32467	0
HeLa	*N33*	Temp	5°C 64h	0	64191	0
HeLa	*N33*	Temp	C 64h	0	47000	0
HeLa	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	0	25457	0
HeLa	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	0	27944	0
HeLa	*N33*	Pres Os	C 2h	0	33631	0
HeLa	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	0	55235	0
HeLa	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	0	0	0
HeLa	*N33*	Pres Os	C 5h	0	15600	0
HeLa	*N33*	pH	10% 24h	0	52136	0
HeLa	*N33*	pH	C 24h	0	53063	0
HeLa	*N33*	pH	10% 72h	0	46661	0
HeLa	*N33*	pH	C 72h	0	48930	0
Siha	*N33*	Temp	40°C 3h	0	25794	0
Siha	*N33*	Temp	C 3h	0	26169	0
Siha	*N33*	Temp	17°C 64h	0	24829	0
Siha	*N33*	Temp	5°C 64h	0	23842	0
Siha	*N33*	Temp	C 64h	0	24871	0
Siha	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	**25182**	51485	**0,489113334**
Siha	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	**24005**	47575	**0,504571729**
Siha	*N33*	Pres Os	C 2h	**24558**	43802	**0,560659331**
Siha	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	**26222**	47037	**0,55747603**
Siha	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	**13831**	47066	**0,293863936**
Siha	*N33*	Pres Os	C 5h	**27979**	46067	**0,607354505**
Siha	*N33*	pH	10% 24h	**15010**	47906	**0,313321922**
Siha	*N33*	pH	C 24h	**14964**	50017	**0,299178279**
Siha	*N33*	pH	10% 72h	**30446**	41845	**0,727589915**
Siha	*N33*	pH	C 72h	**24426**	55507	**0,440052606**
HEp-II	*N33*	Temp	40°C 3h	0	45427	0
HEp-II	*N33*	Temp	C 3h	0	40652	0
HEp-II	*N33*	Temp	17°C 64h	0	39810	0
HEp-II	*N33*	Temp	5°C 64h	0	44158	0
HEp-II	*N33*	Temp	C 64h	0	33622	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,4M 2h	0	45516	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,8M 2h	0	35398	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	C 2h	0	41906	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,4M 5h	0	40598	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	0,8M 5h	0	48398	0
HEp-II	*N33*	Pres Os	C 5h	0	54659	0
HEp-II	*N33*	pH	10% 24h	0	30572	0
HEp-II	*N33*	pH	C 24h	0	30918	0
HEp-II	*N33*	pH	10% 72h	0	44025	0
HEp-II	*N33*	pH	C 72h	0	47713	0

unesp

Quantificação das amostras para *RSN* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH*-28c	Razão
Fadu	*RSN*	Temp	40°C 3h	0	26625	0
Fadu	*RSN*	Temp	C 3h	0	23609	0
Fadu	*RSN*	Temp	17°C 64h	0	23751	0
Fadu	*RSN*	Temp	5°C 64h	0	17882	0
Fadu	*RSN*	Temp	C 64h	0	17586	0
Fadu	*RSN*	Pres Os	0,4M 2h	30962	0	0
Fadu	*RSN*	Pres Os	0,8M 2h	54982	0	0
Fadu	*RSN*	Pres Os	C 2h	39379	0	0
Fadu	*RSN*	Pres Os	0,4M 5h	0	0	0
Fadu	*RSN*	Pres Os	0,8M 5h	50346	11739	4,288780986
Fadu	*RSN*	Pres Os	C 5h	53701	15215	3,529477489
Fadu	*RSN*	pH	10%CO_2 24h	39188	9864	3,972830495
Fadu	*RSN*	pH	C 24h	46993	15971	2,942395592
Fadu	*RSN*	pH	10%CO_2 72h	37564	13178	2,850508423
Fadu	*RSN*	pH	C 72h	45168	14737	3,06493859
HeLa	*RSN*	Temp	40°C 3h	41122	41248	0,996945306
HeLa	*RSN*	Temp	C 3h	28388	46034	0,616674632
HeLa	*RSN*	Temp	17°C 64h	25319	32467	0,779837989
HeLa	*RSN*	Temp	5°C 64h	21531	64191	0,335420853
HeLa	*RSN*	Temp	C 64h	45810	47000	0,974680851
HeLa	*RSN*	Pres Os	0,4M 2h	0	25457	0
HeLa	*RSN*	Pres Os	0,8M 2h	45452	27944	1,626538792
HeLa	*RSN*	Pres Os	C 2h	51634	33631	1,535309685
HeLa	*RSN*	Pres Os	0,4M 5h	48252	55235	0,873576537
HeLa	*RSN*	Pres Os	0,8M 5h	47126	0	0
HeLa	*RSN*	Pres Os	C 5h	0	15600	0
HeLa	*RSN*	pH	10%CO_2 24h	41697	52136	0,799773669
HeLa	*RSN*	pH	C 24h	41549	53063	0,783012645
HeLa	*RSN*	pH	10%CO_2 72h	27980	46661	0,599644243
HeLa	*RSN*	pH	C 72h	34548	48930	0,706069896
Siha	*RSN*	Temp	40°C 3h	29154	25794	1,130262852
Siha	*RSN*	Temp	C 3h	46028	26169	1,758875005
Siha	*RSN*	Temp	17°C 64h	37130	24829	1,495428733
Siha	*RSN*	Temp	5°C 64h	39031	23842	1,637069038
Siha	*RSN*	Temp	C 64h	42004	24871	1,688874593
Siha	*RSN*	Pres Os	0,4M 2h	38756	51485	0,752762941
Siha	*RSN*	Pres Os	0,8M 2h	39002	47575	0,819800315
Siha	*RSN*	Pres Os	C 2h	34640	43802	0,790831469
Siha	*RSN*	Pres Os	0,4M 5h	55971	47037	1,189935583
Siha	*RSN*	Pres Os	0,8M 5h	55199	47066	1,172799898
Siha	*RSN*	Pres Os	C 5h	40813	46067	0,885948727
Siha	*RSN*	pH	10%CO_2 24h	27438	47906	0,572746629
Siha	*RSN*	pH	C 24h	27138	50017	0,542575524
Siha	*RSN*	pH	10%CO_2 72h	0	41845	0
Siha	*RSN*	pH	C 72h	0	55507	0
HEp-II	*RSN*	Temp	40°C 3h	11552	45427	0,254298105
HEp-II	*RSN*	Temp	C 3h	0	40652	0
HEp-II	*RSN*	Temp	17°C 64h	9810	39810	0,246420497
HEp-II	*RSN*	Temp	5°C 64h	8853	44158	0,200484623
HEp-II	*RSN*	Temp	C 64h	25018	33622	0,744096128
HEp-II	*RSN*	Pres Os	0,4M 2h	7851	45516	0,172488795
HEp-II	*RSN*	Pres Os	0,8M 2h	12270	35398	0,346629753
HEp-II	*RSN*	Pres Os	C 2h	0	41906	0
HEp-II	*RSN*	Pres Os	0,4M 5h	0	40598	0
HEp-II	*RSN*	Pres Os	0,8M 5h	16761	48398	0,346315963
HEp-II	*RSN*	Pres Os	C 5h	0	54659	0
HEp-II	*RSN*	pH	10%CO_2 24h	0	30572	0
HEp-II	*RSN*	pH	C 24h	0	30918	0
HEp-II	*RSN*	pH	10%CO_2 72h	0	44025	0
HEp-II	*RSN*	pH	C 72h	0	47713	0

BIBLIOTECA

T. 1624/07

Quantificação das amostras para *PFDN5* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH*-28c	Razão
Fadu	*PFDN5*	Temp	40°C 3h	**35767**	26625	**1,343361502**
Fadu	*PFDN5*	Temp	C 3h	**44316**	23609	**1,877080774**
Fadu	*PFDN5*	Temp	17°C 64h	**46431**	23751	**1,954907162**
Fadu	*PFDN5*	Temp	5°C 64h	**32089**	17882	**1,794486075**
Fadu	*PFDN5*	Temp	C 64h	**16753**	17586	**0,952632776**
Fadu	*PFDN5*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	0	**0**
Fadu	*PFDN5*	Pres Os	0,8M 2h	**0**	0	**0**
Fadu	*PFDN5*	Pres Os	C 2h	**25609**	0	**0**
Fadu	*PFDN5*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	0	**0**
Fadu	*PFDN5*	Pres Os	0,8M 5h	**39147**	11739	**3,334781498**
Fadu	*PFDN5*	Pres Os	C 5h	**37381**	15215	**2,456851791**
Fadu	*PFDN5*	pH	10%CO_2 24h	**37074**	9864	**3,758515815**
Fadu	*PFDN5*	pH	C 24h	**31646**	15971	**1,981466408**
Fadu	*PFDN5*	pH	10%CO_2 72h	**18421**	13178	**1,39786007**
Fadu	*PFDN5*	pH	C 72h	**16460**	14737	**1,116916604**
HeLa	*PFDN5*	Temp	40°C 3h	**20392**	41248	**0,494375485**
HeLa	*PFDN5*	Temp	C 3h	**31732**	46034	**0,689316592**
HeLa	*PFDN5*	Temp	17°C 64h	**0**	32467	**0**
HeLa	*PFDN5*	Temp	5°C 64h	**23493**	64191	**0,365985886**
HeLa	*PFDN5*	Temp	C 64h	**0**	47000	**0**
HeLa	*PFDN5*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	25457	**0**
HeLa	*PFDN5*	Pres Os	0,8M 2h	**0**	27944	**0**
HeLa	*PFDN5*	Pres Os	C 2h	**19529**	33631	**0,580684488**
HeLa	*PFDN5*	Pres Os	0,4M 5h	**42987**	55235	**0,77825654**
HeLa	*PFDN5*	Pres Os	0,8M 5h	**0**	0	**0**
HeLa	*PFDN5*	Pres Os	C 5h	**0**	15600	**0**
HeLa	*PFDN5*	pH	10%CO_2 24h	**42339**	52136	**0,812087617**
HeLa	*PFDN5*	pH	C 24h	**33466**	53063	**0,630684281**
HeLa	*PFDN5*	pH	10%CO_2 72h	**38963**	46661	**0,835022824**
HeLa	*PFDN5*	pH	C 72h	**25817**	48930	**0,52763131**
Siha	*PFDN5*	Temp	40°C 3h	**0**	25794	**0**
Siha	*PFDN5*	Temp	C 3h	**28661**	26169	**1,095227177**
Siha	*PFDN5*	Temp	17°C 64h	**14946**	24829	**0,601957389**
Siha	*PFDN5*	Temp	5°C 64h	**0**	23842	**0**
Siha	*PFDN5*	Temp	C 64h	**0**	24871	**0**
Siha	*PFDN5*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	51485	**0**
Siha	*PFDN5*	Pres Os	0,8M 2h	**0**	47575	**0**
Siha	*PFDN5*	Pres Os	C 2h	**0**	43802	**0**
Siha	*PFDN5*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	47037	**0**
Siha	*PFDN5*	Pres Os	0,8M 5h	**20614**	47066	**0,437980708**
Siha	*PFDN5*	Pres Os	C 5h	**34102**	46067	**0,740269607**
Siha	*PFDN5*	pH	10%CO_2 24h	**0**	47906	**0**
Siha	*PFDN5*	pH	C 24h	**29763**	50017	**0,59505768**
Siha	*PFDN5*	pH	10%CO_2 72h	**32812**	41845	**0,784131915**
Siha	*PFDN5*	pH	C 72h	**32503**	55507	**0,585565784**
HEp-II	*PFDN5*	Temp	40°C 3h	**12147**	45427	**0,267396042**
HEp-II	*PFDN5*	Temp	C 3h	**15395**	40652	**0,378702155**
HEp-II	*PFDN5*	Temp	17°C 64h	**0**	39810	**0**
HEp-II	*PFDN5*	Temp	5°C 64h	**0**	44158	**0**
HEp-II	*PFDN5*	Temp	C 64h	**13687**	33622	**0,407084647**
HEp-II	*PFDN5*	Pres Os	0,4M 2h	**16928**	45516	**0,371913173**
HEp-II	*PFDN5*	Pres Os	0,8M 2h	**0**	35398	**0**
HEp-II	*PFDN5*	Pres Os	C 2h	**0**	41906	**0**
HEp-II	*PFDN5*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	40598	**0**
HEp-II	*PFDN5*	Pres Os	0,8M 5h	**23606**	48398	**0,487747428**
HEp-II	*PFDN5*	Pres Os	C 5h	**13318**	54659	**0,243656123**
HEp-II	*PFDN5*	pH	10%CO_2 24h	**0**	30572	**0**
HEp-II	*PFDN5*	pH	C 24h	**21806**	30918	**0,705284947**
HEp-II	*PFDN5*	pH	10%CO_2 72h	**27912**	44025	**0,634003407**
HEp-II	*PFDN5*	pH	C 72h	**23722**	47713	**0,497181062**



Quantificação das amostras para *PDXK* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH*-28c	Razão
Fadu	*PDXK*	Temp	40°C 3h	19389	26625	0,728225352
Fadu	*PDXK*	Temp	C 3h	40350	23609	1,70909399
Fadu	*PDXK*	Temp	17°C 64h	30814	23751	1,297376953
Fadu	*PDXK*	Temp	5°C 64h	32033	17882	1,791354435
Fadu	*PDXK*	Temp	C 64h	35833	17586	2,037586717
Fadu	*PDXK*	Pres Os	0,4M 2h	16165	0	0
Fadu	*PDXK*	Pres Os	0,8M 2h	32979	0	0
Fadu	*PDXK*	Pres Os	C 2h	32036	0	0
Fadu	*PDXK*	Pres Os	0,4M 5h	0	0	0
Fadu	*PDXK*	Pres Os	0,8M 5h	21929	11739	1,868046682
Fadu	*PDXK*	Pres Os	C 5h	25539	15215	1,678540914
Fadu	*PDXK*	pH	10%CO_2 24h	15021	9864	1,522810219
Fadu	*PDXK*	pH	C 24h	42090	15971	2,635401666
Fadu	*PDXK*	pH	10%CO_2 72h	36464	13178	2,767035969
Fadu	*PDXK*	pH	C 72h	38860	14737	2,636900319
HeLa	*PDXK*	Temp	40°C 3h	32790	41248	0,794947634
HeLa	*PDXK*	Temp	C 3h	49153	46034	1,067754269
HeLa	*PDXK*	Temp	17°C 64h	26447	32467	0,814580959
HeLa	*PDXK*	Temp	5°C 64h	37295	64191	0,581000452
HeLa	*PDXK*	Temp	C 64h	30668	47000	0,652510638
HeLa	*PDXK*	Pres Os	0,4M 2h	34617	25457	1,359822446
HeLa	*PDXK*	Pres Os	0,8M 2h	39784	27944	1,423704552
HeLa	*PDXK*	Pres Os	C 2h	37869	33631	1,126014689
HeLa	*PDXK*	Pres Os	0,4M 5h	37092	55235	0,671530732
HeLa	*PDXK*	Pres Os	0,8M 5h	27372	0	0
HeLa	*PDXK*	Pres Os	C 5h	18698	15600	1,198589744
HeLa	*PDXK*	pH	10%CO_2 24h	43853	52136	0,841127052
HeLa	*PDXK*	pH	C 24h	38088	53063	0,717788289
HeLa	*PDXK*	pH	10%CO_2 72h	36405	46661	0,780201882
HeLa	*PDXK*	pH	C 72h	38520	48930	0,787247088
Siha	*PDXK*	Temp	40°C 3h	18668	25794	0,723734202
Siha	*PDXK*	Temp	C 3h	32739	26169	1,251060415
Siha	*PDXK*	Temp	17°C 64h	32553	24829	1,311087841
Siha	*PDXK*	Temp	5°C 64h	36080	23842	1,513295864
Siha	*PDXK*	Temp	C 64h	36644	24871	1,473362551
Siha	*PDXK*	Pres Os	0,4M 2h	46055	51485	0,894532388
Siha	*PDXK*	Pres Os	0,8M 2h	44023	47575	0,925338939
Siha	*PDXK*	Pres Os	C 2h	41045	43802	0,937057669
Siha	*PDXK*	Pres Os	0,4M 5h	31919	47037	0,678593448
Siha	*PDXK*	Pres Os	0,8M 5h	33923	47066	0,720753835
Siha	*PDXK*	Pres Os	C 5h	32818	46067	0,712397161
Siha	*PDXK*	pH	10%CO_2 24h	42745	47906	0,892268192
Siha	*PDXK*	pH	C 24h	35539	50017	0,710538417
Siha	*PDXK*	pH	10%CO_2 72h	35265	41845	0,842753017
Siha	*PDXK*	pH	C 72h	31407	55507	0,565820527
HEp-II	*PDXK*	Temp	40°C 3h	7534	45427	0,165848504
HEp-II	*PDXK*	Temp	C 3h	21972	40652	0,540490013
HEp-II	*PDXK*	Temp	17°C 64h	22629	39810	0,568425019
HEp-II	*PDXK*	Temp	5°C 64h	22361	44158	0,506386159
HEp-II	*PDXK*	Temp	C 64h	19537	33622	0,581077866
HEp-II	*PDXK*	Pres Os	0,4M 2h	20388	45516	0,447930398
HEp-II	*PDXK*	Pres Os	0,8M 2h	29445	35398	0,831826657
HEp-II	*PDXK*	Pres Os	C 2h	25269	41906	0,602992412
HEp-II	*PDXK*	Pres Os	0,4M 5h	0	40598	0
HEp-II	*PDXK*	Pres Os	0,8M 5h	26652	48398	0,550683913
HEp-II	*PDXK*	Pres Os	C 5h	17037	54659	0,311696153
HEp-II	*PDXK*	pH	10%CO_2 24h	0	30572	0
HEp-II	*PDXK*	pH	C 24h	14568	30918	0,471181836
HEp-II	*PDXK*	pH	10%CO_2 72h	18745	44025	0,425780806
HEp-II	*PDXK*	pH	C 72h	17996	47713	0,37717184



Quantificação das amostras para *CCNL1* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH*-28c	Razão
Fadu	*CCNL1*	Temp	40°C 3h	37691	26625	1,415624413
Fadu	*CCNL1*	Temp	C 3h	28867	23609	1,222711678
Fadu	*CCNL1*	Temp	17°C 64h	22918	23751	0,964927793
Fadu	*CCNL1*	Temp	5°C 64h	33861	17882	1,893580136
Fadu	*CCNL1*	Temp	C 64h	37749	17586	2,146537018
Fadu	*CCNL1*	Pres Os	0,4M 2h	17237	0	0
Fadu	*CCNL1*	Pres Os	0,8M 2h	26779	0	0
Fadu	*CCNL1*	Pres Os	C 2h	31839	0	0
Fadu	*CCNL1*	Pres Os	0,4M 5h	0	0	0
Fadu	*CCNL1*	Pres Os	0,8M 5h	22310	11739	1,900502598
Fadu	*CCNL1*	Pres Os	C 5h	28456	15215	1,870259612
Fadu	*CCNL1*	pH	10%CO_2 24h	32439	9864	3,288625304
Fadu	*CCNL1*	pH	C 24h	29873	15971	1,870452696
Fadu	*CCNL1*	pH	10%CO_2 72h	33394	13178	2,534071938
Fadu	*CCNL1*	pH	C 72h	33654	14737	2,283639818
HeLa	*CCNL1*	Temp	40°C 3h	22917	41248	0,555590574
HeLa	*CCNL1*	Temp	C 3h	21700	46034	0,471390711
HeLa	*CCNL1*	Temp	17°C 64h	0	32467	0
HeLa	*CCNL1*	Temp	5°C 64h	19150	64191	0,298328426
HeLa	*CCNL1*	Temp	C 64h	32719	47000	0,696148936
HeLa	*CCNL1*	Pres Os	0,4M 2h	15878	25457	0,623718427
HeLa	*CCNL1*	Pres Os	0,8M 2h	20669	27944	0,739657887
HeLa	*CCNL1*	Pres Os	C 2h	22336	33631	0,664149148
HeLa	*CCNL1*	Pres Os	0,4M 5h	27201	55235	0,492459491
HeLa	*CCNL1*	Pres Os	0,8M 5h	18179	0	0
HeLa	*CCNL1*	Pres Os	C 5h	21137	15600	1,354935897
HeLa	*CCNL1*	pH	10%CO_2 24h	26623	52136	0,510645236
HeLa	*CCNL1*	pH	C 24h	24627	53063	0,464108701
HeLa	*CCNL1*	pH	10%CO_2 72h	28656	46661	0,614131716
HeLa	*CCNL1*	pH	C 72h	26290	48930	0,537298181
Siha	*CCNL1*	Temp	40°C 3h	0	25794	0
Siha	*CCNL1*	Temp	C 3h	26992	26169	1,031449425
Siha	*CCNL1*	Temp	17°C 64h	15766	24829	0,634983286
Siha	*CCNL1*	Temp	5°C 64h	21085	23842	0,884363728
Siha	*CCNL1*	Temp	C 64h	27053	24871	1,087732701
Siha	*CCNL1*	Pres Os	0,4M 2h	34245	51485	0,665145188
Siha	*CCNL1*	Pres Os	0,8M 2h	34363	47575	0,722291119
Siha	*CCNL1*	Pres Os	C 2h	36036	43802	0,82270216
Siha	*CCNL1*	Pres Os	0,4M 5h	30049	47037	0,638837511
Siha	*CCNL1*	Pres Os	0,8M 5h	28844	47066	0,612841542
Siha	*CCNL1*	Pres Os	C 5h	35697	46067	0,77489309
Siha	*CCNL1*	pH	10%CO_2 24h	32682	47906	0,682210997
Siha	*CCNL1*	pH	C 24h	34476	50017	0,689285643
Siha	*CCNL1*	pH	10%CO_2 72h	37656	41845	0,89989246
Siha	*CCNL1*	pH	C 72h	34566	55507	0,622732268
HEp-II	*CCNL1*	Temp	40°C 3h	0	45427	0
HEp-II	*CCNL1*	Temp	C 3h	12123	40652	0,29821411
HEp-II	*CCNL1*	Temp	17°C 64h	0	39810	0
HEp-II	*CCNL1*	Temp	5°C 64h	12635	44158	0,286131618
HEp-II	*CCNL1*	Temp	C 64h	20449	33622	0,608202962
HEp-II	*CCNL1*	Pres Os	0,4M 2h	0	45516	0
HEp-II	*CCNL1*	Pres Os	0,8M 2h	0	35398	0
HEp-II	*CCNL1*	Pres Os	C 2h	8534	41906	0,203646256
HEp-II	*CCNL1*	Pres Os	0,4M 5h	9167	40598	0,2257993
HEp-II	*CCNL1*	Pres Os	0,8M 5h	0	48398	0
HEp-II	*CCNL1*	Pres Os	C 5h	8522	54659	0,15591211
HEp-II	*CCNL1*	pH	10%CO_2 24h	8132	30572	0,265995028
HEp-II	*CCNL1*	pH	C 24h	5132	30918	0,165987451
HEp-II	*CCNL1*	pH	10%CO_2 72h	9294	44025	0,211107325
HEp-II	*CCNL1*	pH	C 72h	10634	47713	0,222874269

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Quantificação das amostras para *CSDAa* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH-28c*	Razão
Fadu	*CSDA*	Temp	40°C 3h	**0**	26625	**0**
Fadu	*CSDA*	Temp	C 3h	**24838**	23609	**1,052056419**
Fadu	*CSDA*	Temp	17°C 64h	**17960**	23751	**0,756178687**
Fadu	*CSDA*	Temp	5°C 64h	**14908**	17882	**0,833687507**
Fadu	*CSDA*	Temp	C 64h	**16645**	17586	**0,946491527**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	0	**0**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	0,8M 2h	**12592**	0	**0**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	C 2h	**16520**	0	**0**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	0	**0**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	0,8M 5h	**18035**	11739	**1,536331885**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	C 5h	**29762**	15215	**1,956095958**
Fadu	*CSDA*	pH	10%CO_2 24h	**27466**	9864	**2,784468775**
Fadu	*CSDA*	pH	C 24h	**31678**	15971	**1,983470039**
Fadu	*CSDA*	pH	10%CO_2 72h	**21902**	13178	**1,662012445**
Fadu	*CSDA*	pH	C 72h	**24398**	14737	**1,655560833**
HeLa	*CSDA*	Temp	40°C 3h	**23381**	41248	**0,566839604**
HeLa	*CSDA*	Temp	C 3h	**28064**	46034	**0,609636356**
HeLa	*CSDA*	Temp	17°C 64h	**17798**	32467	**0,54818739**
HeLa	*CSDA*	Temp	5°C 64h	**26524**	64191	**0,413204343**
HeLa	*CSDA*	Temp	C 64h	**0**	47000	**0**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	0,4M 2h	**23082**	25457	**0,906705425**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	0,8M 2h	**25724**	27944	**0,920555397**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	C 2h	**30657**	33631	**0,911569683**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	0,4M 5h	**24783**	55235	**0,4486829**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	0,8M 5h	**0**	0	**0**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	C 5h	**27259**	15600	**1,747371795**
HeLa	*CSDA*	pH	10%CO_2 24h	**29183**	52136	**0,559747583**
HeLa	*CSDA*	pH	C 24h	**27982**	53063	**0,527335431**
HeLa	*CSDA*	pH	10%CO_2 72h	**26083**	46661	**0,558989306**
HeLa	*CSDA*	pH	C 72h	**29480**	48930	**0,602493358**
Siha	*CSDA*	Temp	40°C 3h	**0**	25794	**0**
Siha	*CSDA*	Temp	C 3h	**14448**	26169	**0,552103634**
Siha	*CSDA*	Temp	17°C 64h	**29781**	24829	**1,199444198**
Siha	*CSDA*	Temp	5°C 64h	**28982**	23842	**1,215585941**
Siha	*CSDA*	Temp	C 64h	**28973**	24871	**1,164931044**
Siha	*CSDA*	Pres Os	0,4M 2h	**20741**	51485	**0,402855201**
Siha	*CSDA*	Pres Os	0,8M 2h	**27518**	47575	**0,578413032**
Siha	*CSDA*	Pres Os	C 2h	**23793**	43802	**0,543194375**
Siha	*CSDA*	Pres Os	0,4M 5h	**30976**	47037	**0,6585454**
Siha	*CSDA*	Pres Os	0,8M 5h	**25606**	47066	**0,544044533**
Siha	*CSDA*	Pres Os	C 5h	**30528**	46067	**0,662686956**
Siha	*CSDA*	pH	10%CO_2 24h	**27990**	47906	**0,584269194**
Siha	*CSDA*	pH	C 24h	**26608**	50017	**0,531979127**
Siha	*CSDA*	pH	10%CO_2 72h	**24771**	41845	**0,591970367**
Siha	*CSDA*	pH	C 72h	**28993**	55507	**0,522330517**
HEp-II	*CSDA*	Temp	40°C 3h	-	45427	**0**
HEp-II	*CSDA*	Temp	C 3h	-	40652	**0**
HEp-II	*CSDA*	Temp	17°C 64h	-	39810	**0**
HEp-II	*CSDA*	Temp	5°C 64h	-	44158	**0**
HEp-II	*CSDA*	Temp	C 64h	-	33622	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	0,4M 2h	-	45516	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	0,8M 2h	-	35398	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	C 2h	-	41906	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	0,4M 5h	-	40598	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	0,8M 5h	-	48398	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	C 5h	-	54659	**0**
HEp-II	*CSDA*	pH	10%CO_2 24h	-	30572	**0**
HEp-II	*CSDA*	pH	C 24h	-	30918	**0**
HEp-II	*CSDA*	pH	10%CO_2 72h	-	44025	**0**
HEp-II	*CSDA*	pH	C 72h	-	47713	**0**



Quantificação das amostras para *CSDAb* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH*-28c	Razão
Fadu	*CSDA*	Temp	40°C 3h	**0**	26625	**0**
Fadu	*CSDA*	Temp	C 3h	**64463**	23609	**2,730441781**
Fadu	*CSDA*	Temp	17°C 64h	**61248**	23751	**2,578754579**
Fadu	*CSDA*	Temp	5°C 64h	**59711**	17882	**3,339167878**
Fadu	*CSDA*	Temp	C 64h	**54493**	17586	**3,098658023**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	0	**0**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	0,8M 2h	**34660**	0	**0**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	C 2h	**46049**	0	**0**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	0	**0**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	0,8M 5h	**43602**	11739	**3,714285714**
Fadu	*CSDA*	Pres Os	C 5h	**48806**	15215	**3,207755504**
Fadu	*CSDA*	pH	10%CO_2 24h	**56711**	9864	**5,749290349**
Fadu	*CSDA*	pH	C 24h	**63616**	15971	**3,983219585**
Fadu	*CSDA*	pH	10%CO_2 72h	**64007**	13178	**4,857110335**
Fadu	*CSDA*	pH	C 72h	**65321**	14737	**4,432448938**
HeLa	*CSDA*	Temp	40°C 3h	**35176**	41248	**0,852792863**
HeLa	*CSDA*	Temp	C 3h	**52166**	46034	**1,133205891**
HeLa	*CSDA*	Temp	17°C 64h	**36986**	32467	**1,139187483**
HeLa	*CSDA*	Temp	5°C 64h	**58366**	64191	**0,909255192**
HeLa	*CSDA*	Temp	C 64h	**17661**	47000	**0,375765957**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	0,4M 2h	**30588**	25457	**1,201555564**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	0,8M 2h	**42031**	27944	**1,504115374**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	C 2h	**45154**	33631	**1,342630311**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	0,4M 5h	**65718**	55235	**1,189789083**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	0,8M 5h	**0**	0	**0**
HeLa	*CSDA*	Pres Os	C 5h	**37019**	15600	**2,373012821**
HeLa	*CSDA*	pH	10%CO_2 24h	**46146**	52136	**0,885108179**
HeLa	*CSDA*	pH	C 24h	**61624**	53063	**1,161336525**
HeLa	*CSDA*	pH	10%CO_2 72h	**54571**	46661	**1,169520585**
HeLa	*CSDA*	pH	C 72h	**54923**	48930	**1,122481095**
Siha	*CSDA*	Temp	40°C 3h	**15495**	25794	**0,600721098**
Siha	*CSDA*	Temp	C 3h	**22648**	26169	**0,865451488**
Siha	*CSDA*	Temp	17°C 64h	**44691**	24829	**1,799951669**
Siha	*CSDA*	Temp	5°C 64h	**41428**	23842	**1,737605906**
Siha	*CSDA*	Temp	C 64h	**41996**	24871	**1,688552933**
Siha	*CSDA*	Pres Os	0,4M 2h	**42393**	51485	**0,823404875**
Siha	*CSDA*	Pres Os	0,8M 2h	**51640**	47575	**1,085444036**
Siha	*CSDA*	Pres Os	C 2h	**45109**	43802	**1,02983882**
Siha	*CSDA*	Pres Os	0,4M 5h	**54589**	47037	**1,160554457**
Siha	*CSDA*	Pres Os	0,8M 5h	**52572**	47066	**1,11698466**
Siha	*CSDA*	Pres Os	C 5h	**57030**	46067	**1,237979465**
Siha	*CSDA*	pH	10%CO_2 24h	**55423**	47906	**1,156911452**
Siha	*CSDA*	pH	C 24h	**55210**	50017	**1,1038247**
Siha	*CSDA*	pH	10%CO_2 72h	**54721**	41845	**1,307707014**
Siha	*CSDA*	pH	C 72h	**55840**	55507	**1,005999243**
HEp-II	*CSDA*	Temp	40°C 3h	-	45427	**0**
HEp-II	*CSDA*	Temp	C 3h	-	40652	**0**
HEp-II	*CSDA*	Temp	17°C 64h	-	39810	**0**
HEp-II	*CSDA*	Temp	5°C 64h	-	44158	**0**
HEp-II	*CSDA*	Temp	C 64h	-	33622	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	0,4M 2h	-	45516	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	0,8M 2h	-	35398	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	C 2h	-	41906	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	0,4M 5h	-	40598	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	0,8M 5h	-	48398	**0**
HEp-II	*CSDA*	Pres Os	C 5h	-	54659	**0**
HEp-II	*CSDA*	pH	10%CO_2 24h	-	30572	**0**
HEp-II	*CSDA*	pH	C 24h	-	30918	**0**
HEp-II	*CSDA*	pH	10%CO_2 72h	-	44025	**0**
HEp-II	*CSDA*	pH	C 72h	-	47713	**0**

unesp

Quantificação das amostras para *RIPK2a* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH*-28c	Razão
Fadu	*RICK*	Temp	40°C 3h	21720	26625	0,815774648
Fadu	*RICK*	Temp	C 3h	23858	23609	1,010546825
Fadu	*RICK*	Temp	17°C 64h	17200	23751	0,724180035
Fadu	*RICK*	Temp	5°C 64h	0	17882	0
Fadu	*RICK*	Temp	C 64h	18193	17586	1,034516092
Fadu	*RICK*	Pres Os	0,4M 2h	0	0	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	0,8M 2h	0	0	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	C 2h	16640	0	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	0,4M 5h	0	0	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	0,8M 5h	0	11739	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	C 5h	0	15215	0
Fadu	*RICK*	pH	10% 24h	23411	9864	2,37337794
Fadu	*RICK*	pH	C 24h	24551	15971	1,537223718
Fadu	*RICK*	pH	10% 72h	24684	13178	1,87312187
Fadu	*RICK*	pH	C 72h	31012	14737	2,104363168
HeLa	*RICK*	Temp	40°C 3h	21617	41248	0,524073894
HeLa	*RICK*	Temp	C 3h	0	46034	0
HeLa	*RICK*	Temp	17°C 64h	0	32467	0
HeLa	*RICK*	Temp	5°C 64h	15553	64191	0,242292533
HeLa	*RICK*	Temp	C 64h	28951	47000	0,615978723
HeLa	*RICK*	Pres Os	0,4M 2h	16119	25457	0,633185371
HeLa	*RICK*	Pres Os	0,8M 2h	22924	27944	0,820354996
HeLa	*RICK*	Pres Os	C 2h	0	33631	0
HeLa	*RICK*	Pres Os	0,4M 5h	36429	55235	0,659527474
HeLa	*RICK*	Pres Os	0,8M 5h	28614	0	0
HeLa	*RICK*	Pres Os	C 5h	19812	15600	1,27
HeLa	*RICK*	pH	10% 24h	23863	52136	0,457706767
HeLa	*RICK*	pH	C 24h	35042	53063	0,660384826
HeLa	*RICK*	pH	10% 72h	34907	46661	0,748097983
HeLa	*RICK*	pH	C 72h	18067	48930	0,369241774
Siha	*RICK*	Temp	40°C 3h	9916	25794	0,384430488
Siha	*RICK*	Temp	C 3h	9237	26169	0,352974894
Siha	*RICK*	Temp	17°C 64h	13810	24829	0,556204438
Siha	*RICK*	Temp	5°C 64h	16769	23842	0,703338646
Siha	*RICK*	Temp	C 64h	13801	24871	0,554903301
Siha	*RICK*	Pres Os	0,4M 2h	27534	51485	0,534796543
Siha	*RICK*	Pres Os	0,8M 2h	28992	47575	0,609395691
Siha	*RICK*	Pres Os	C 2h	33181	43802	0,757522488
Siha	*RICK*	Pres Os	0,4M 5h	31615	47037	0,67213045
Siha	*RICK*	Pres Os	0,8M 5h	27278	47066	0,579569116
Siha	*RICK*	Pres Os	C 5h	26966	46067	0,585364795
Siha	*RICK*	pH	10% 24h	21938	47906	0,457938463
Siha	*RICK*	pH	C 24h	22183	50017	0,443509207
Siha	*RICK*	pH	10% 72h	26087	41845	0,623419763
Siha	*RICK*	pH	C 72h	31473	55507	0,567009566
HEp-II	*RICK*	Temp	40°C 3h	5390	45427	0,118651903
HEp-II	*RICK*	Temp	C 3h	0	40652	0
HEp-II	*RICK*	Temp	17°C 64h	0	39810	0
HEp-II	*RICK*	Temp	5°C 64h	0	44158	0
HEp-II	*RICK*	Temp	C 64h	0	33622	0
HEp-II	*RICK*	Pres Os	0,4M 2h	0	45516	0
HEp-II	*RICK*	Pres Os	0,8M 2h	0	35398	0
HEp-II	*RICK*	Pres Os	C 2h	0	41906	0
HEp-II	*RICK*	Pres Os	0,4M 5h	6448	40598	0,158825558
HEp-II	*RICK*	Pres Os	0,8M 5h	9940	48398	0,205380388
HEp-II	*RICK*	Pres Os	C 5h	10353	54659	0,18941071
HEp-II	*RICK*	pH	10% 24h	0	30572	0
HEp-II	*RICK*	pH	C 24h	0	30918	0
HEp-II	*RICK*	pH	10% 72h	7065	44025	0,160477002
HEp-II	*RICK*	pH	C 72h	0	47713	0



Quantificação das amostras para *RIPK2b* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH*-28c	Razão
Fadu	*RICK*	Temp	40°C 3h	0	26625	0
Fadu	*RICK*	Temp	C 3h	24342	23609	1,031047482
Fadu	*RICK*	Temp	17°C 64h	38228	23751	1,60953223
Fadu	*RICK*	Temp	5°C 64h	0	17882	0
Fadu	*RICK*	Temp	C 64h	0	17586	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	0,4M 2h	0	0	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	0,8M 2h	0	0	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	C 2h	0	0	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	0,4M 5h	0	0	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	0,8M 5h	0	11739	0
Fadu	*RICK*	Pres Os	C 5h	0	15215	0
Fadu	*RICK*	pH	10% 24h	23836	9864	2,416463909
Fadu	*RICK*	pH	C 24h	22493	15971	1,408365162
Fadu	*RICK*	pH	10% 72h	25299	13178	1,91979056
Fadu	*RICK*	pH	C 72h	24391	14737	1,655085838
HeLa	*RICK*	Temp	40°C 3h	0	41248	0
HeLa	*RICK*	Temp	C 3h	0	46034	0
HeLa	*RICK*	Temp	17°C 64h	0	32467	0
HeLa	*RICK*	Temp	5°C 64h	26464	64191	0,412269633
HeLa	*RICK*	Temp	C 64h	24208	47000	0,51506383
HeLa	*RICK*	Pres Os	0,4M 2h	0	25457	0
HeLa	*RICK*	Pres Os	0,8M 2h	18954	27944	0,678285142
HeLa	*RICK*	Pres Os	C 2h	0	33631	0
HeLa	*RICK*	Pres Os	0,4M 5h	23099	55235	0,418194985
HeLa	*RICK*	Pres Os	0,8M 5h	17224	0	0
HeLa	*RICK*	Pres Os	C 5h	18865	15600	1,209294872
HeLa	*RICK*	pH	10% 24h	22557	52136	0,432656897
HeLa	*RICK*	pH	C 24h	36581	53063	0,689388086
HeLa	*RICK*	pH	10% 72h	37023	46661	0,793446347
HeLa	*RICK*	pH	C 72h	24225	48930	0,495095034
Siha	*RICK*	Temp	40°C 3h	0	25794	0
Siha	*RICK*	Temp	C 3h	0	26169	0
Siha	*RICK*	Temp	17°C 64h	15982	24829	0,64368279
Siha	*RICK*	Temp	5°C 64h	12126	23842	0,508598272
Siha	*RICK*	Temp	C 64h	10143	24871	0,407824374
Siha	*RICK*	Pres Os	0,4M 2h	12041	51485	0,233873944
Siha	*RICK*	Pres Os	0,8M 2h	13891	47575	0,291981083
Siha	*RICK*	Pres Os	C 2h	31387	43802	0,716565454
Siha	*RICK*	Pres Os	0,4M 5h	22803	47037	0,484788571
Siha	*RICK*	Pres Os	0,8M 5h	7494	47066	0,159223218
Siha	*RICK*	Pres Os	C 5h	27121	46067	0,588729459
Siha	*RICK*	pH	10% 24h	26741	47906	0,558197303
Siha	*RICK*	pH	C 24h	23537	50017	0,470580003
Siha	*RICK*	pH	10% 72h	25730	41845	0,614888278
Siha	*RICK*	pH	C 72h	23965	55507	0,431747347
HEp-II	*RICK*	Temp	40°C 3h	0	45427	0
HEp-II	*RICK*	Temp	C 3h	0	40652	0
HEp-II	*RICK*	Temp	17°C 64h	0	39810	0
HEp-II	*RICK*	Temp	5°C 64h	0	44158	0
HEp-II	*RICK*	Temp	C 64h	0	33622	0
HEp-II	*RICK*	Pres Os	0,4M 2h	0	45516	0
HEp-II	*RICK*	Pres Os	0,8M 2h	0	35398	0
HEp-II	*RICK*	Pres Os	C 2h	0	41906	0
HEp-II	*RICK*	Pres Os	0,4M 5h	0	40598	0
HEp-II	*RICK*	Pres Os	0,8M 5h	0	48398	0
HEp-II	*RICK*	Pres Os	C 5h	0	54659	0
HEp-II	*RICK*	pH	10% 24h	0	30572	0
HEp-II	*RICK*	pH	C 24h	0	30918	0
HEp-II	*RICK*	pH	10% 72h	6740	44025	0,153094832
HEp-II	*RICK*	pH	C 72h	9925	47713	0,208014587

unesp

Quantificação das amostras para *DHX15* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH*	Razão
Fadu	*DEAD/H*	Temp	40°C 3h	**0**	26625	**0**
Fadu	*DEAD/H*	Temp	C 3h	**0**	23609	**0**
Fadu	*DEAD/H*	Temp	17°C 64h	**0**	23751	**0**
Fadu	*DEAD/H*	Temp	5°C 64h	**0**	17882	**0**
Fadu	*DEAD/H*	Temp	C 64h	**0**	17586	**0**
Fadu	*DEAD/H*	Pres Os	0,4M 2h	**0**	0	**0**
Fadu	*DEAD/H*	Pres Os	0,8M 2h	**22158**	0	**0**
Fadu	*DEAD/H*	Pres Os	C 2h	**23570**	0	**0**
Fadu	*DEAD/H*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	0	**0**
Fadu	*DEAD/H*	Pres Os	0,8M 5h	**19314**	11739	**1,645284948**
Fadu	*DEAD/H*	Pres Os	C 5h	**16098**	15215	**1,058034834**
Fadu	*DEAD/H*	pH	10%CO_2 24h	**32918**	9864	**3,337185726**
Fadu	*DEAD/H*	pH	C 24h	**30164**	15971	**1,88867322**
Fadu	*DEAD/H*	pH	10%CO_2 72h	**20618**	13178	**1,564577326**
Fadu	*DEAD/H*	pH	C 72h	**28982**	14737	**1,966614643**
HeLa	*DEAD/H*	Temp	40°C 3h	**47612**	41248	**1,154286268**
HeLa	*DEAD/H*	Temp	C 3h	**13426**	46034	**0,291653995**
HeLa	*DEAD/H*	Temp	17°C 64h	**0**	32467	**0**
HeLa	*DEAD/H*	Temp	5°C 64h	**29965**	64191	**0,466809989**
HeLa	*DEAD/H*	Temp	C 64h	**40151**	47000	**0,854276596**
HeLa	*DEAD/H*	Pres Os	0,4M 2h	**28278**	25457	**1,110814314**
HeLa	*DEAD/H*	Pres Os	0,8M 2h	**31663**	27944	**1,133087604**
HeLa	*DEAD/H*	Pres Os	C 2h	**39843**	33631	**1,184710535**
HeLa	*DEAD/H*	Pres Os	0,4M 5h	**30885**	55235	**0,559156332**
HeLa	*DEAD/H*	Pres Os	0,8M 5h	**30325**	0	**0**
HeLa	*DEAD/H*	Pres Os	C 5h	**0**	15600	**0**
HeLa	*DEAD/H*	pH	10%CO_2 24h	**33755**	52136	**0,647441307**
HeLa	*DEAD/H*	pH	C 24h	**33345**	53063	**0,628403973**
HeLa	*DEAD/H*	pH	10%CO_2 72h	**29389**	46661	**0,629840766**
HeLa	*DEAD/H*	pH	C 72h	**24396**	48930	**0,498589822**
Siha	*DEAD/H*	Temp	40°C 3h	**19787**	25794	**0,767116384**
Siha	*DEAD/H*	Temp	C 3h	**13902**	26169	**0,531239253**
Siha	*DEAD/H*	Temp	17°C 64h	**20742**	24829	**0,835394096**
Siha	*DEAD/H*	Temp	5°C 64h	**11026**	23842	**0,462461203**
Siha	*DEAD/H*	Temp	C 64h	**12169**	24871	**0,489284709**
Siha	*DEAD/H*	Pres Os	0,4M 2h	**33825**	51485	**0,656987472**
Siha	*DEAD/H*	Pres Os	0,8M 2h	**31260**	47575	**0,657067788**
Siha	*DEAD/H*	Pres Os	C 2h	**28532**	43802	**0,651385781**
Siha	*DEAD/H*	Pres Os	0,4M 5h	**29883**	47037	**0,635308374**
Siha	*DEAD/H*	Pres Os	0,8M 5h	**12225**	47066	**0,259741639**
Siha	*DEAD/H*	Pres Os	C 5h	**32112**	46067	**0,697071657**
Siha	*DEAD/H*	pH	10%CO_2 24h	**29332**	47906	**0,612282386**
Siha	*DEAD/H*	pH	C 24h	**30768**	50017	**0,615150849**
Siha	*DEAD/H*	pH	10%CO_2 72h	**28814**	41845	**0,68858884**
Siha	*DEAD/H*	pH	C 72h	**32725**	55507	**0,58956528**
HEp-II	*DEAD/H*	Temp	40°C 3h	**12969**	45427	**0,285491008**
HEp-II	*DEAD/H*	Temp	C 3h	**14378**	40652	**0,353684936**
HEp-II	*DEAD/H*	Temp	17°C 64h	**10591**	39810	**0,266038684**
HEp-II	*DEAD/H*	Temp	5°C 64h	**9241**	44158	**0,209271253**
HEp-II	*DEAD/H*	Temp	C 64h	**19424**	33622	**0,577716971**
HEp-II	*DEAD/H*	Pres Os	0,4M 2h	**25481**	45516	**0,559825116**
HEp-II	*DEAD/H*	Pres Os	0,8M 2h	**12186**	35398	**0,344256738**
HEp-II	*DEAD/H*	Pres Os	C 2h	**20048**	41906	**0,478404047**
HEp-II	*DEAD/H*	Pres Os	0,4M 5h	**0**	40598	**0**
HEp-II	*DEAD/H*	Pres Os	0,8M 5h	**21270**	48398	**0,43948097**
HEp-II	*DEAD/H*	Pres Os	C 5h	**28506**	54659	**0,52152436**
HEp-II	*DEAD/H*	pH	10%CO_2 24h	**23919**	30572	**0,782382572**
HEp-II	*DEAD/H*	pH	C 24h	**25146**	30918	**0,813312633**
HEp-II	*DEAD/H*	pH	10%CO_2 72h	**24976**	44025	**0,567314026**
HEp-II	*DEAD/H*	pH	C 72h	**21618**	47713	**0,453084065**



Quantificação das amostras para *VAV2* 35 ciclos

Linhagem	Gene	Exp	Condição	*Pixels*	*GAPDH*-28c	Razão
Fadu	*VAV-2*	Temp	40°C 3h	45352	26625	1,703361502
Fadu	*VAV-2*	Temp	C 3h	48263	23609	2,044262781
Fadu	*VAV-2*	Temp	17°C 64h	43833	23751	1,845522294
Fadu	*VAV-2*	Temp	5°C 64h	32866	17882	1,837937591
Fadu	*VAV-2*	Temp	C 64h	25188	17586	1,432275674
Fadu	*VAV-2*	Pres Os	0,4M 2h	0	0	0
Fadu	*VAV-2*	Pres Os	0,8M 2h	34975	0	0
Fadu	*VAV-2*	Pres Os	C 2h	27146	0	0
Fadu	*VAV-2*	Pres Os	0,4M 5h	0	0	0
Fadu	*VAV-2*	Pres Os	0,8M 5h	33256	11739	2,832949996
Fadu	*VAV-2*	Pres Os	C 5h	29748	15215	1,955175813
Fadu	*VAV-2*	pH	10%CO_2 24h	39413	9864	3,995640714
Fadu	*VAV-2*	pH	C 24h	43196	15971	2,704652182
Fadu	*VAV-2*	pH	10%CO_2 72h	41085	13178	3,11769616
Fadu	*VAV-2*	pH	C 72h	9693	14737	0,657732239
HeLa	*VAV-2*	Temp	40°C 3h	26259	41248	0,636612684
HeLa	*VAV-2*	Temp	C 3h	24221	46034	0,526154581
HeLa	*VAV-2*	Temp	17°C 64h	20294	32467	0,625065451
HeLa	*VAV-2*	Temp	5°C 64h	41545	64191	0,64720911
HeLa	*VAV-2*	Temp	C 64h	38296	47000	0,814808511
HeLa	*VAV-2*	Pres Os	0,4M 2h	18354	25457	0,720980477
HeLa	*VAV-2*	Pres Os	0,8M 2h	27810	27944	0,995204695
HeLa	*VAV-2*	Pres Os	C 2h	20784	33631	0,618001249
HeLa	*VAV-2*	Pres Os	0,4M 5h	33659	55235	0,609378112
HeLa	*VAV-2*	Pres Os	0,8M 5h	12466	0	0
HeLa	*VAV-2*	Pres Os	C 5h	23011	15600	1,475064103
HeLa	*VAV-2*	pH	10%CO_2 24h	43111	52136	0,826895044
HeLa	*VAV-2*	pH	C 24h	49479	53063	0,932457645
HeLa	*VAV-2*	pH	10%CO_2 72h	50524	46661	1,082788624
HeLa	*VAV-2*	pH	C 72h	53570	48930	1,094829348
Siha	*VAV-2*	Temp	40°C 3h	13301	25794	0,515662557
Siha	*VAV-2*	Temp	C 3h	27484	26169	1,050250296
Siha	*VAV-2*	Temp	17°C 64h	23414	24829	0,94301019
Siha	*VAV-2*	Temp	5°C 64h	21998	23842	0,922657495
Siha	*VAV-2*	Temp	C 64h	20187	24871	0,811668208
Siha	*VAV-2*	Pres Os	0,4M 2h	39723	51485	0,77154511
Siha	*VAV-2*	Pres Os	0,8M 2h	35119	47575	0,738181818
Siha	*VAV-2*	Pres Os	C 2h	43123	43802	0,984498425
Siha	*VAV-2*	Pres Os	0,4M 5h	39042	47037	0,830027425
Siha	*VAV-2*	Pres Os	0,8M 5h	36502	47066	0,775549229
Siha	*VAV-2*	Pres Os	C 5h	43539	46067	0,945123407
Siha	*VAV-2*	pH	10%CO_2 24h	44363	47906	0,926042667
Siha	*VAV-2*	pH	C 24h	42714	50017	0,853989644
Siha	*VAV-2*	pH	10%CO_2 72h	52304	41845	1,24994623
Siha	*VAV-2*	pH	C 72h	46962	55507	0,846055452
HEp-II	*VAV-2*	Temp	40°C 3h	9307	45427	0,204878156
HEp-II	*VAV-2*	Temp	C 3h	7758	40652	0,190839319
HEp-II	*VAV-2*	Temp	17°C 64h	9661	39810	0,242677719
HEp-II	*VAV-2*	Temp	5°C 64h	11433	44158	0,258911183
HEp-II	*VAV-2*	Temp	C 64h	7819	33622	0,232556064
HEp-II	*VAV-2*	Pres Os	0,4M 2h	7660	45516	0,168292469
HEp-II	*VAV-2*	Pres Os	0,8M 2h	8903	35398	0,251511385
HEp-II	*VAV-2*	Pres Os	C 2h	5663	41906	0,13513578
HEp-II	*VAV-2*	Pres Os	0,4M 5h	9261	40598	0,228114685
HEp-II	*VAV-2*	Pres Os	0,8M 5h	8056	48398	0,166453159
HEp-II	*VAV-2*	Pres Os	C 5h	11655	54659	0,213231124
HEp-II	*VAV-2*	pH	10%CO_2 24h	12326	30572	0,40317938
HEp-II	*VAV-2*	pH	C 24h	10908	30918	0,352804192
HEp-II	*VAV-2*	pH	10%CO_2 72h	8542	44025	0,194026122
HEp-II	*VAV-2*	pH	C 72h	10166	47713	0,213065622



APÊNDICE II

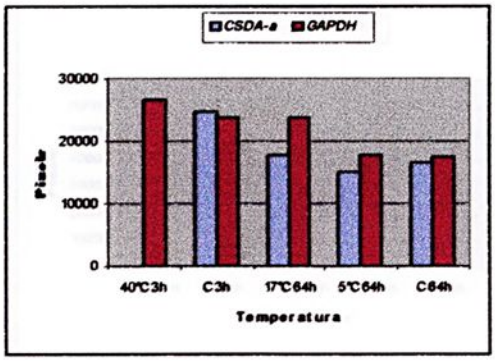
Gráficos obtidos a partir da análise semiquantitativa de produtos de amplificação dos genes *CSDA, CCNL1, PFDN5, DHX15, N33, PDXK, RSN, RIPK2, SMARCB6* e *VAV2*

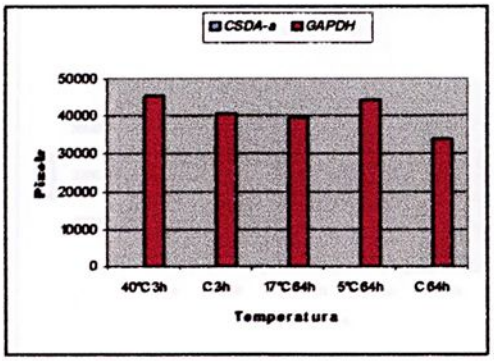
unesp

CSDA-isoforma-a (501pb)

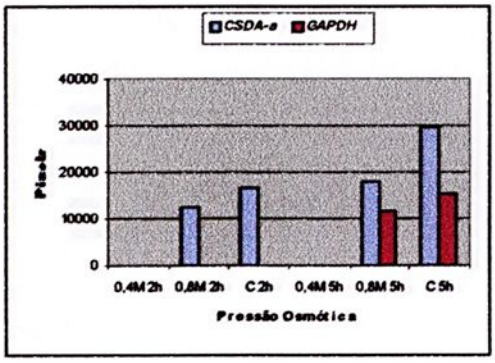
Fadu **HEp-2**

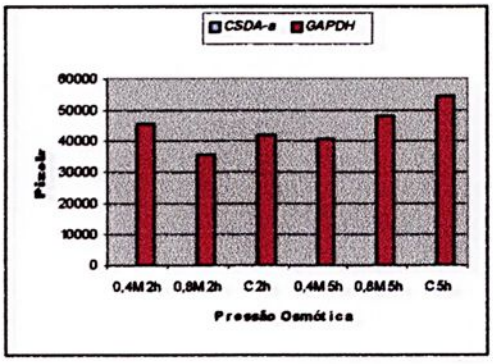
A



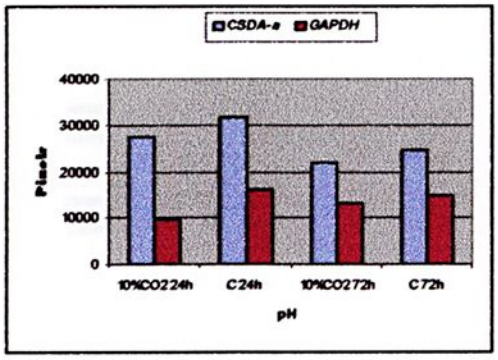


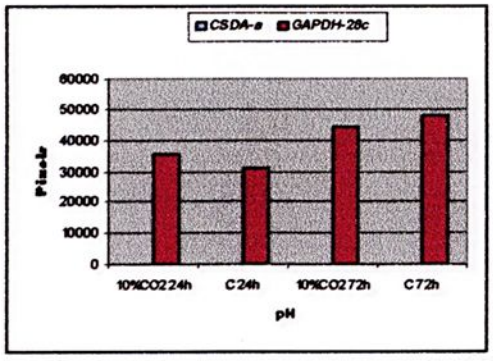
B





C

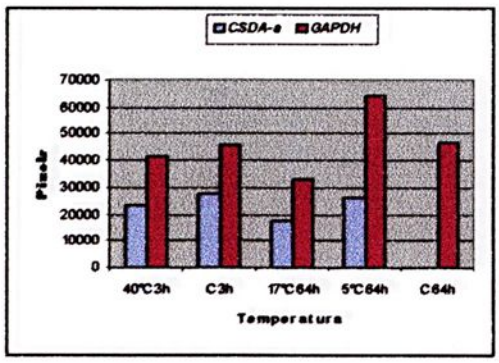


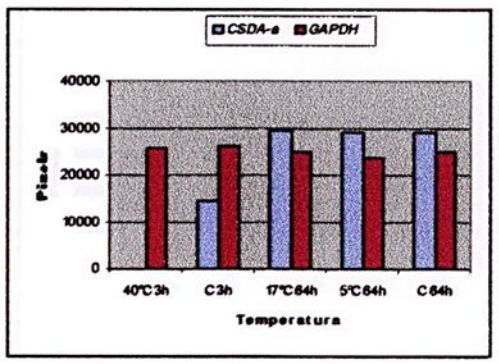


CSDA-isoforma-a (501pb)

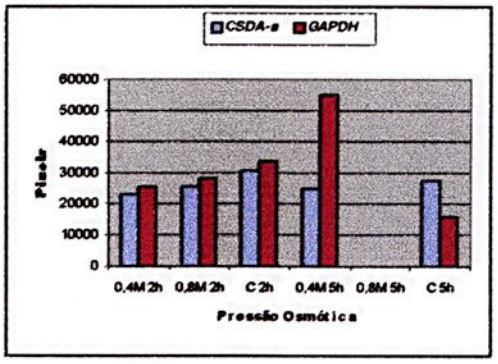
HeLa **Siha**

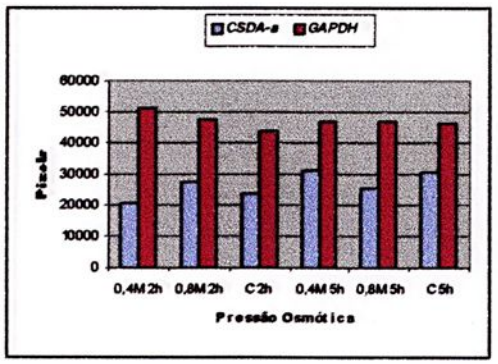
A



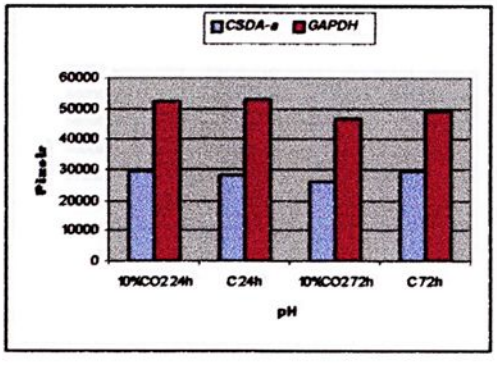


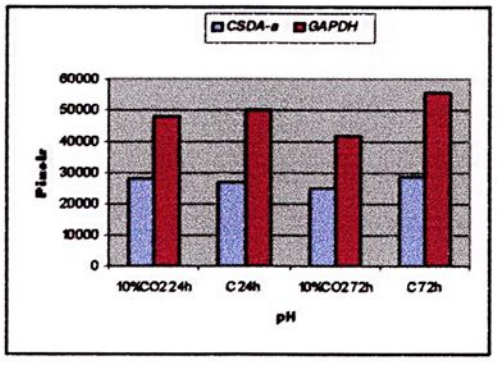
B





C

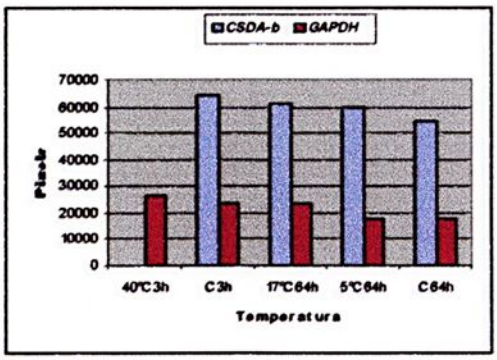




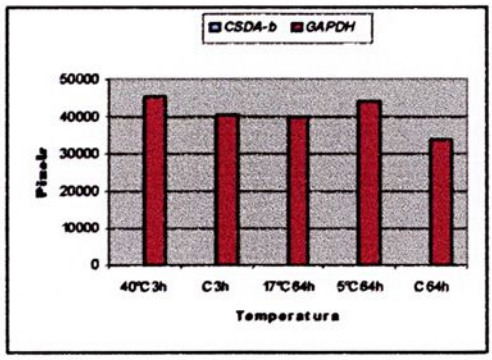
CSDA-isoforma-b (290pb)

Fadu **HEp-2**

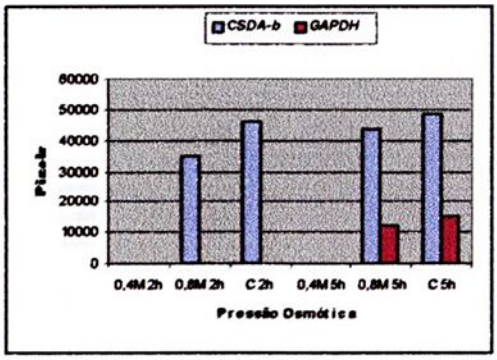
A



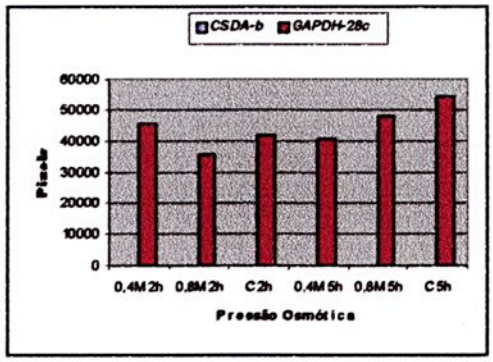
A



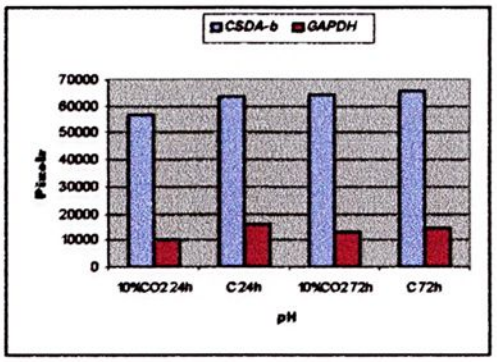
B



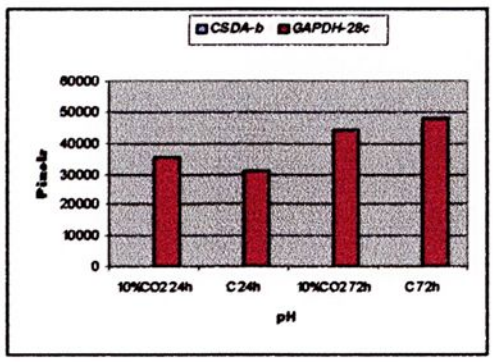
B



C



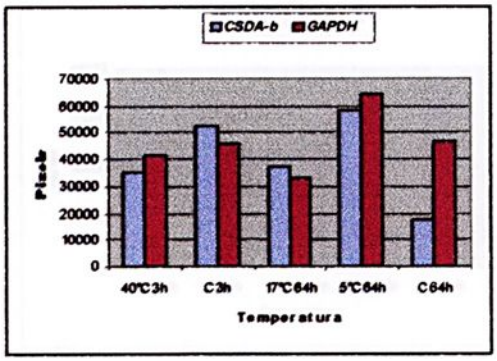
C

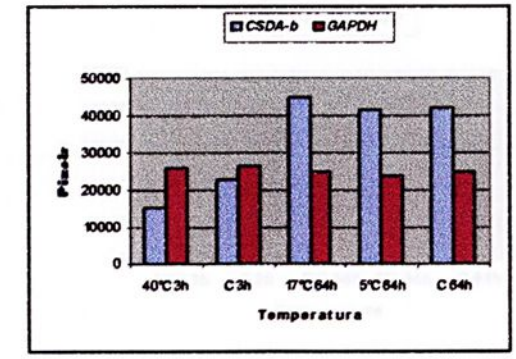


CSDA-isoforma-b (290pb)

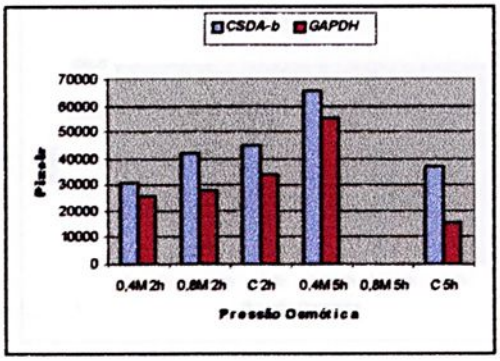
HeLa **Siha**

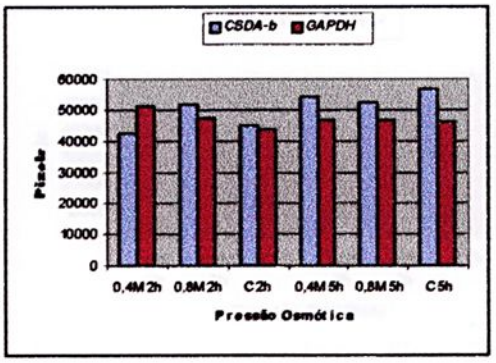
A



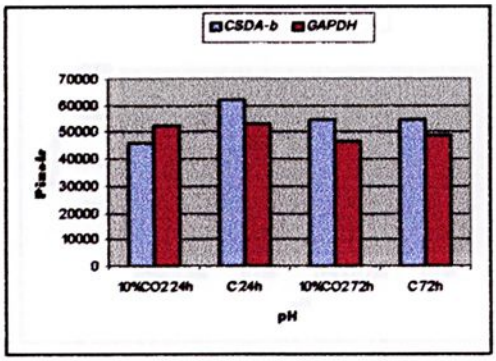


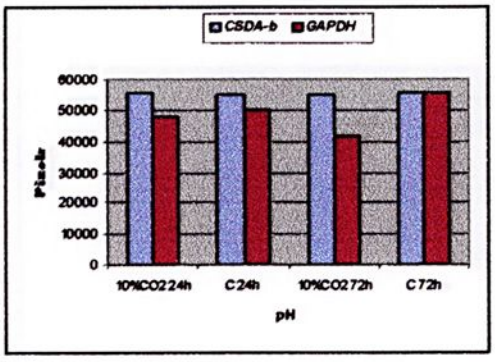
B





C

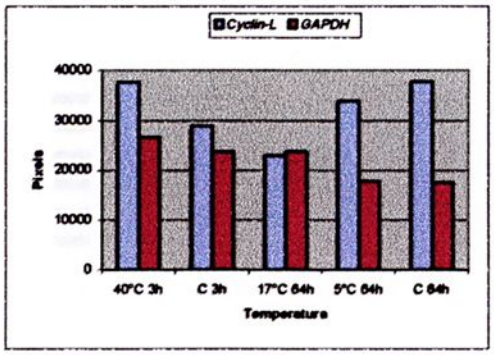




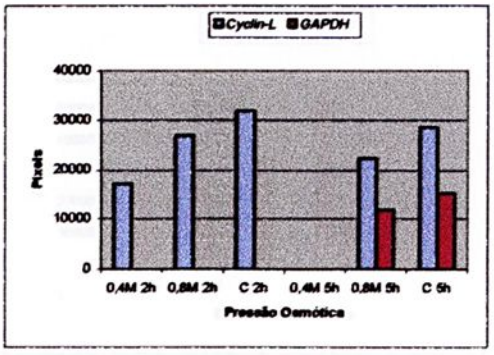
CCNL1 (325pb)

Fadu

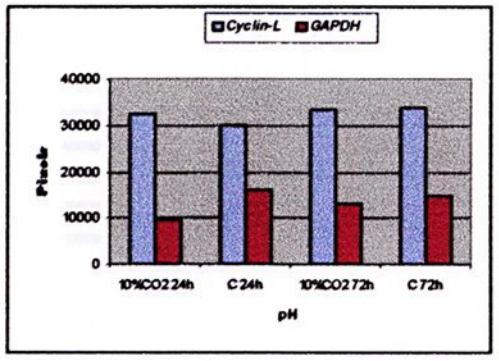
A



B

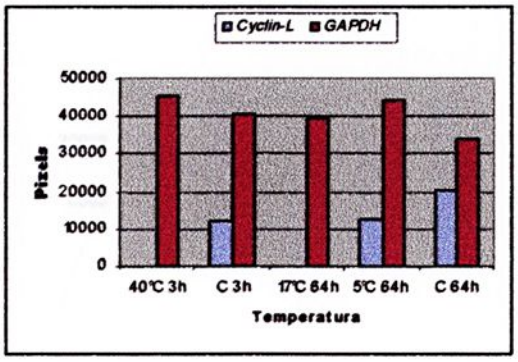


C

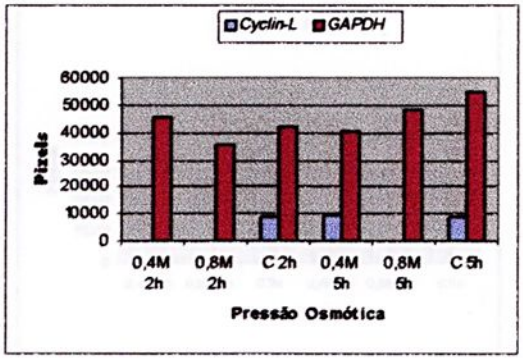


HEp-2

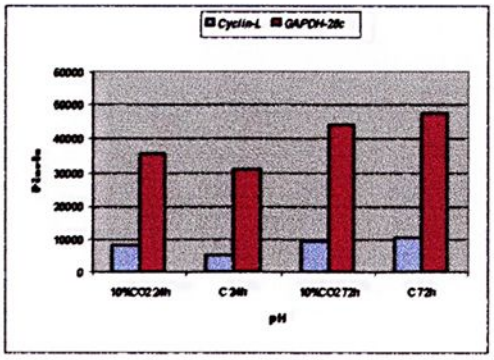
A



B



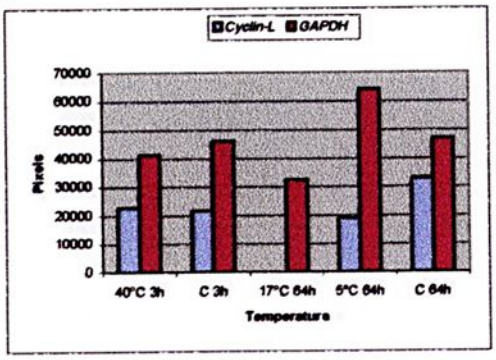
C



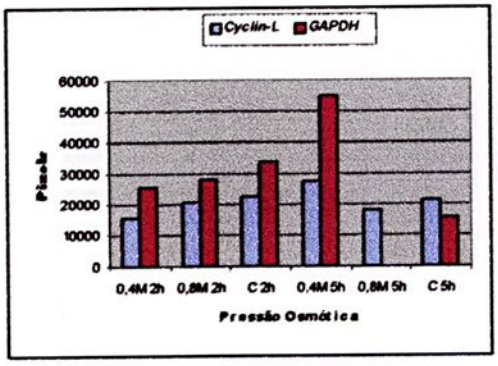
CCNL1 (325pb)

HeLa

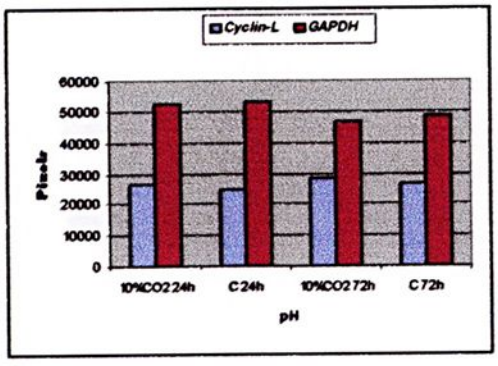
A



B

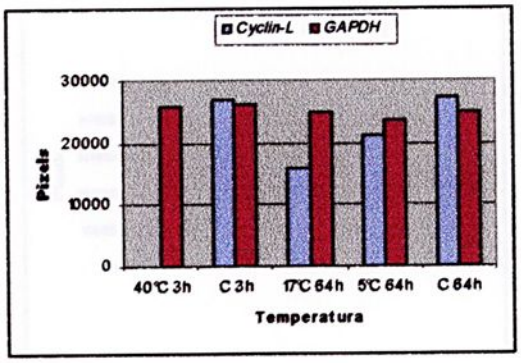


C

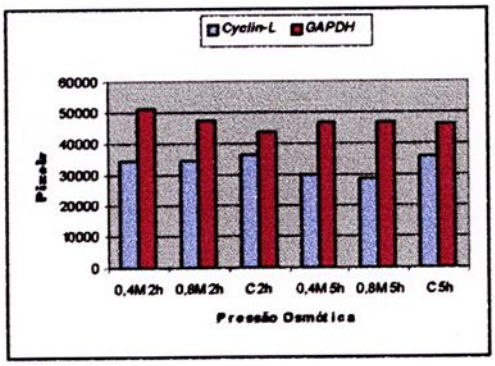


Siha

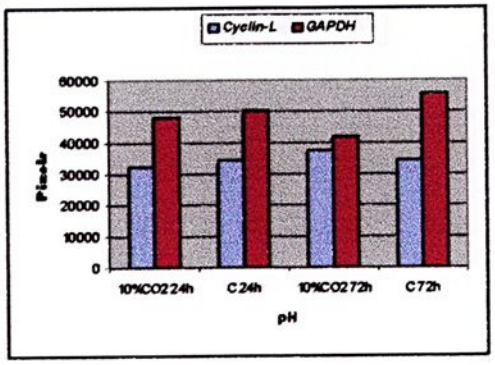
A



B



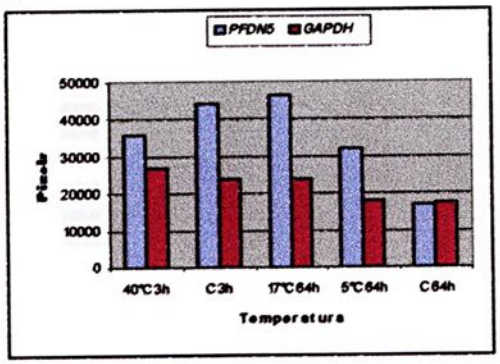
C

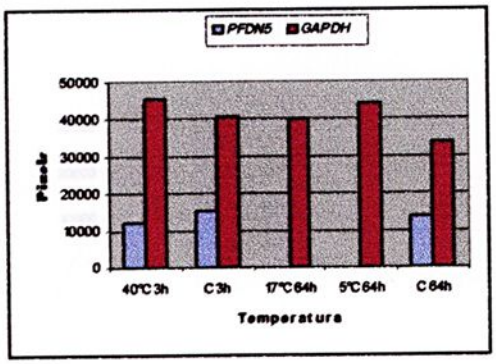


PFDN5 (319pb)

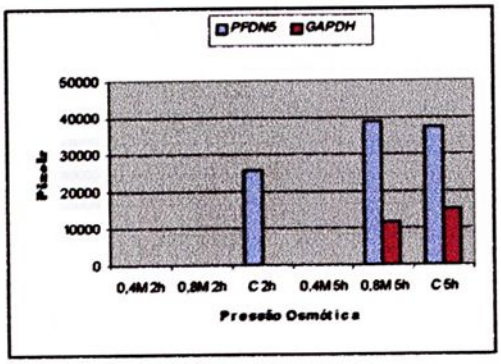
Fadu | **HEp-2**

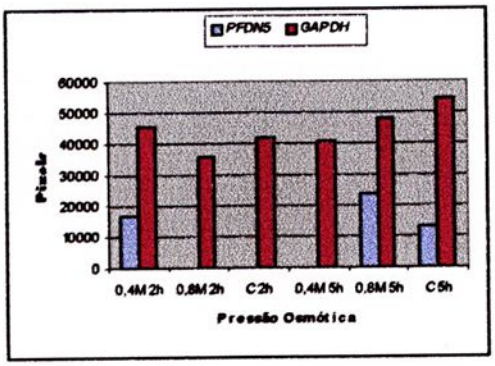
A



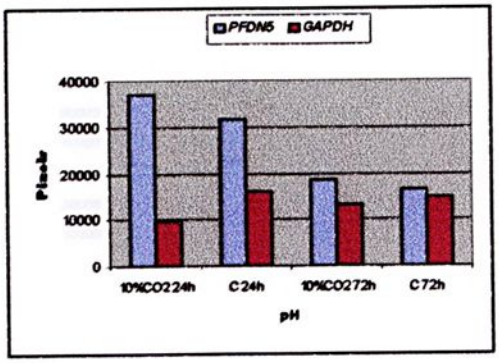


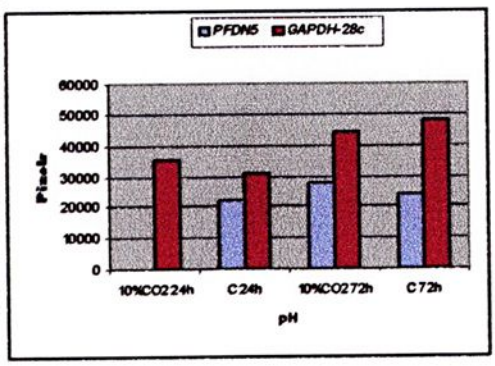
B





C

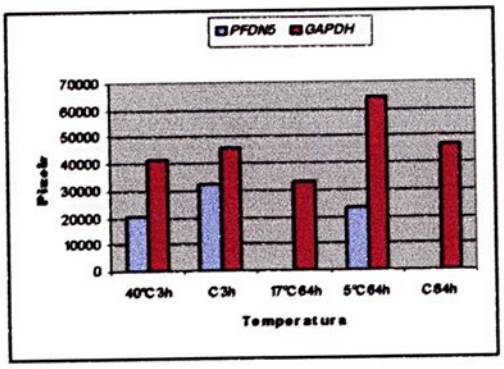




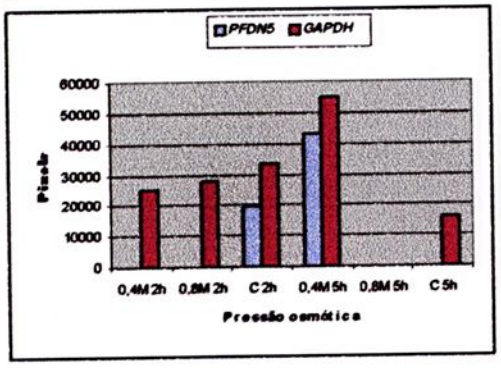
PFDN5 (319pb)

HeLa

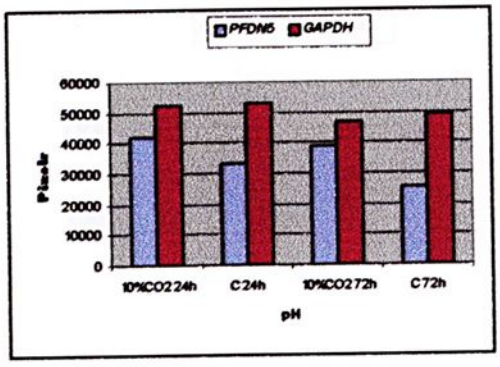
A



B

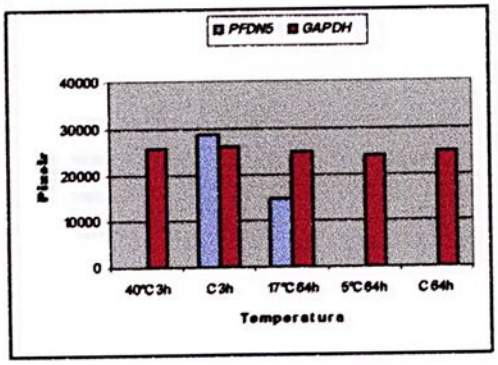


C

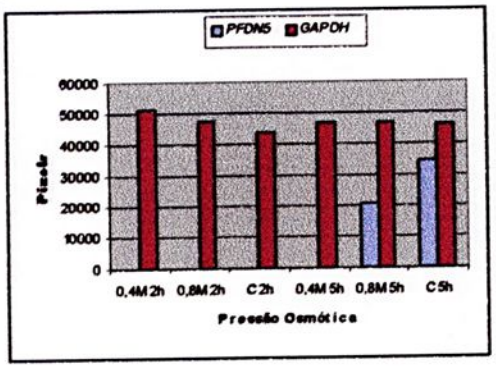


Siha

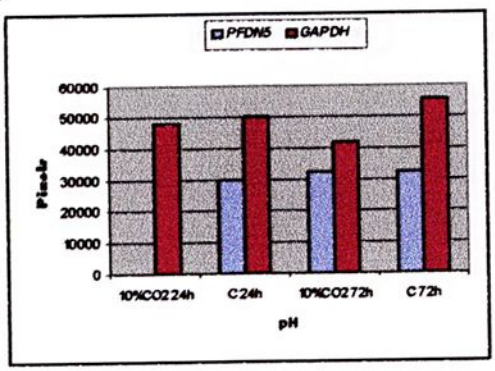
A



B



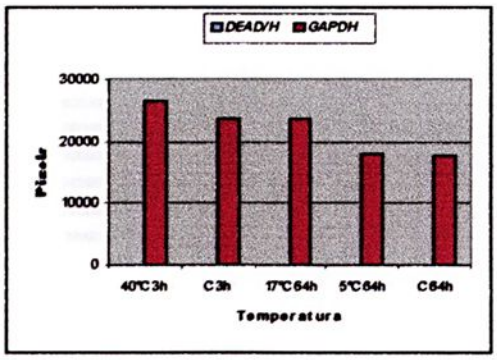
C



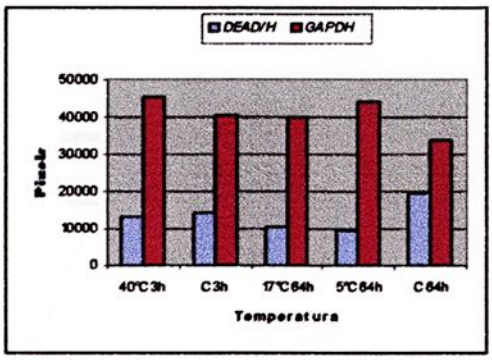
DHX15 (351pb)

Fadu **HEp-2**

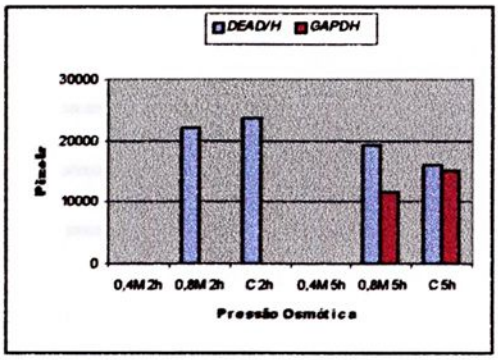
A



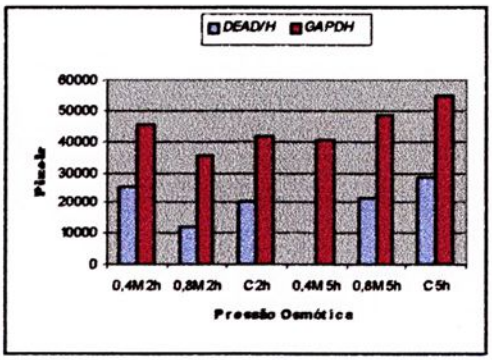
A



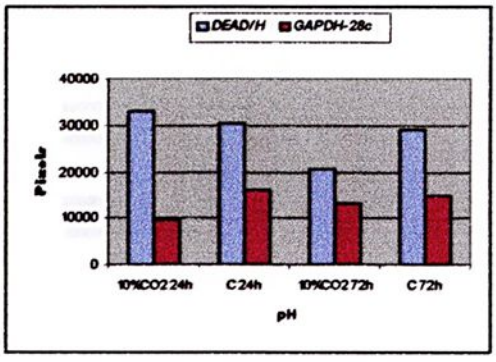
B



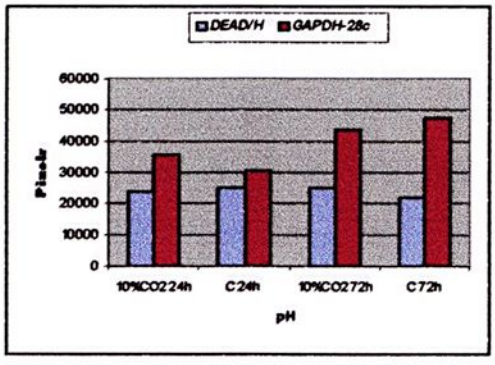
B



C



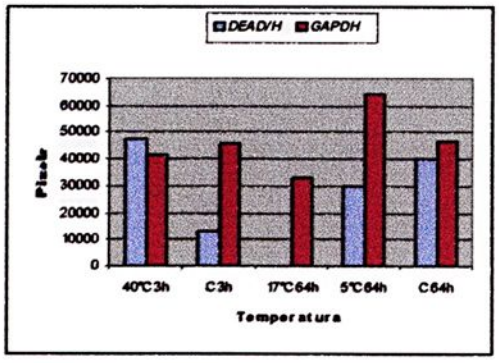
C

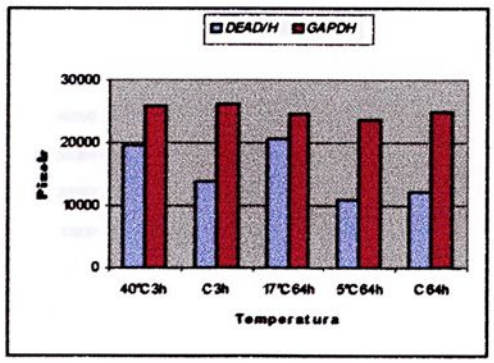


***DHX15* (351pb)**

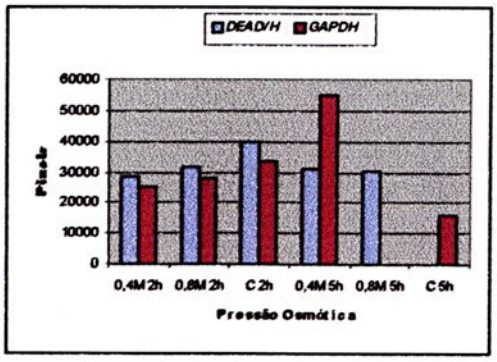
HeLa **Siha**

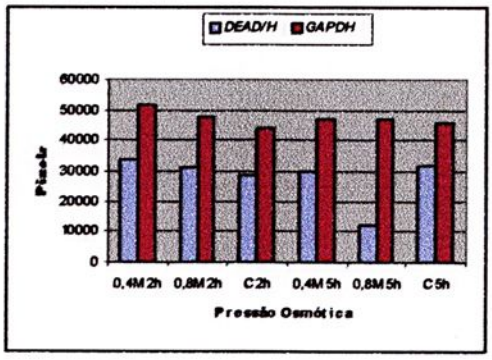
A



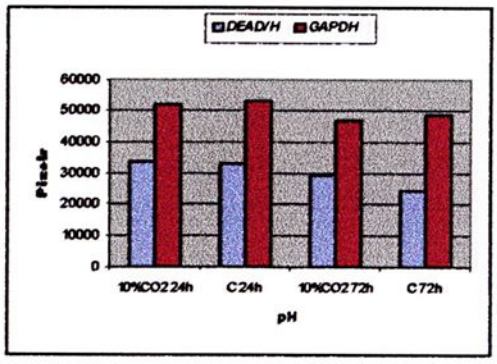


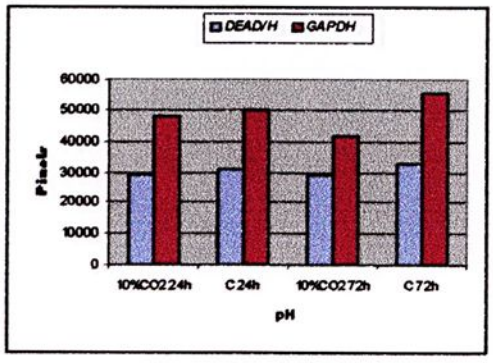
B





C

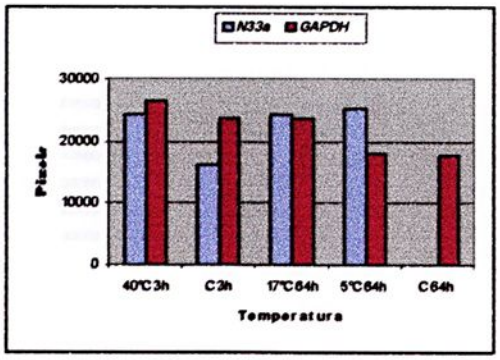




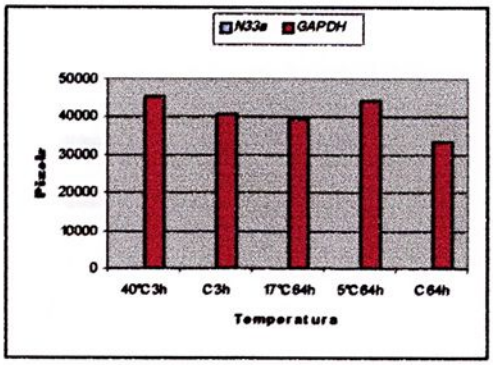
N33 isoforma-a (490pb)

Fadu **HEp-2**

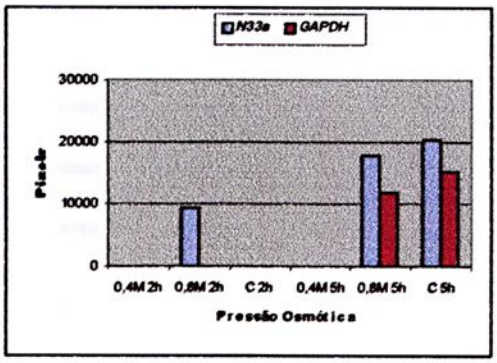
A



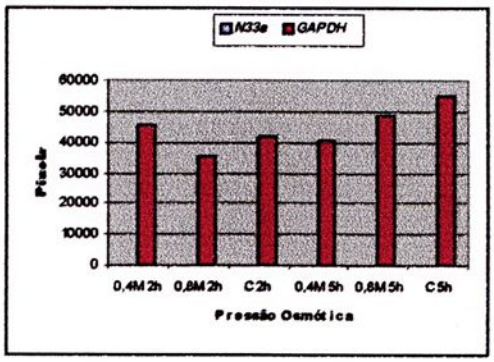
A



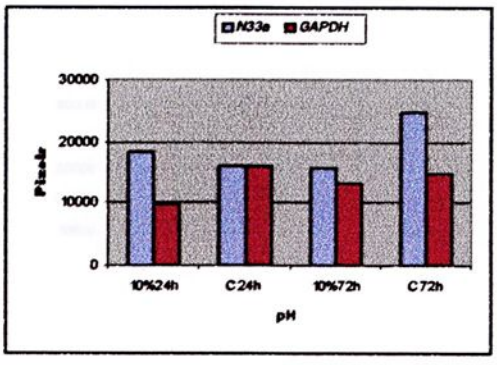
B



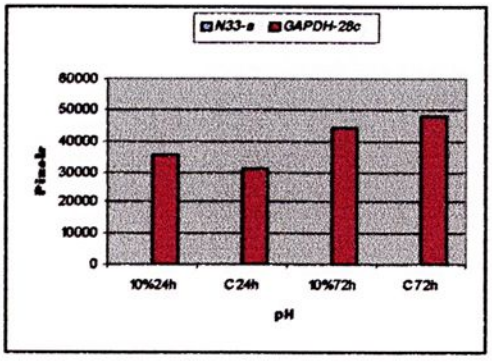
B



C



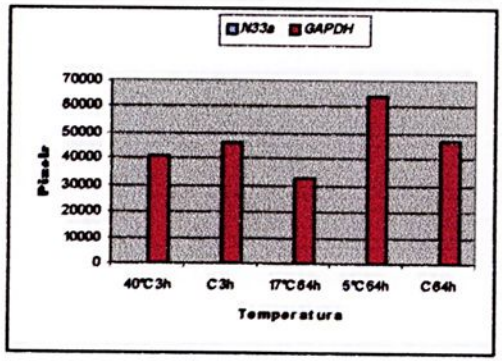
C



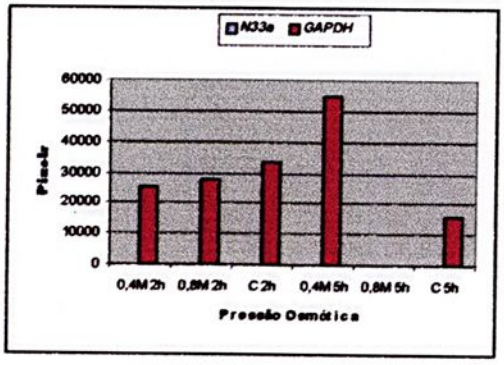
N33 isoforma-a (490pb)

HeLa

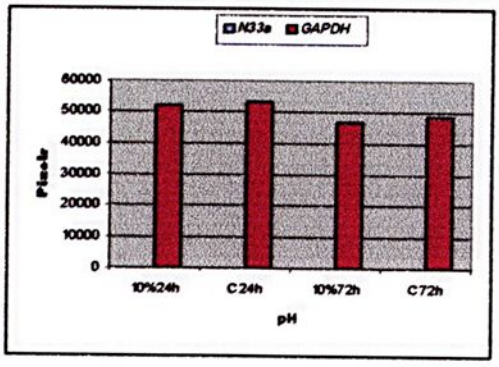
A



B

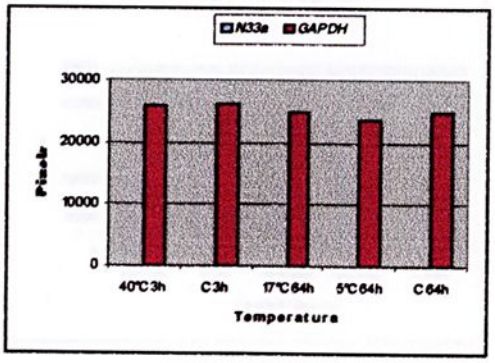


C

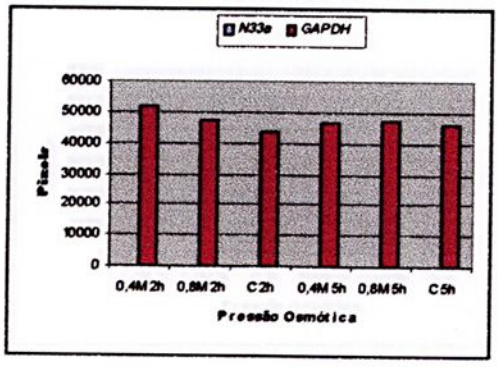


Siha

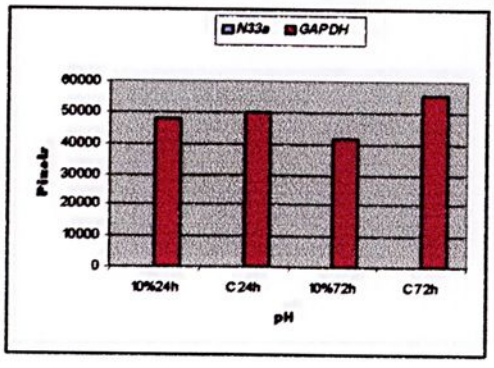
A



B



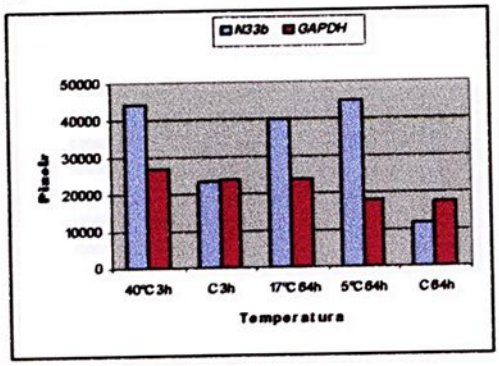
C

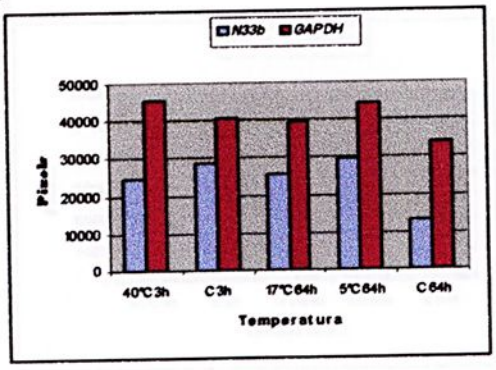


N33 isoforma-b (400pb)

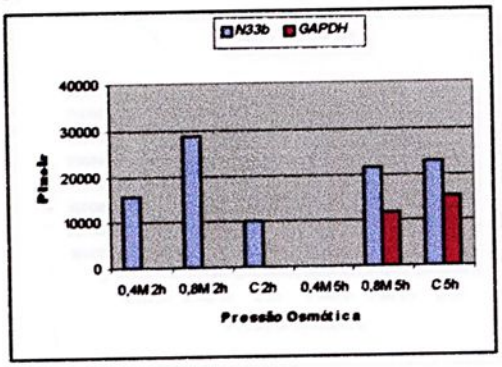
Fadu | **HEp-2**

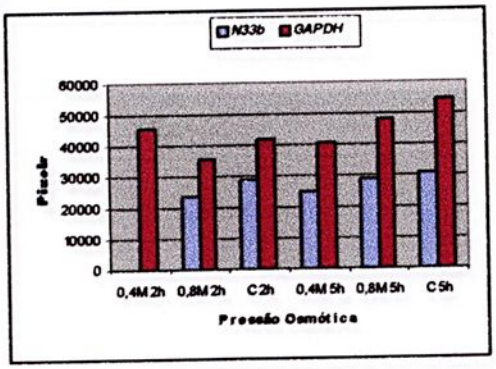
A



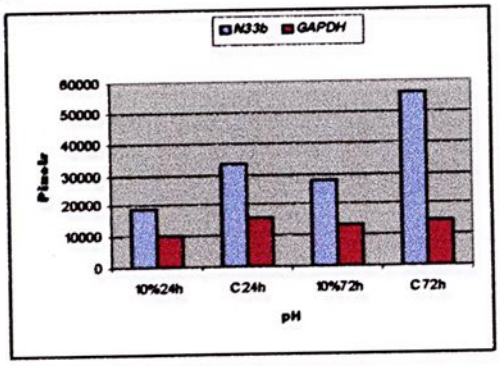


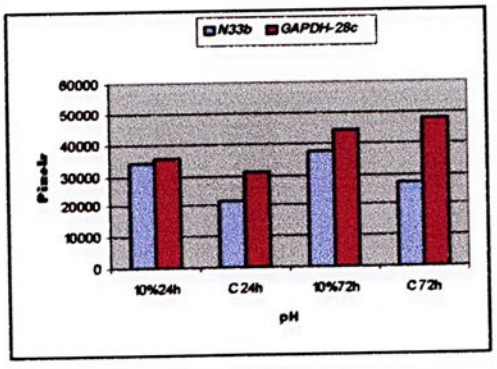
B





C

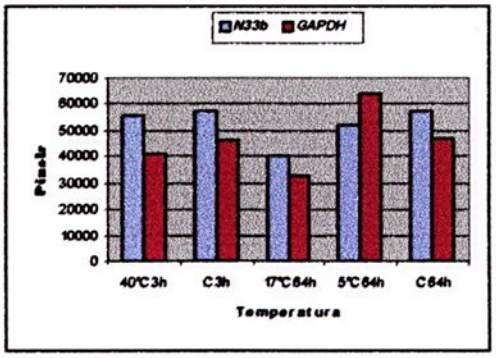


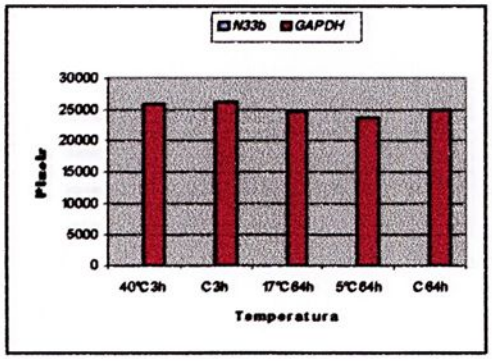


N33 isoforma-b (400pb)

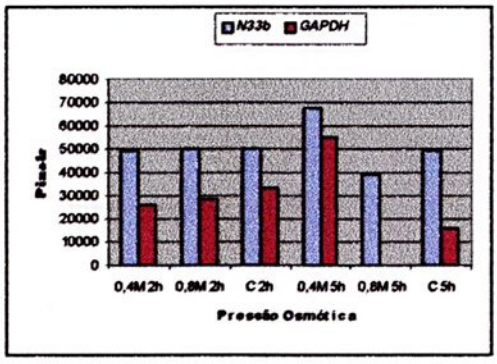
HeLa **Siha**

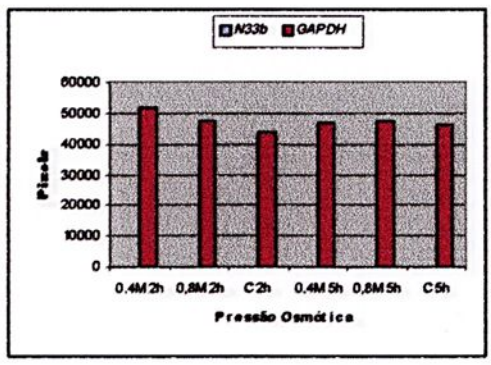
A



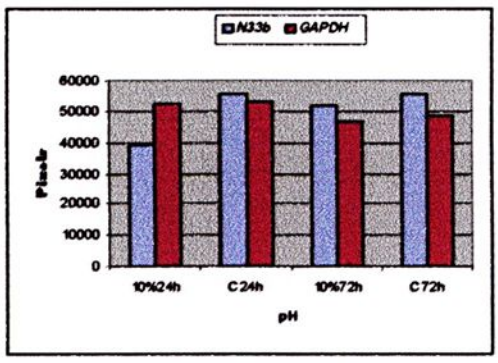


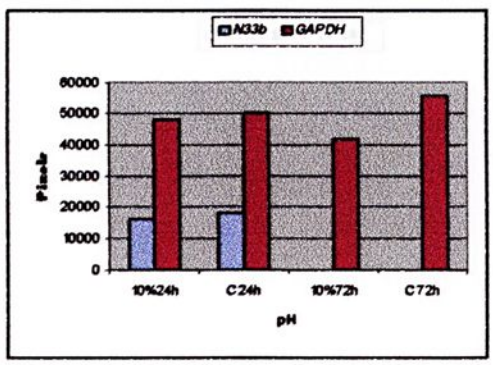
B





C

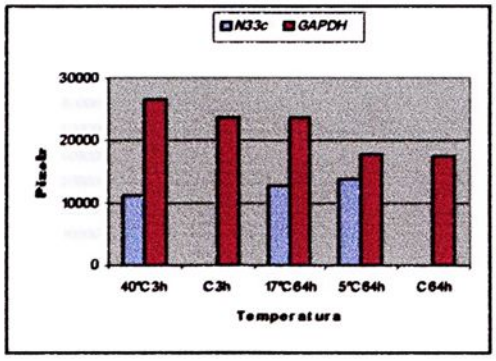




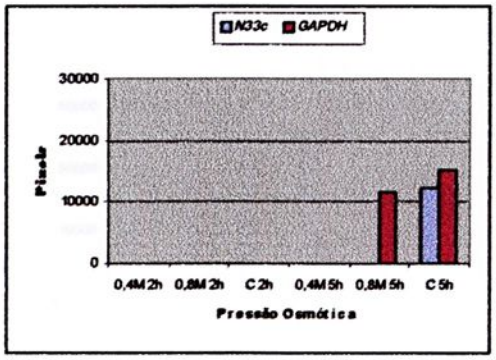
N33 isoforma-c (310pb)

Fadu

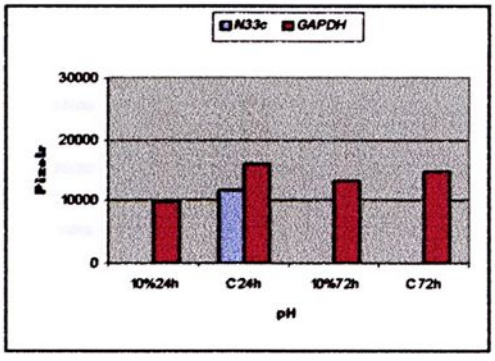
A



B

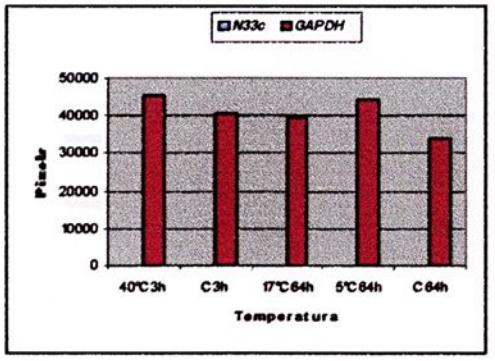


C

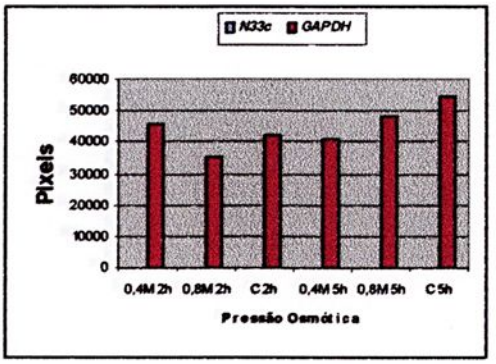


HEp-2

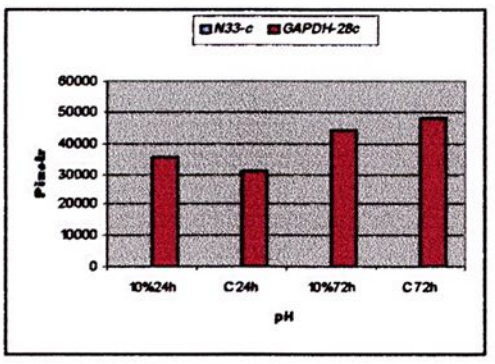
A



B



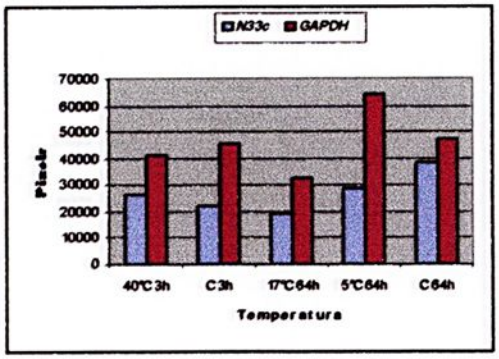
C



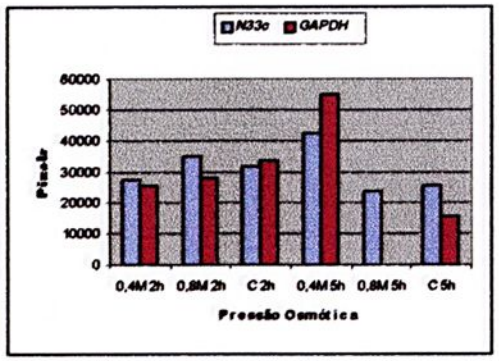
N33 isoforma-c (310pb)

HeLa

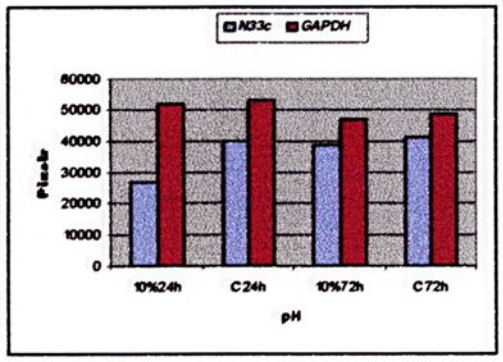
A



B

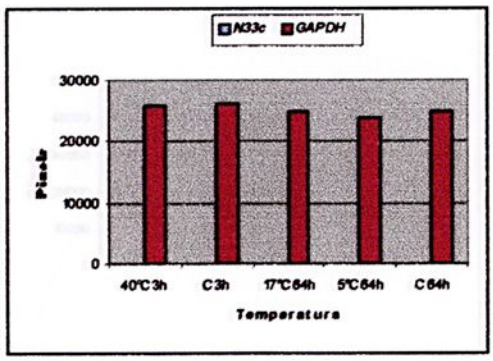


C

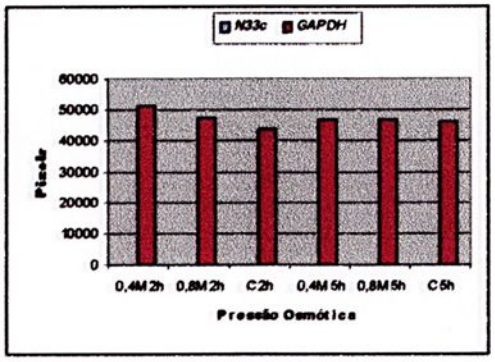


Siha

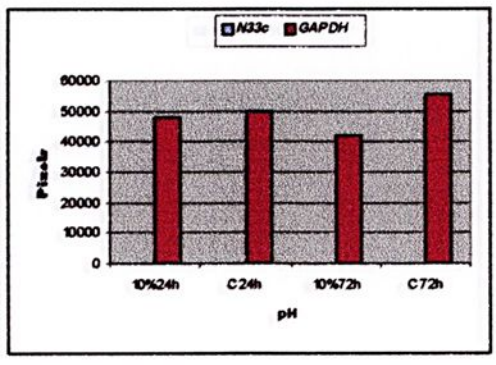
A



B



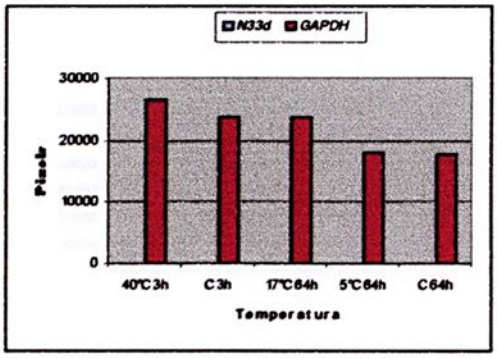
C



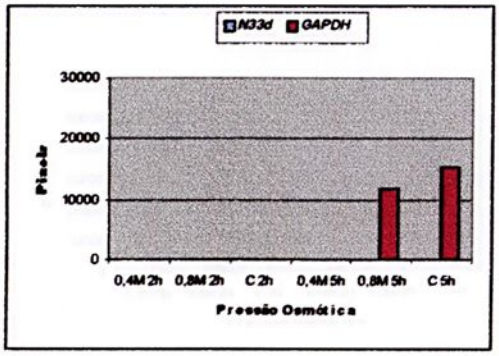
N33 isoforma-d (600pb)

Fadu

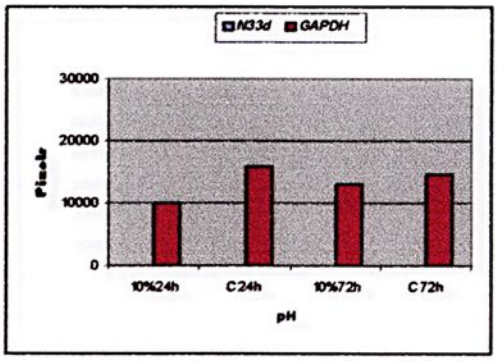
A



B

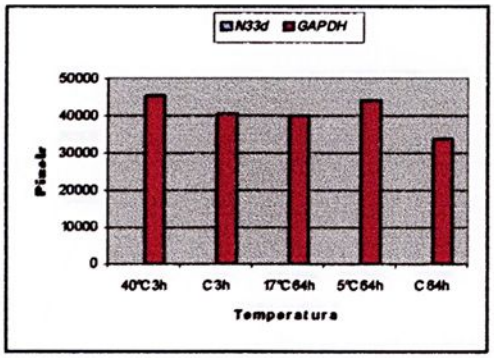


C

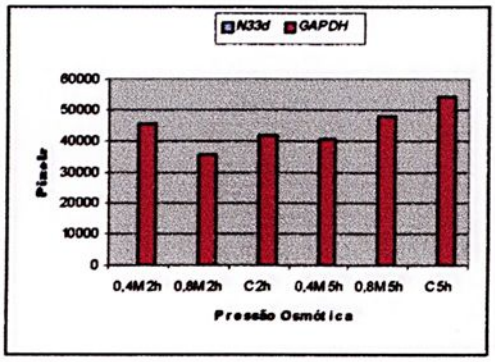


HEp-2

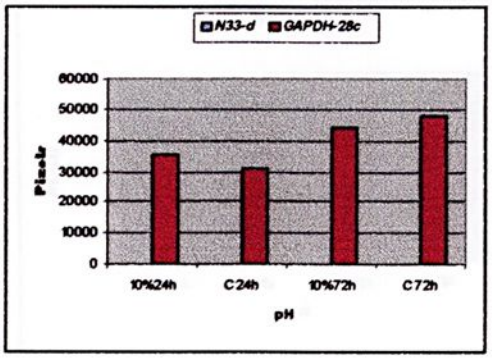
A



B



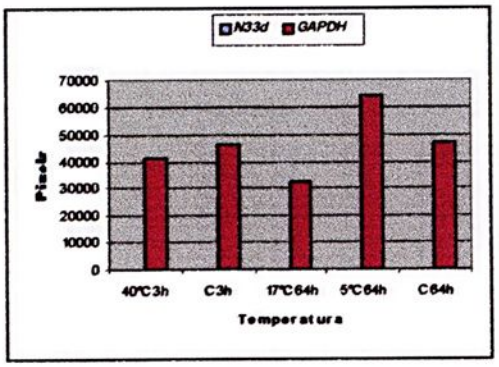
C



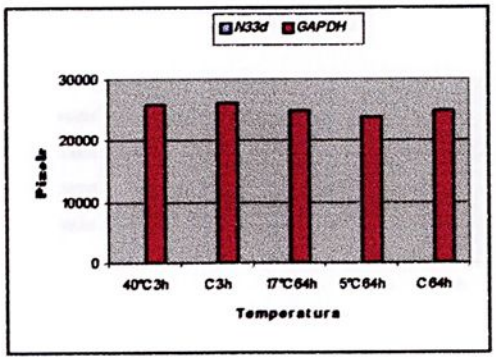
N33 isoforma-d (600pb)

HeLa **Siha**

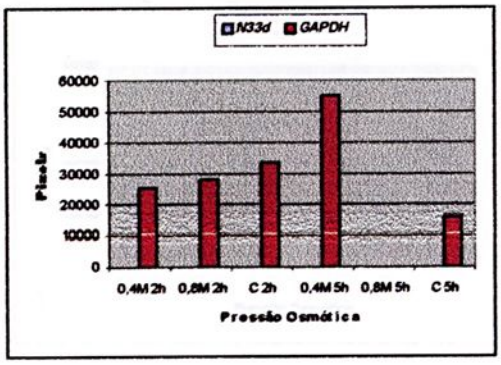
A



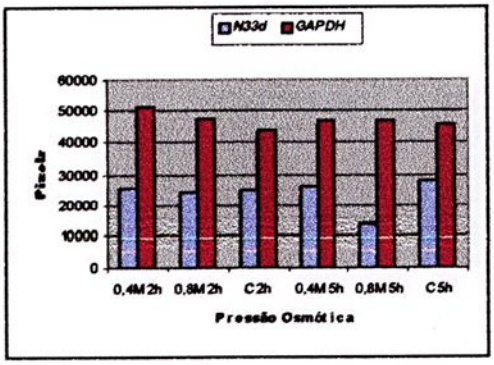
A



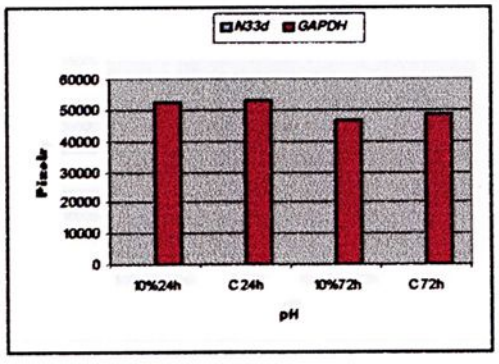
B



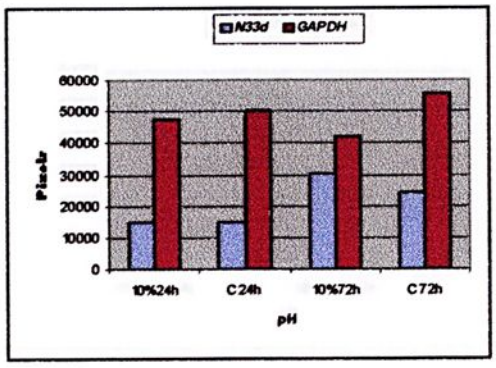
B



C



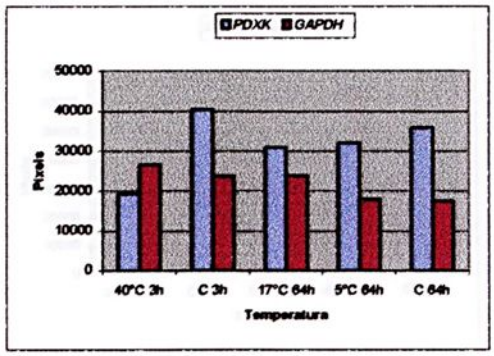
C



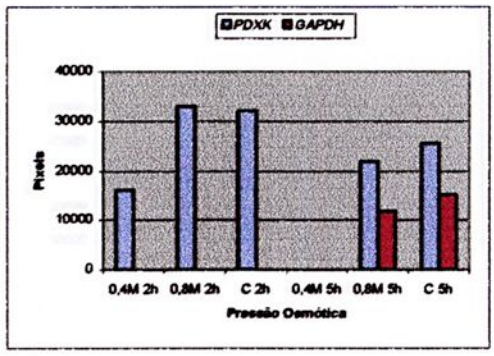
PDXK (330pb)

Fadu

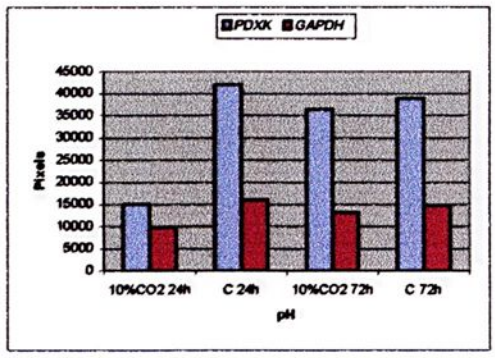
A



B

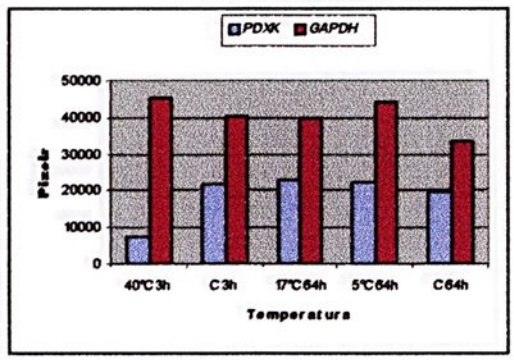


C

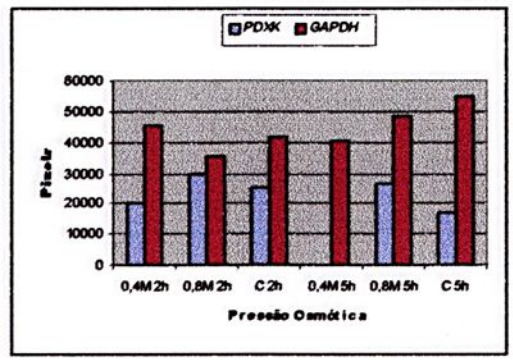


HEp-2

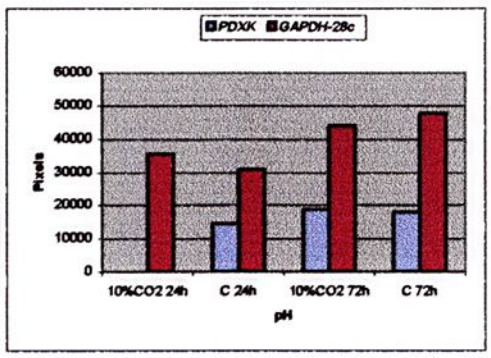
A



B



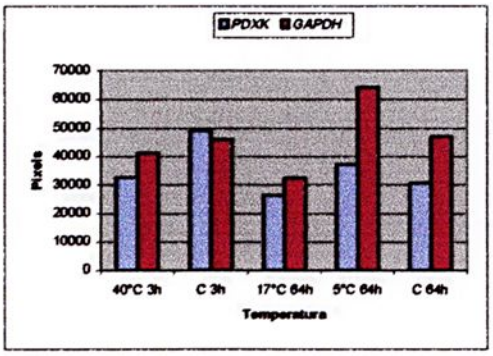
C



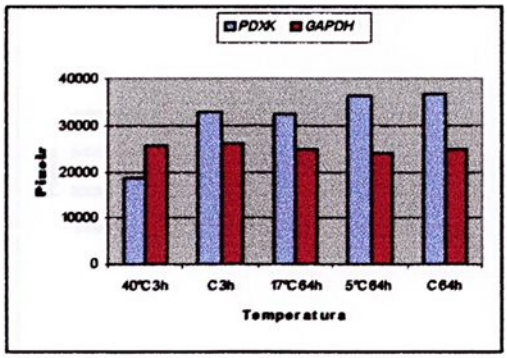
***PDXK* (330pb)**

HeLa **Siha**

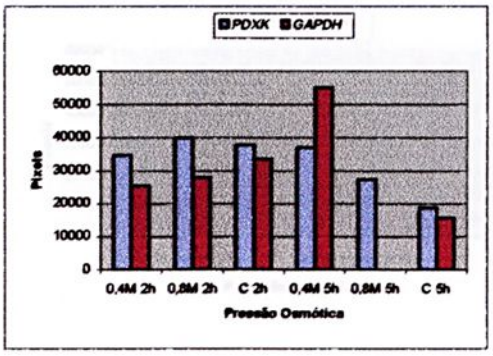
A



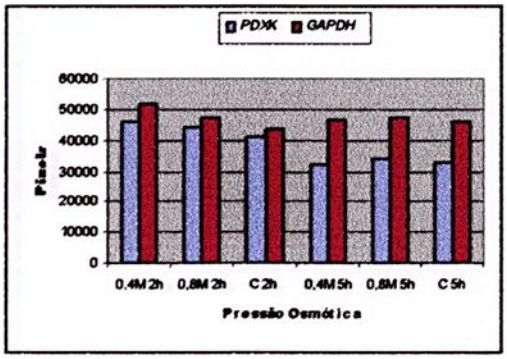
A



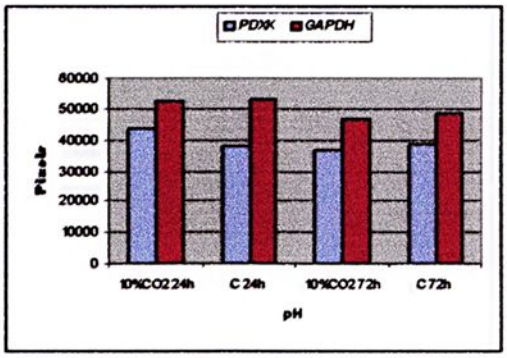
B



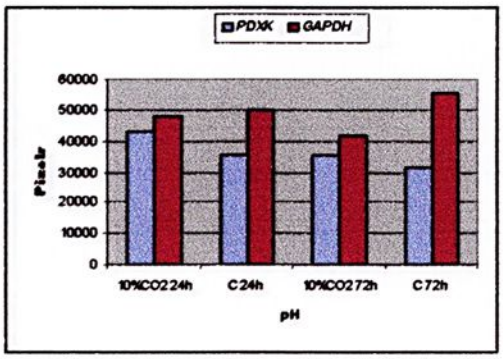
B



C



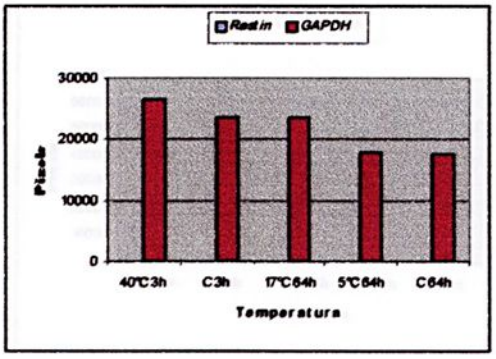
C



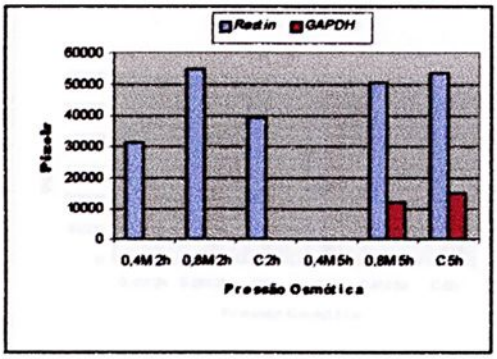
RSN (282pb)

Fadu

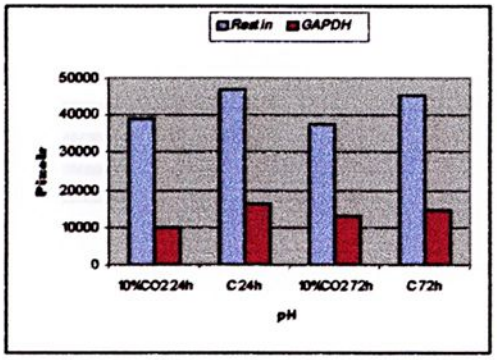
A



B

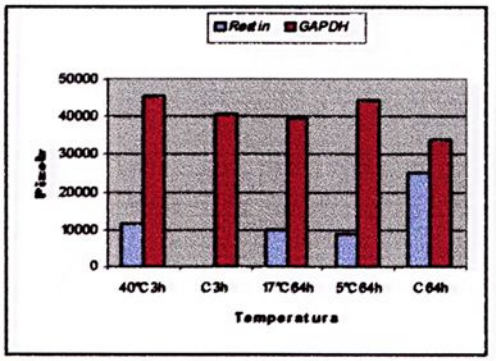


C

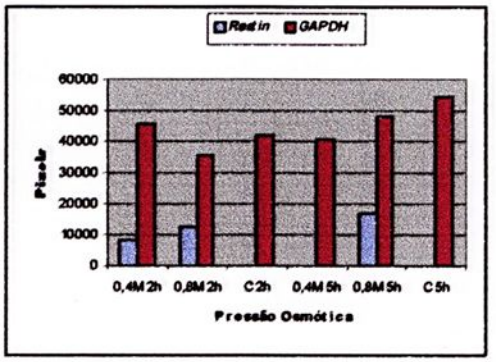


HEp-2

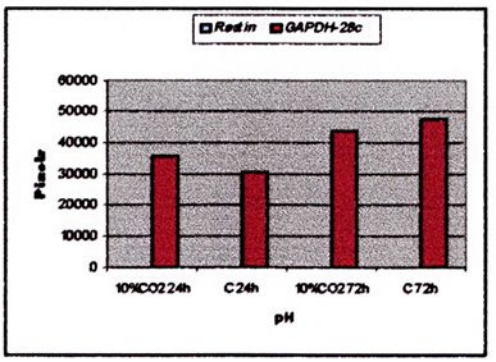
A



B



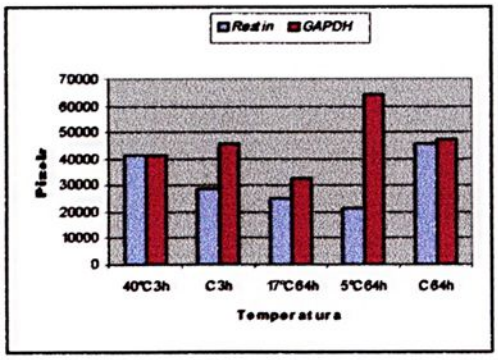
C

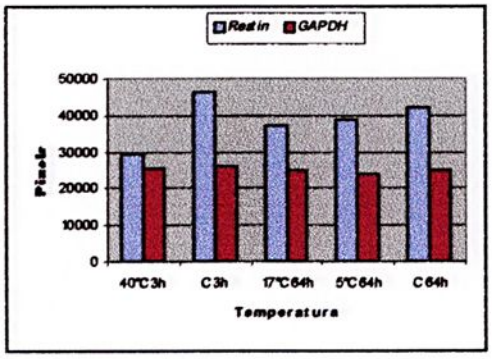


***RSN* (282pb)**

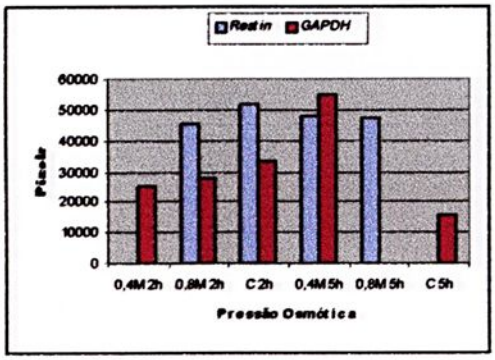
HeLa **Siha**

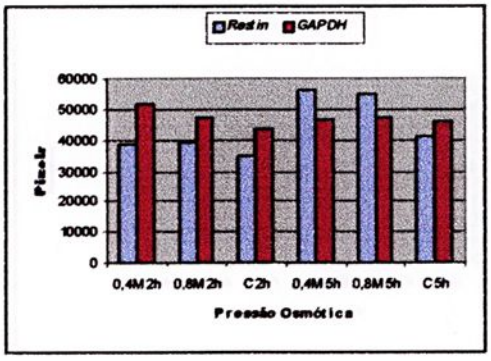
A



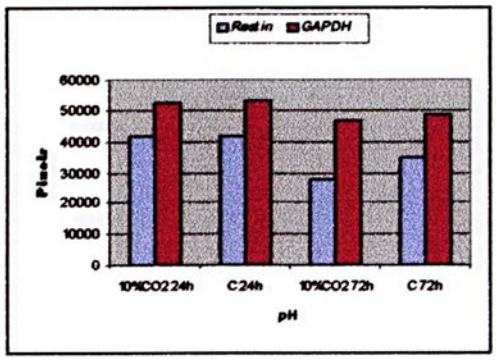


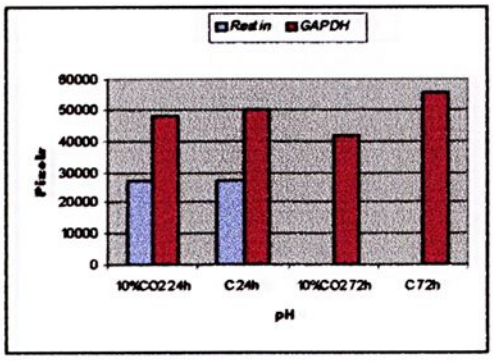
B





C

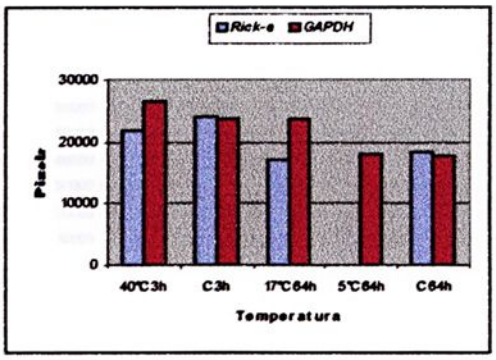




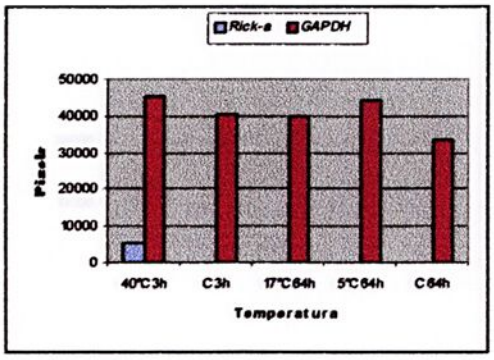
RIPK2 isoforma-a (500pb)

Fadu **HEp-2**

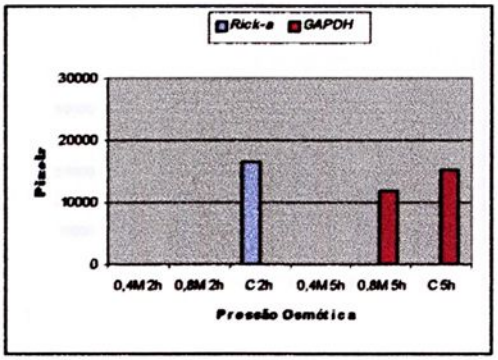
A



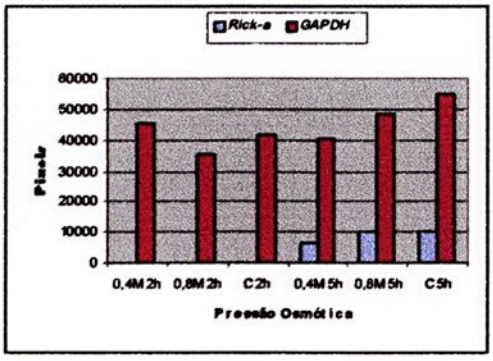
A



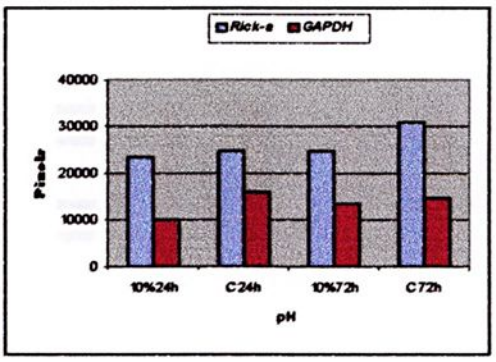
B



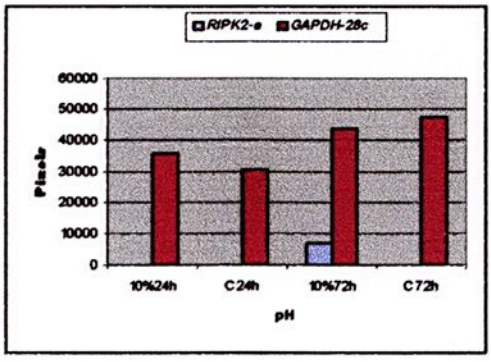
B



C



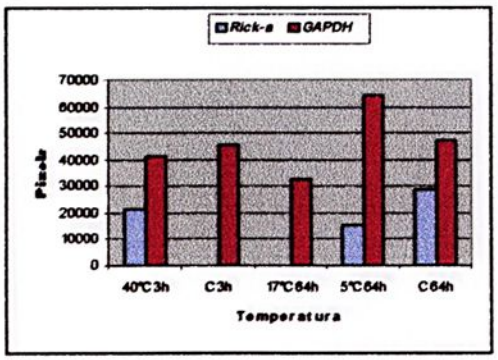
C



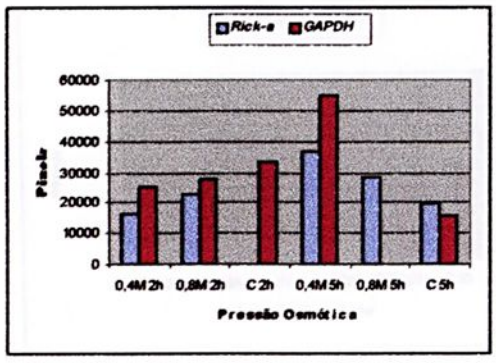
RIPK2 isoforma-a (500pb)

HeLa

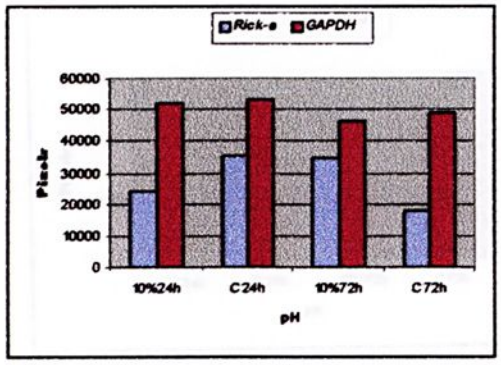
A



B

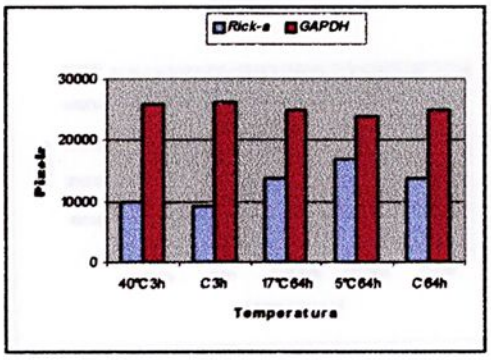


C

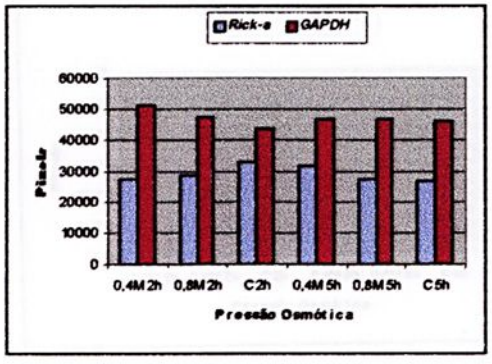


Siha

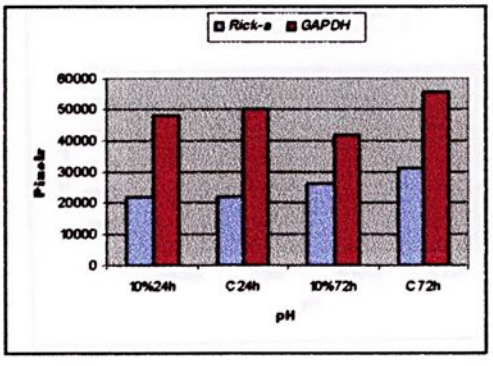
A



B



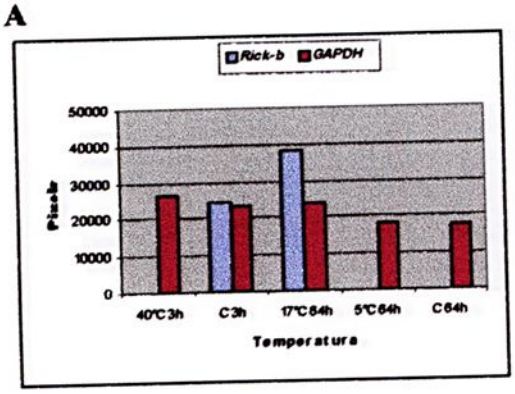
C



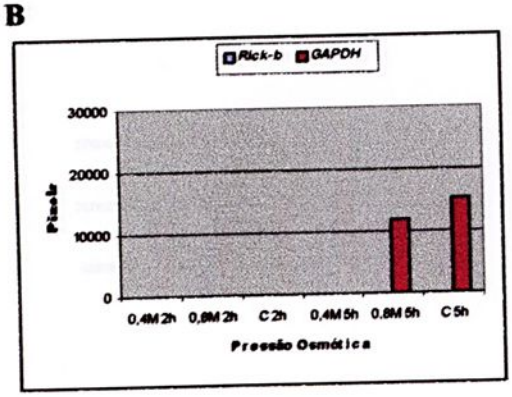
RIPK2 isoforma-b (320pb)

Fadu

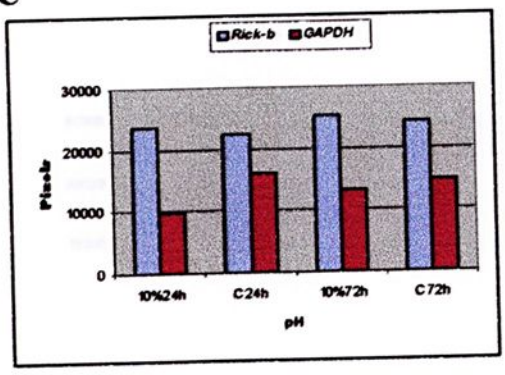
A



B

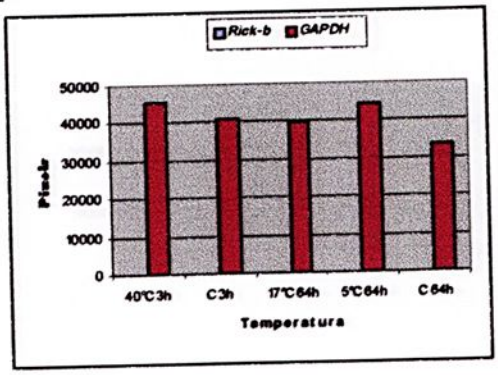


C

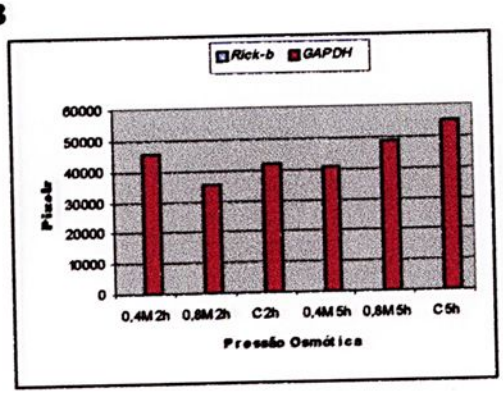


HEp-2

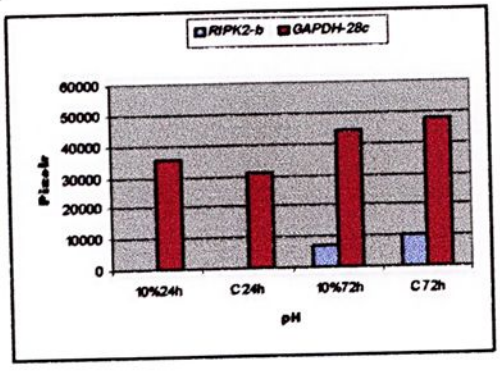
A



B



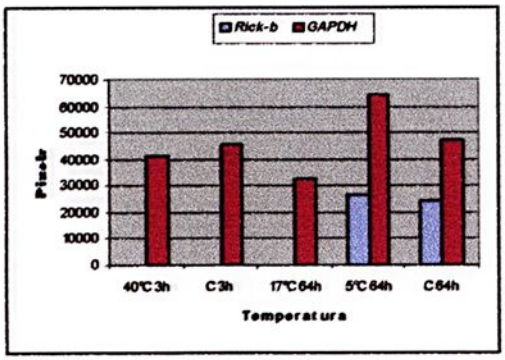
C

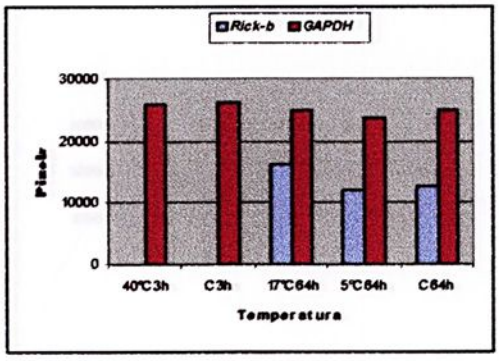


RIPK2 isoforma-b (320pb)

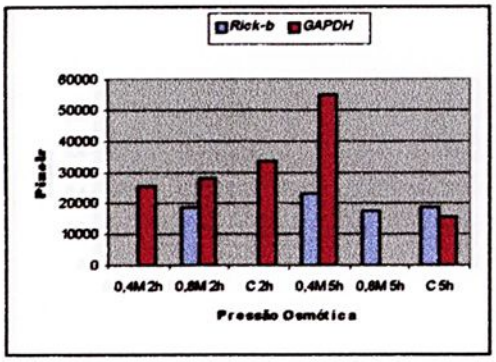
HeLa **Siha**

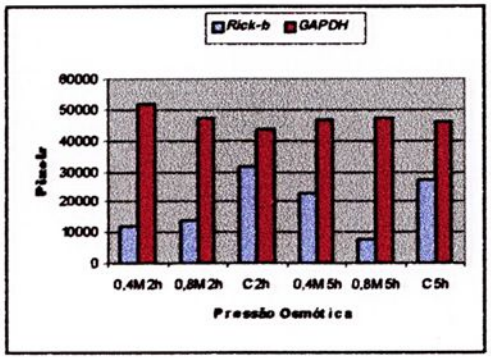
A



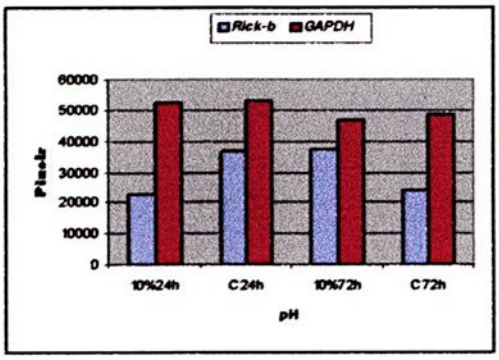


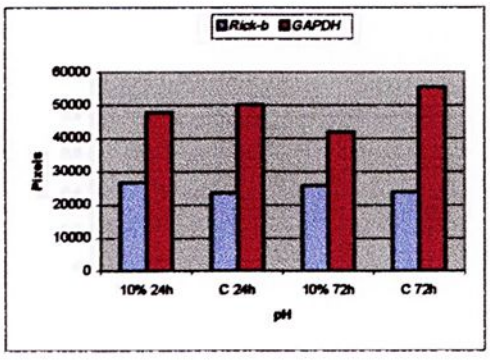
B





C

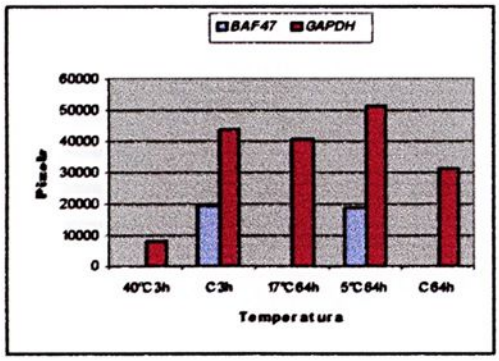


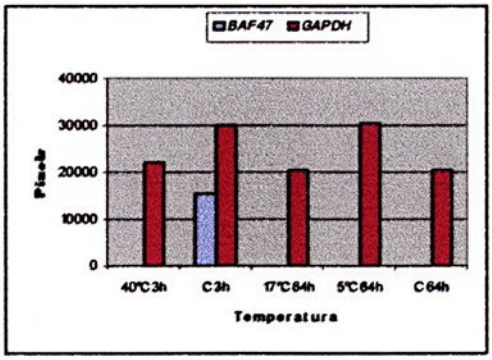


SMARCB6 (240pb)

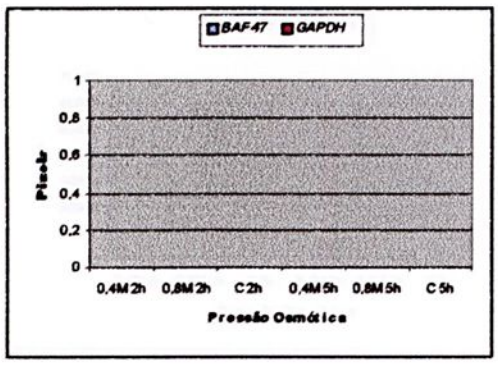
Fadu | **HEp-2**

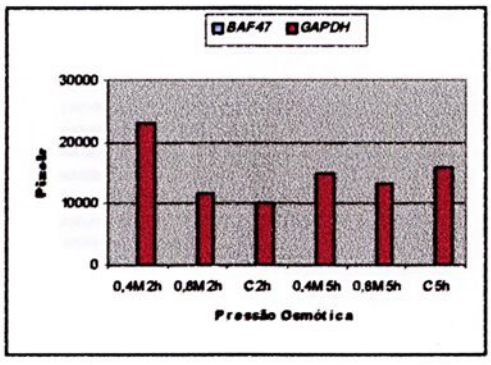
A



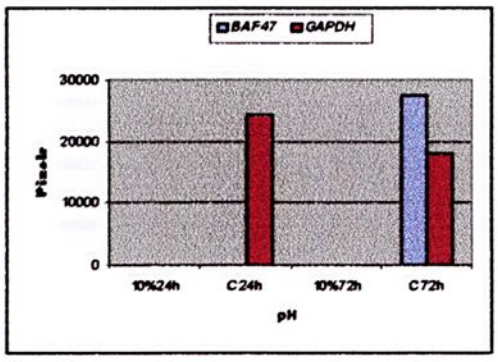


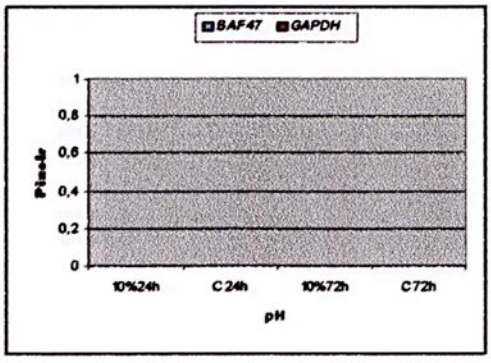
B





C

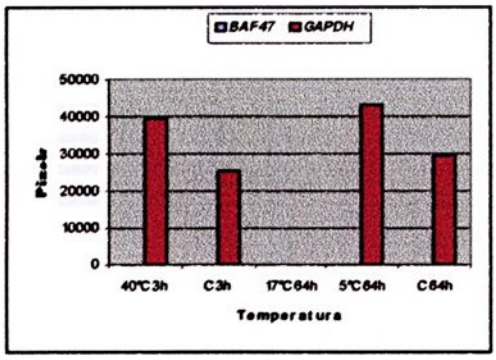




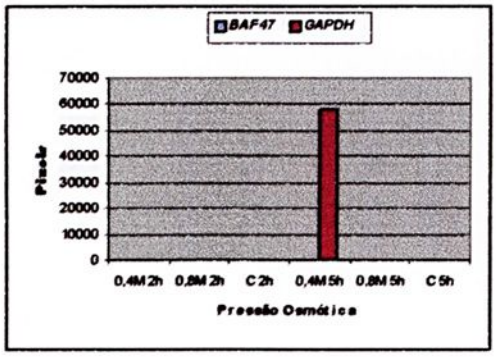
SMARCB6 (240pb)

HeLa

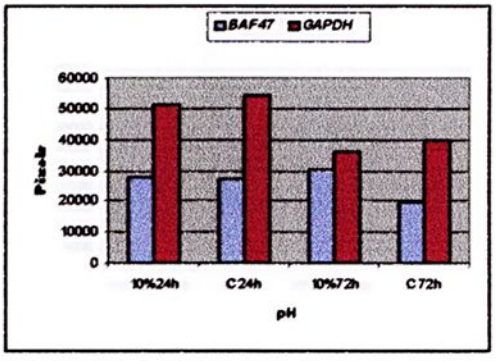
A



B

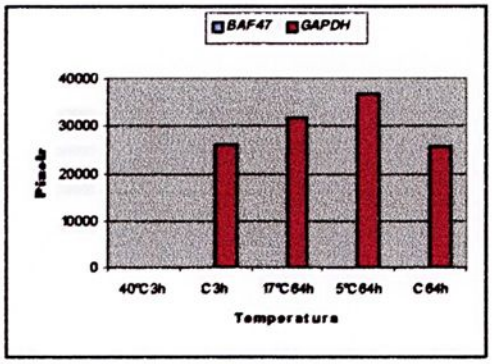


C

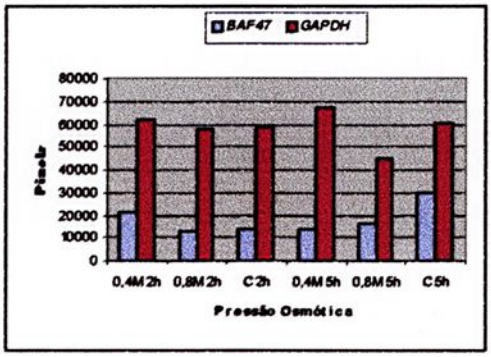


Siha

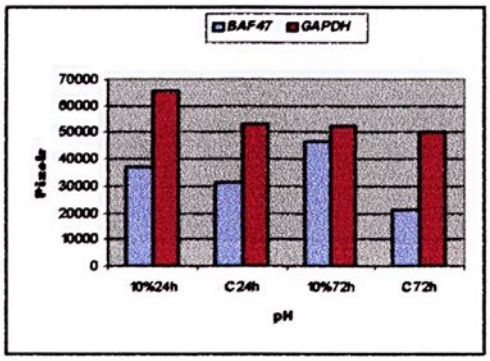
A



B



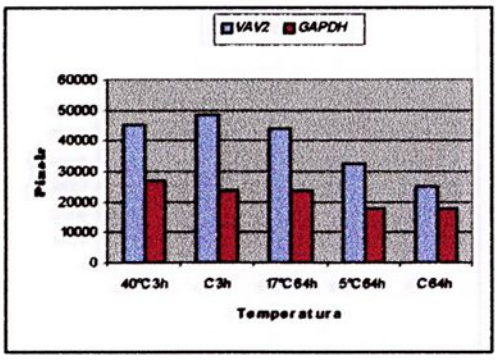
C



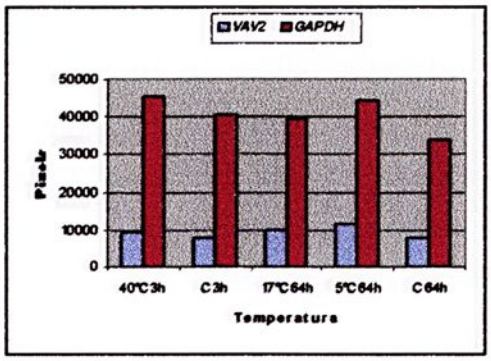
VAV2 (165pb)

Fadu **HEp-2**

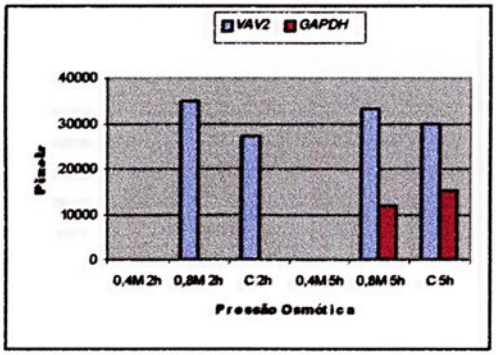
A



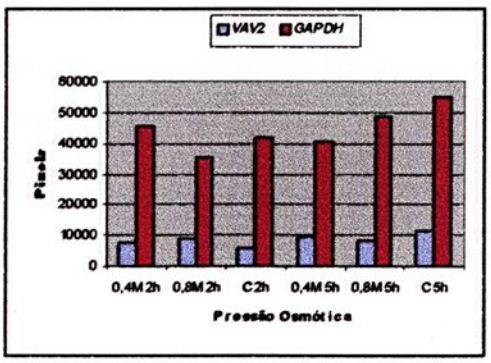
A



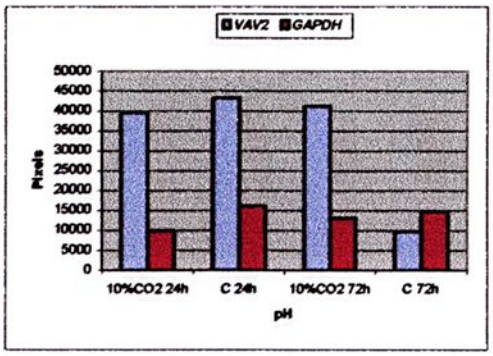
B



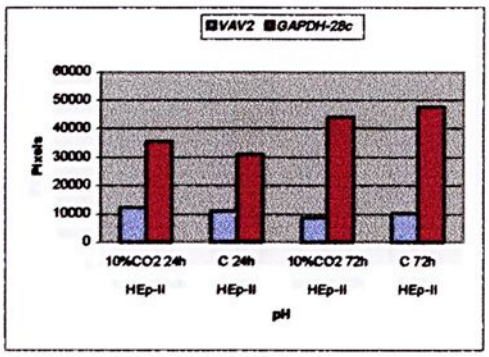
B



C



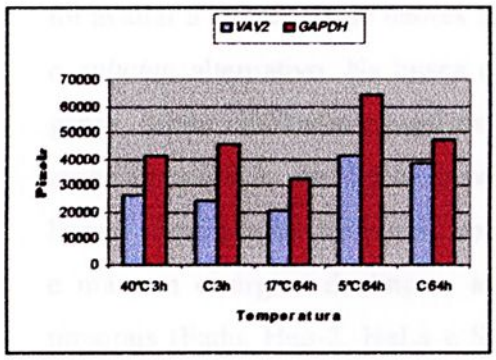
C

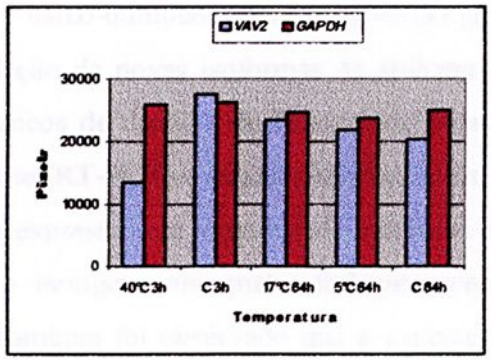


VAV2 (165pb)

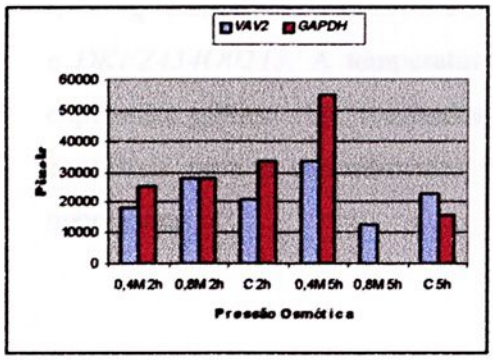
HeLa **Siha**

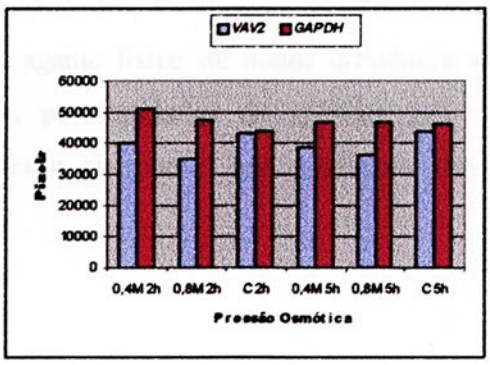
A



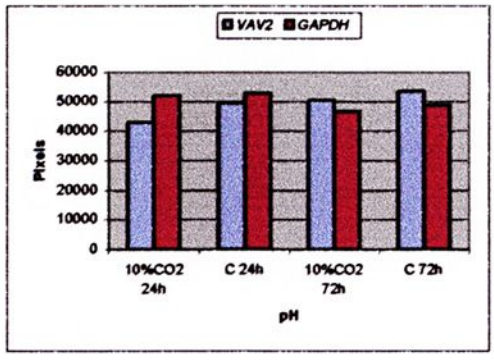


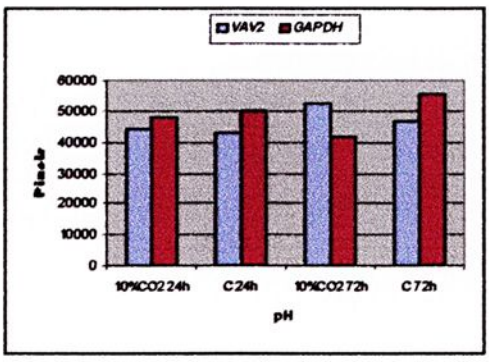
B





C





10. RESSUMO

O *splicing* alternativo do pré-mRNA é um dos mecanismos geradores de complexidade e diversidade genômica mais comuns. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de fatores físicos e físico-químicos sobre a expressão gênica e o *splicing* alternativo. Na busca e validação de novas isoformas de *splicing* de 32 genes, foram realizadas pesquisas em bancos de dados e de técnicas de transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e seqüenciamento automático. Foram identificadas dez novas isoformas expressas em amostras de autópsias, tumor e margem cirúrgica de língua, tonsila e laringe e em quatro linhagens celulares tumorais (Fadu, Hep-2, HeLa e Siha). Também foi observado que a exposição das células a estresse por temperatura, osmolaridade e pH não modifica o padrão de *splicing* alternativo da maioria dos genes estudados, exceto no caso dos genes *RIPK2* e *DKFZ434O0213*. A temperatura foi o agente físico de maior influência sobre a expressão gênica. Os resultados abrem possibilidades de análises que podem contribuir para o entendimento do *splicing* alternativo em condições normais e neoplásicas.

Palavras chave: Câncer; Autópsia; Expressão gênica; *Splicing* alternativo.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

11. ABSTRACT

Alternative splicing of pre-mRNA is one of the common mechanisms for generating the complexity and diversity of genome. The aim of the present study was to investigate whether physical and physico-chemical factors might influence the gene expression and the alternative splicing profile. Databank mining, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and automated sequencing were used for searching and validating new alternative splicing isoforms of 32 genes. Ten new isoforms expressed in post-mortem tissues, tumor samples and surgical margins of tongue, tonsil and larynx, and in four cell lines (Fadu, Hep-2, HeLa e Siha) could be identified. We also showed that exposure of cells to temperature, osmotic or pH stress resulted in no changes of the alternative splicing pattern for most of those genes, except for *RIPK2* and *DKFZp434O0213* gene and the temperature was the most important physical factor on gene expression. The results open new avenues for understanding alternative splicing in normal and neoplastic conditions.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Autorizo a reprodução deste trabalho

São José do Rio Preto, 29/08/2003

_____

Ulises Maximiliano Mancini Villagra

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
11 12 13 14 15 16 17 18