

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIENCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia

RENATO PETITTO NETTO

**Caracterização dos diferentes transcritos produzidos pelo *locus*
HJURP (*Holliday Junction Recognizing-Protein*) em células de
glioblastoma**

ARARAQUARA, SP

2018

RENATO PETITTO NETTO

**Caracterização dos diferentes transcritos produzidos pelo *locus*
HJURP (*Holliday Junction Recognizing-Protein*) em células de
glioblastoma**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração: Biologia Celular, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Valente

ARARAQUARA, SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- P491c** Petitto Netto, Renato
 Caracterização dos diferentes transcritos produzidos pelo *locus* HJURP (*Holliday Junction Recognizing-Protein*) em células de glioblastoma / Renato Petitto Netto. – Araraquara, 2018.
 57 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Biologia Molecular.
- Orientador: Valéria Valente.
1. Glioblastoma. 2. HJURP. 3. Transcritos. 4. Isoformas. I. Valente, Valeria, orient.
 II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Caracterização dos diferentes transcritos produzidos pelo locus HJURP (Holliday Junction Recognizing-Protein) em células de glioblastoma

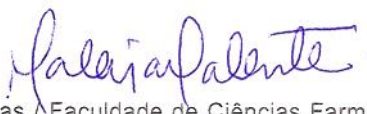
AUTOR: RENATO PETITTO NETTO

ORIENTADORA: VALERIA VALENTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: ANÁLISES CLÍNICAS pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALERIA VALENTE

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

A handwritten signature in blue ink, reading "Valeria Valente".

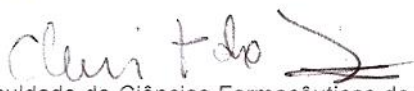
Profa. Dra. JOSANE DE FREITAS SOUSA

Departamento de Genética / Faculdade de Medicina do Câmpus de Ribeirão Preto da USP

A handwritten signature in blue ink, reading "Josane de Freitas Sousa".

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

A handwritten signature in blue ink, reading "Cleslei Fernando Zanelli".

Araraquara, 30 de janeiro de 2018

*Dedico este trabalho à Deus e meus
familiares, que sempre estiveram
presentes dando suporte durante todo o
período de estudos.*

DEDICATÓRIA

A Deus, pela proteção, ensinamentos e realizações em minha vida.

Aos meus pais, Ednilson e Selma, pelo amor/apoio incondicional e confiança durante todos os momentos.

A minha irmã, Isabella, pelo apoio e amizade por todos os momentos da vida.

À meus avós, Vilma, Renato, Conceição e Silvio pelo imenso carinho e zelo.

A Bruna, pelo companheirismo e cumplicidade durante toda faculdade.

À professora Valeria, pelos ensinamentos e cuidados na tarefa de educar.

Aos meus colegas de laboratório Rodolfo, Juliana F., Luis, Geovana, Barbara, Juliana S., Rodrigo, Felipe, Marcos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, FAPESP (2013/13465-1), CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse trabalho.

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é o tipo mais comum e mortal de tumor cerebral, sendo que os pacientes apresentam uma sobrevida média de apenas 14 meses. O tratamento é realizado com remoção cirúrgica da massa tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia, porém sua eficácia é muito reduzida devido a acelerada atividade proliferativa e elevada resistência das células tumorais aos agentes genotóxicos. Dados do nosso grupo sustentam a hipótese de que este quadro pode estar associado em parte ao ganho de competência na atividade de reparo de DNA. Demonstramos anteriormente que, a HJURP (*Holliday Junction Recognizing Protein*), uma proteína envolvida em reparo de DNA e montagem da cromatina centromérica, está superexpressa nos astrocitomas e que seus altos níveis de expressão estão correlacionados com o pior prognóstico dos pacientes. Dados da literatura evidenciam a existência de três RNAs mensageiros para o *locus* HJURP. O maior deles, denominado *hjurp1*, apresenta 9 éxons e codifica a isoformaprotéica A, que contém 748 aminoácidos. Os transcritos 2 e 3 apresentam deleção de alguns éxons, codificando proteínas hipoteticamente menores. Embora existam vários cDNAs depositados no *GenBank* que corroboram a expressão destes três mRNAs, não há dados na literatura sobre seu padrão de expressão ou a funcionalidade destas isoformas. Sendo assim, neste projeto avaliamos a expressão dos diferentes transcritos do *locus* HJURP em células de GBM, amostras de diferentes graus de astrocitoma, pares de linhagens de diferentes tipos não tumorais/tumorais e amostra de diferentes tecidos não tumorais. Através de PCR convencional detectamos as três isoformas nos astrócitos não tumorais (ACBRI371) e nas linhagens tumorais U87MG, U138MG e U251MG. Porém, as linhagens T98G e U343MG apresentaram variações, sendo que nas células T98G foram detectadas somente as isoformas 1 e 3, e nas células U343MG apenas a isoforma 1. Através de análise por PCR quantitativo, observamos que as linhagens de GBM apresentam um aumento marcante na expressão dos três transcritos de HJURP quando comparados aos astrócitos não tumorais ACBRI371. Como esperado, as células T98G apresentaram os maiores níveis de HJURP, sendo que a expressão dos três transcritos está aumentada. Além disso, percebemos que o transcrito *hjurp1* é de fato bem mais abundante que as isoformas 2 e 3 nas linhagens celulares. Embora tenha sido observado um significativo aumento global para todas as isoformas nas amostras tumorais (tumores *versus* substância branca), percebemos que a isoforma 2 é mais abundante que a 1 no tecido não tumoral e astrocitomas de baixo grau (AST2), porém há um ganho de expressão da isoforma 1, que não é acompanhado pela isoforma 2, nas amostras de astrocitomas de grau 3 (AST3) e GBM, criando perfis de expressão característicos da progressão tumoral. Análises de expressão de um painel de tecidos não tumorais e pares de linhagens tumorais e não tumorais de outras origens, mostraram resultados similares, consolidando a existência de uma desregulação nos transcritos de HJURP que favorece a expressão da isoforma 1 nas células tumorais. Ensaios recentes demonstraram que o silenciamento dirigido ao transcrito 1 de HJURP nas linhagens U87MG e T98G, parece estimular a expressão da HJURP 2 e mostra um impacto reduzido sobre a viabilidade celular, quando comparado ao silenciamento da proteína HJURP total. Esses dados sugerem que as isoformas 2 e 3 estão ativas e auxiliam na manutenção da viabilidade celular em linhagens de GBM.

Palavras-chave: Glioblastoma. HJURP. Transcritos. Isoformas.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most common and lethal brain tumor in humans, with a median survival rate of ~ 14 months. Standard optimized treatment implies in surgery, followed by radiation and chemotherapy, but it has low efficacy due to tumor fast proliferative activity and high resistance against genotoxic agents. Preliminary data from our group showed that HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein), a protein which plays a central role in chromatin assembly and is related to take part in double-stranded DNA breaks (DSBs) repair, is overexpressed in astrocytomas. High levels of this protein have been associated with patient poor prognosis. According to the literature, three transcript variants are predicted to encode HJURP gene. The variant (2) and (3) differ from the main splice variant (1) by the exclusion of some exons, generated by exon skipping. Although many cDNA sequences have been deposited on GeneBank database, it is still unclear their functions and expression pattern among tumors. Thus, in this work, we aimed to evaluate the expression of the three variants of HJURP gene in GBM cells, patient samples of different grades of astrocytoma, and different tumor and non-tumor cell lines. Expression of all transcripts was confirmed by conventional PCR in non-tumoral astrocytes (ACBRI371) and GBM cell lines (U87MG, U138MG, and U251MG). However, T98G and U343MG showed a distinct pattern. The variant (1) was detected in both cell lines, but the variant (3) was only detectable in T98G cells. Using quantitative PCR (q-PCR) we demonstrated that all transcripts were expressed at higher levels in GBM cells than in non-tumoral astrocytes. As we expected, T98G showed the highest levels of HJURP expression (variants 1,2 and 3). We also observed that variant (1) is more abundant in the cell lines. Albeit, there was an overall increase of all variants in tumor samples when compared to the brain white matter. We demonstrated that variant (2) is more prevalent than variant (1) in non-tumoral tissues and low-grade astrocytomas (AST2). In contrast, anaplastic astrocytoma (AST3) and GBM showed a considerable increase in variant (1) levels, arising a characteristic profile of tumor progression. Expression analyses of a panel of tumor and non-tumoral cell lines from distinct origins confirmed our previously described finding. Recent data demonstrated that transcript (1) silencing of U87MG and T98G may stimulate transcript (2) expression and it shows the low impact on cell viability when compared to total HJURP silencing. These data suggest that variants (2) and (3) are functional and assist in GBM cell viability maintenance.

Keywords: Glioblastoma. HJURP. Transcripts.Isoforms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recrutamento de HJURP para a região de dano ao DNA após irradiação com microlaser

Figura 2. Representação esquemática do padrão éxon/intron dos três diferentes mRNAs expressos pelo locus HJURP

Figura 3. Predição esquemática das isoformas proteicas hipotéticas de HJURP

Figura 4. Produtos de amplificação correspondentes às isoformas de HJURP obtidos em diferentes concentrações de íons magnésio

Figura 5. Produtos de amplificação correspondente às isoformas de HJURP em astrócitos não tumorais e linhagens

Figura 6. Curva padrão das reações de verificação de eficiência de amplificação dos primers para *HPRT*, *HJURP1*, *HJURP1#2*, *HJURP2*, *HJURP3*

Figura 7. A expressão relativa dos três transcritos de HJURP é aumentada nas linhagens celulares de GBM em relação aos astrócitos não tumorais ACBRI371

Figura 8. Expressão relativa de cada transcrito em relação ao transcrito *HJURP1* nas linhagens celulares de GBM e astrócitos não tumorais

Figura 9. A expressão dos transcritos do locus *HJURP* é aumentada nas linhagens tumorais em relação ao sua linhagem não tumoral

Figura 10. Expressão relativa de cada transcrito do locus *HJURP* em relação a *HJURP1* em diferentes linhagens celulares tumorais e não tumorais

Figura 11. Expressão relativa dos transcritos de *HJURP* em amostras de tumores cerebrais (AST 2, AST 3 e GBM) em relação a média de cada transcrito no grupo de tecido

Figura 12. Expressão relativa média dos transcritos de HJURP nos grupos tecido cerebral não tumoral (SB) e amostras de tecido cerebral tumoral (AST 2, AST3 e GBM) em relação a expressão do transcrito *HJURP1*

Figura 13. Expressão relativa dos transcritos *HJURP2* e *HJURP3* em diferentes amostras de tecido não tumoral em relação a expressão do transcrito *HJURP1*

Figura 14. Silenciamento dirigido aos transcritos *HJURP1*, *HJURP2* e *HJURP3* através da transfecção com siRNAs

Figura 15. Silenciamento dirigido a isoforma *HJURP1* através da transfecção com siRNA

Figura 16. Silenciamento dirigido a isoforma HJURP1 através da transfecção com siRNA

Figura 17. A manutenção da expressão das isoformas HJURP2 e HJURP3 impede a ativação de senescência em células U87MG

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de origem e caracterização genética das linhagens utilizadas

Tabela 2. Classificação das amostras tumorais e dados clínicos dos pacientes

Tabela 3. Primers utilizados para RT-PCR convencional

Tabela 4. Primers utilizados para RT-qPCR quantitativo

Tabela 5. Oligonucleotídeos de RNA utilizados para silenciamento de mRNA

Tabela 6. Padronização da concentração ótima dos primers para *HPRT*

Tabela 7. Padronização da concentração ótima dos primers para *HJURP1*

Tabela 8. Padronização da concentração ótima dos primers para *HJURP1#2*

Tabela 9. Padronização da concentração ótima dos primers para *HJURP2*

Tabela 10. Padronização da concentração ótima dos primers para *HJURP3*

Tabela 11. Expressão relativa média dos transcritos de *HJURP* nas linhagens celulares de GBM em relação aos astrócitos não tumorais ACBRI371

Tabela 12. Expressão relativa de cada transcrito do locus *HJURP* nos grupos de tecido cerebral não tumoral (SB) e tumores de diferentes graus (AST 2, AST3 e GBM)

Tabela 13. Expressão relativa dos transcritos de *HJURP* em amostras de tecido cerebral tumoral (AST 2, AST 3 e GBM) em relação a média de cada transcrito do grupo de tecido cerebral não tumoral (SB)

Tabela 14. Expressão relativa dos transcritos de *HJURP* nos grupos tecido cerebral não tumoral (SB) e amostras de tecido cerebral tumoral (AST 2, AST3 e GBM) em relação a expressão do transcrito *HJURP1*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACBRI371 – Astrócitos não tumorais

AST2 – Astrocitoma de grau 2

AST3 – Astrocitoma de grau 3

ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR - Ataxia Telangiectasia and RAD 3 Related

A549 – Linhagem tumoral de pulmão

cDNA – complementary DNA

CDK1/2 - Cyclin-Dependent Kinase 1/2

CDK4 - Cyclin-Dependent Kinase 4

CDKN2A - Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A

CENP-A – Centromereprotein A

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EGFR - EpidermalGrowthFactor Receptor

G2/M – Fases do ciclo celular

GBM - Glioblastoma

HACAT – Linhagem não tumoral de colo de útero

HELA – Linhagem de adenocarcinoma cervical

HJURP - Holliday Junction Recognizing Protein

hMSHJ- mutS Homolog 5

HPRT - HypoxanthinePhosphoribosyltransferase

IDH1 - IsocitrateDehydrogenase 1

MCF10-2A – Linhagem não tumoral de mama

MDM2 - E3 Ubiquitin Protein Ligase

MRC-5 – Linhagem não tumoral de pulmão

mRNA - Messenger RNA

NBS1 - Nibrin

NF1 - Neurofibromin 1

PCR – Polymerase Chain Reaction

PDGFRA - Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PI3K- Phosphoinositide 3 - Kinase

PTEN - Phosphatase and Tensin Homolog

qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction

Rb – Retinoblastoma protein

RNA – Ácido Ribonúcleico

RNA seq– Sequenciamento de Ácido Ribonúcleico

RTK- Receptor Tyrosine Kinase

SIHA – Linhagem tumoral de colo de útero

SK-BR-3 - Linhagem tumoral de mama

SW1088 – Linhagem tumoral de astrocitoma grau 3

TCGA - The Cancer Genome Atlas Research Network

TP53 - Tumor Protein 53

U2OS – Linhagem de osteosarcoma

U87MG, T98G, U138MG, U251MG e U343MG – Linhagens tumorais de GBM

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
<i>Conceitos Iniciais – Tumores Cerebrais/Glioblastoma</i>	<i>2</i>
<i>Perfil molecular - Glioblastoma</i>	<i>3</i>
<i>A proteína HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein) e o câncer cerebral.....</i>	<i>4</i>
<i>RNA's mensageiros de HJURP</i>	<i>7</i>
2. OBJETIVOS	9
<i>Objetivo Geral</i>	<i>9</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>9</i>
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
<i>Cultura de Células.....</i>	<i>10</i>
<i>Amostras de tecido não tumoral e tumoral.....</i>	<i>10</i>
<i>Extração de RNA e síntese de cDNA.....</i>	<i>13</i>
<i>PCR Convencional.....</i>	<i>14</i>
<i>PCR Quantitativo</i>	<i>15</i>
<i>Silenciamento dirigido através da transfecção com siRNAs</i>	<i>16</i>
<i>Ensaio de Apoptose e Morte Celular.....</i>	<i>17</i>
<i>Ensaio de Senescência celular</i>	<i>18</i>
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	19
<i>PCR Convencional.....</i>	<i>19</i>
<i>Padronização da concentração de magnésio</i>	<i>19</i>
<i>Deteção dos transcritos de HJURP nas diferentes linhagens celulares</i>	<i>20</i>
<i>PCR Quantitativo</i>	<i>20</i>
<i>Definição da concentração ótima dos primers</i>	<i>20</i>
<i>Avaliação da eficiência de amplificação dos primers</i>	<i>22</i>
<i>Quantificação dos transcritos do locus HJURP nas linhagens celulares de GBM</i>	<i>23</i>
<i>Quantificação dos transcritos do locus HJURP em linhagens tumorais / não tumorais de origens distintas</i>	<i>26</i>
<i>Quantificação dos transcritos do locus HJURP em astrocitomas de diferentes graus.....</i>	<i>29</i>
<i>Quantificação dos diferentes transcritos do locus HJURP em diferentes tecidos não tumorais</i>	<i>32</i>
<i>Silenciamento dirigido aos diferentes transcritos do locus HJURP.....</i>	<i>33</i>
<i>Quantificação de apoptose e morte celular efetiva após o silenciamento dirigido ao transcrito HJURP1</i>	<i>35</i>
<i>Senescência celular na ausência de HJURP.....</i>	<i>36</i>
5. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS*	41

1. INTRODUÇÃO

Conceitos Iniciais – Tumores Cerebrais/Glioblastoma

Neoplasias malignas primárias localizadas no Sistema Nervoso Central (SNC) são a causa de aproximadamente 2,5% dos novos casos de câncer no Brasil e 2% no mundo todo ano (INCA 2016). Apesar de baixa incidência, esses tipos tumorais apresentam elevada letalidade, sendo que a maior parte dos casos resulta em óbito.

Os tumores cerebrais que tem sua origem definida a partir de astrócitos são classificados como astrocitomas. Estes tumores são divididos em três categorias, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), de acordo com seu potencial de malignidade, diferenciação celular, presença de necrose e angiogênese. São categorizados em: Astrocitomas Difusos (grau 2), Astrocitomas Anaplásicos (grau 3) e Glioblastoma (GBM) (grau 4). O GBM é o tipo mais agressivo de astrocitoma e é classificado como de grau IV na progressão deste tipo tumoral. Dentre os tumores cerebrais, os gliomas são o tipo histológico mais frequente e representam cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do SNC. Além disso, são os mais letais, levando o paciente a óbito em aproximadamente 14 meses após o diagnóstico. Eles possuem baixa capacidade de metástase, porém grande capacidade de infiltração no tecido cerebral (MEIR *et al.*, 2010).

Para o tratamento destas lesões a radioterapia tem se mostrado uma abordagem importante, pois avanços técnicos como, por exemplo, focar o feixe e adaptá-lo aos contornos irregulares dos tumores cerebrais permite minimizar a dose para as estruturas vizinhas e modular a intensidade desses feixes (MEIR *et al.*, 2010). Juntamente com a radioterapia vem sendo utilizado o agente alquilante temozolamida que usualmente apresenta um perfil de eficácia favorável e é administrado por via oral. Novas técnicas cirúrgicas, como a neuroendoscopia e a ressecção guiada por fluorescência têm também se tornado importante para o tratamento dos gliomas (MEIR *et al.*, 2010). A cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia combinadas tem sido amplamente usadas atualmente, porém são tratamentos paliativos pois sua eficácia é muito baixa (BEHIN *et al.*, 2003). A baixa eficiência deve-se à elevada resistência das células tumorais e o grande problema é a recidiva e o rápido crescimento de nova massa tumoral, que pode voltar ao tamanho inicial em até 30 dias (MEIR *et al.*, 2010). Por isso, a identificação de novos

alvos terapêuticos é imprescindível para favorecer o desenvolvimento de novos fármacos e propiciar melhor qualidade de vida dos pacientes com GBM.

Perfil molecular - Glioblastoma

A fim de aprimorar o diagnóstico e estimar o prognóstico dos pacientes a caracterização dos perfis moleculares dos tumores vem sendo muito utilizada (JANSEN *et al.*, 2010). O glioblastoma pode desenvolver-se ao longo de duas situações clínicas distintas, caracterizando este tumor como primário ou secundário. O GBM primário apresenta-se já em sua primeira manifestação clínica como um tumor de alto grau, enquanto o GBM secundário desenvolve-se ao longo de 5 a 10 anos a partir de um astrocitoma de menor grau (MAHER *et al.*, 2006). Análises moleculares revelaram que a amplificação do gene para o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) é predominante em GBMs primários, enquanto que a perda de TP53 (proteína tumoral p53) é uma característica genética frequente em astrocitomas dos GBMs secundários (MAHER *et al.*, 2006). Apesar de cursos distintos, os GBMs primário e secundário chegam a características patológicas semelhantes como invasão do tecido adjacente, resistência à terapia e apresentam também alterações genéticas comuns como a perda de PTEN e CDKN2A e superexpressão de CDK4 e MDM2 (MAHER *et al.*, 2006). Novas classes de GBM estão sendo identificadas, onde já foi demonstrado que sua patogênese molecular é bastante heterogênea (TCGA, 2008 e 2013). Análises de parâmetros moleculares recentemente demonstraram a importância do gene IDH (Isocitratodesidrogenase), envolvido no metabolismo oxidativo celular, como novo parâmetro para auxílio da classificação dos tumores. Astrocitomas difusos e anaplásicos apresentam mutações em IDH, não vista para glioblastomas (DAVID, *et al.*, 2016).

Os glioblastomas atualmente são divididos em quatro subtipos moleculares distintos (proneural, neural, clássico e mesenquimal) de acordo com seu perfil genético (VERHAAK, *et al.*, 2010). O subtipo proneural apresenta em sua maior parte mutação em TP53 e IDH1, superexpressão de PDGFR, além de possuir grande semelhança molecular a GBMs secundários (VERHAAK *et al.*, 2010). Atinge pessoas mais jovens quando comparado aos outros subtipos, e não responde bem ao tratamento (MEIR *et al.*, 2010). O subtipo neural possui um padrão de expressão próximo do tecido normal e os pacientes acometidos geralmente são idosos (VERHAAK *et al.*, 2010). O subtipo clássico é caracterizado pela superexpressão de

EGFR e ausência de mutações em TP53, sendo que seus portadores sobrevivem por períodos maiores devido a boa resposta ao tratamento. O subtipo mesenquimal geralmente apresenta mutações em NF1, PTEN e TP53 e os pacientes são mais responsivos ao tratamento (VERHAAK *et al.*, 2010). Desse modo, alterações genéticas já previamente consideradas relevantes (TP53, Rb, RTK e PI3K) foram vinculadas aos subtipos transcricionais e epigenéticos de GBM, revelando que combinações coordenadas podem afetar o desfecho clínico e a sensibilidade individual dos tumores à terapia. (NOUSHMEHR *et al.*, 2010; VERHAAK *et al.*, 2010).

Muitos esforços estão sendo feitos para se entender as bases moleculares do surgimento e progressão dos astrocitomas, sendo o GBM o primeiro tipo tumoral a ser sistematicamente estudado pelo *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA). Estes trabalhos visam a identificação de novas alterações moleculares que possam ajudar a entender o comportamento agressivo e resistente dos GBM e auxiliar na busca de novas drogas. Desse modo, a exploração destes dados e a caracterização funcional das alterações genéticas presentes nos GBM é urgente, para a melhor compreensão da biologia deste tipo de tumor e busca de terapias personalizadas que promovam tratamentos mais eficientes (JANSEN *et al.*, 2010).

A proteína HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein) e o câncer cerebral

Há alguns anos demonstramos que a proteína HJURP total é altamente superexpressa em glioblastomas (VALENTE *et al.*, 2009) e que seus altos níveis de expressão são fundamentais para a sobrevivência das células de GBM (VALENTE *et al.*, 2013). A superexpressão de HJURP total também foi relatada para outros tipos de tumores, como mama (HU *et al.*, 2010), pulmão (KATO *et al.*, 2007) e fígado (HU *et al.*, 2017), onde sua superexpressão também foi relacionada apior prognóstico dos pacientes. Além disso, sabe-se que a supressão de HJURP total induz instabilidade cromossômica e senescência nas células tumorais (KATO *et al.*, 2007).

HJURP foi inicialmente caracterizada como uma proteína potencialmente envolvida em reparo de DNA (KATO *et al.*, 2007) e montagem da cromatina da região centromérica, onde tem função de recrutamento de CENP-A no nucleossomo dos centrômeros de cromossomos recém-replicados (FOLTZ *et al.*, 2009). Através de experimentos de imuno-precipitação, observou-se a interação física entre HJURP

e hMSH5 e NBS1, que são proteínas associadas ao reparo de quebras de fita dupla no DNA através do mecanismo de recombinação homóloga. Neste trabalho foi visto ainda que a expressão de HJURP é induzida quando células HeLa são expostas a agentes genotóxicos e que sua supressão induz instabilidade cromossômica e senescência nas células tumorais (KATO *et al.*, 2007), o que corrobora que HJURP atue no reparo de DNA.

Além da montagem da cromatina na região centromérica (FOLTZ *et al.*, 2009), sabe-se que HJURP também é capaz de provocar a formação de novos centrômeros pelo recrutamento de CENP-A para regiões genômicas não centroméricas. Esse ancoramento forma cinetócoros funcionais ectópicos quando HJURP é artificialmente ancorada em regiões específicas do genoma (BARNHART *et al.*, 2011). A atividade de HJURP como chaperona da variante de histona CENP-A foi bastante estudada nos últimos anos e sua atuação no controle da incorporação desta variante nos centrômeros está bem caracterizada. Foi demonstrado que HJURP atua na forma dimérica (ZASADZINSKA *et al.*, 2013), sendo que CENP-A se liga a sua região N-terminal (NARDI *et al.*, 2016). Essa ligação favorece o recrutamento de CENP-A para centrômeros com auxílio do complexo Mis 18, o qual interage com porção medial de HJURP e serve como regulador da localização de CENP-A (WANG *et al.*, 2014; SUBRAMANIAN *et al.*, 2016). O processo de ancoramento de CENP-A na região centromérica é regulado durante o ciclo celular pela atividade das quinases CDK1/2 (MULLER *et al.*, 2014; FALK *et al.* 2015; STANKOVIC. A., *et al.* 2017). Foi também recentemente descrito, que a perda de p53 promove aumento na transcrição de HJURP e CENP-A (FILIPESCU *et al.*, 2016), o que explica o ganho de expressão consistentemente observado para estes genes durante o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer.

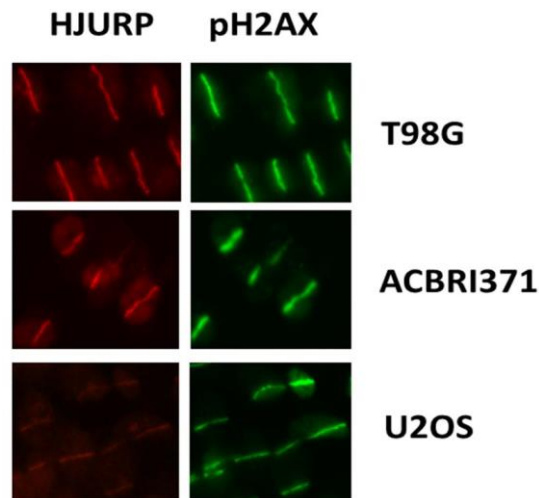
Dados anteriores de nosso grupo mostraram que o silenciamento de HJURP afeta a viabilidade de células de GBM e que os mecanismos de morte celular ativados são distintos em diferentes linhagens celulares (VALENTE *et al.*, 2013). Quando HJURP é silenciada na linhagem U87MG, esta torna-se prematuramente senescente a partir do quinto dia após o silenciamento. Já a linhagem T98G não mostra sinais de senescência, apresenta uma abrupta parada no ciclo celular em G2/M e grande aumento nas taxas de morte a partir do terceiro dia após o silenciamento (VALENTE *et al.*, 2013). Interessantemente, as células T98G possuem mutação no gene de p53, enquanto que a linhagem U87MG tem o gene

selvagem (ISHII *et al.*, 1999), o que indica que nas células de GBM a ocorrência de senescência prematura também depende de p53.

Vimos também que o silenciamento de HJURP combinado ao uso de radiação ionizante, embora não afete significativamente a atividade de reparo dos danos induzidos, apresenta um efeito sinérgico no aumento de morte celular para linhagens selvagens para p53, mas não para linhagens mutantes para p53. Estes dados indicam que a resposta das células de GBM à modulação dos níveis de HJURP depende do *status* de p53. Além disso, observamos que o silenciamento de HJURP isoladamente promove aumento nos níveis morte celular de outras linhagens de GBM (SERAFIM *et al.*, em preparação). Estes resultados sugerem que as células de GBM têm uma dependência dos altos níveis de HJURP por características intrínsecas, possivelmente relacionadas com a alta atividade de proliferação. Além disso, observamos recentemente que a indução de HJURP nas células de GBM U87MG, que originalmente expressam níveis baixos desta proteína, promove maior capacidade proliferativa e clonogênica, sugerindo uma potencial função na manutenção do estresse replicativo. Conjuntamente, estes dados sugeriram uma importante função para HJURP na manutenção da estabilidade genômica das células altamente proliferativas de GBM.

Dados recentes do nosso grupo confirmam a participação de HJURP no reparo de quebras de dupla fita de DNA induzidas através de radiação ionizante. Experimentos de irradiação com microlaser em astrócitos não tumorais (ACBRI371) e nas linhagens tumorais T98G e U2OS (Osteosarcoma), revelaram que a HJURP é recrutada para o local da lesão (Figura 1). Vimos ainda que o recrutamento ocorre em estágios bem iniciais da resposta ao dano. Além disso, observamos que o silenciamento de HJURP prejudica a atividade de reparo através das vias de recombinação homóloga e junção de pontas não homólogas. Estes dados revelam que de fato a HJURP está diretamente envolvida com reparo de quebras de dupla fita de DNA (SERAFIM *et. al.* 2017, em preparação).

Figura 1. Recrutamento de HJURP para a região de dano ao DNA após irradiação com microlaser



Células T98G (GBM), ACBRI371 (Astrócito não tumoral) e U2OS (osteosarcoma) foram plaqueadas, cultivadas por 24 horas. Em seguida, foram irradiadas com microlaser e fixadas após 10 minutos para realização do ensaio imunofluorescência utilizando anticorpos específicos anti-HJURP e anti- γ H2AX. As imagens foram adquiridas utilizando microscopia confocal. (Retirado de: Serafim et.al. 2017 em preparação)

RNA's mensageiros de HJURP

Dados da literatura evidenciam a existência de três RNAs mensageiros diferentes para o *locus HJURP*. O maior deles, denominado transcrito 1, apresenta 9 éxons e codifica a isoforma proteica A, que contém 748 aminoácidos. No transcrito 2 os éxons 4 e 5 estão ausentes e, portanto, este variante apresenta 7 éxons e codifica uma proteína hipotética menor, a isoforma proteica B que contém 694 aminoácidos. O transcrito 3 apresenta apenas 6 éxons (“*skipping*” dos éxons 4, 5 e 6) e codifica uma proteína hipotética de 663 aminoácidos, a isoforma C (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática do padrão éxon/intron dos três diferentes mRNAs expressos pelo locus HJURP

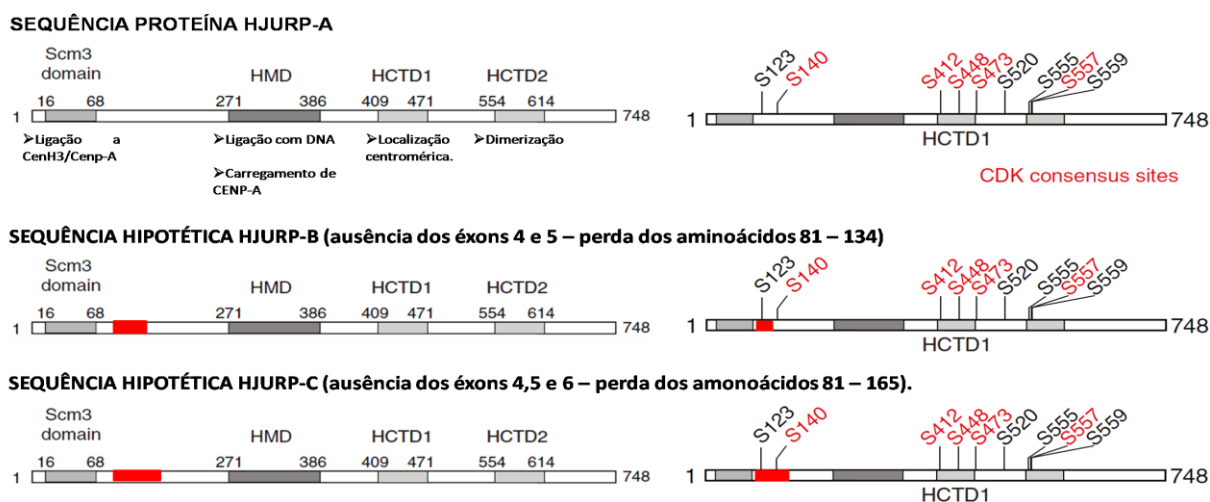


Sequência de mensageiros para as isoformas de HJURP: Alinhamento com a sequência do genoma humano usando a ferramenta BLAT (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). A figura ilustra o padrão de éxons e introns de cada uma delas.

Através da análise comparativa com a sequência produtora da maior isoforma (proteína HJURP A), percebemos que as isoformas hipotéticas B e C perdem trechos próximos ao domínio de interação com CENPA, porém ainda não

relacionados a uma função específica. A sequência produzida pelo transcrito 2 não contém aminoácidos de 81-134 presentes na isoforma A, perdendo assim o sítio de fosforilação S123. O transcrito 3 perde um fragmento maior, que compreende os aminoácidos de 81-165 de isoforma A, perdendo os potenciais sítios de fosforilação S123 e S140, e o domínio de interação com CDK. Estas modificações estruturais e perda de pontos de fosforilação certamente afetam a função das isoformas proteicas de HJURP, porém ainda não há relatos ou predição do potencial impacto da ausência desses trechos especificamente (Figura 3).

Figura 3. Predição esquemática das isoformas proteicas hipotéticas de HJURP



(Retirado e modificado de: Muller, *et al.*, - Cell Reports 8, 2014 - Fig1A e 2B) – Representação esquemática das proteínas hipotéticas HJURP B e C comparativamente a estrutura da proteína HJURP A (748aa) já descrita. Quadros vermelhos representam regiões hipoteticamente perdidas para cada isoforma.

Embora existam vários cDNAs depositados no *GenBank* que corroboram a expressão destes três mRNAs, não há dados na literatura sobre o padrão de expressão ou a funcionalidade de cada uma destas isoformas. Sendo assim, neste projeto avaliamos o padrão de expressão de cada um dos transcritos do *locus HJURP* em linhagens celulares de diferentes tipos tumorais, linhagens celulares de GBM e amostras de diferentes tecidos tumorais e não tumorais. Além disso, avaliamos o impacto do silenciamento dirigido a isoforma 1 em linhagens celulares de GBM, para assim investigar se a alteração na viabilidade celular, observada anteriormente pelo silenciamento da proteína HJURP total, depende majoritariamente da isoforma HJURP1 ou estaria relacionada a ação conjunta com as demais isoformas de HJURP.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar o padrão de expressão dos diferentes transcritos da *HJURP* em linhagens celulares de diferentes tipos tumorais e amostras de tecido tumoral e não tumoral; e buscar correlações da presença destes transcritos com a sobrevivência celular.

Objetivos Específicos

1. Verificar a expressão dos transcritos 1, 2 e 3 do *locus* *HJURP* nas linhagens celulares de GBM U87MG, T98G, U138MG, U251MG e U343MG e astrócitos não tumorais ACBRI371.

2. Quantificar os níveis de expressão dos diferentes transcritos de *HJURP* nas linhagens celulares de GBM e astrócitos não tumorais ACBRI371.

3. Quantificar a expressão dos transcritos 1, 2 e 3 do *locus* *HJURP* em 16 casos de astrocitomas de diferentes graus e 5 amostras de tecido cerebral não tumoral (substância branca).

4. Quantificar os níveis de expressão dos diferentes transcritos de *HJURP* em 20 amostras de diferentes tecidos não tumorais e 4 pares de linhagens celulares de distintos tipos tumorais/ não tumorais.

5. Silenciar a isoforma 1 de maneira dirigida em linhagens celulares que expressem pelo menos dois transcritos diferentes, verificar a ocorrência do silenciamento específico e avaliar a viabilidade celular das células silenciadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de Células

As linhagens celulares de GBM que foram utilizadas no projeto (U87MG, T98G U138MG, U251MG, U343MG e SW1088) (Tabela 1) são comercialmente disponíveis. A linhagem ACBRI371 (comercializado por *Cell Systems* até 2014), que são astrócitos humano não tumorais, foi cedida pela professora Elza Tiemi Sakamoto Hojo da FFCL-RP/USP e foram utilizadas como controle não tumoral nos experimentos. Os pares de linhagens de diferentes tipos tumorais (MCF10-2A/SK-BR-3, MRC-5/A549, HACAT/SIHA), que estão disponíveis comercialmente, foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Wilson Araújo da Silva Junior do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática – USP/RP. Todas as linhagens foram cultivadas de acordo com os padrões estabelecidos pelo “*The Global Bioresource Center - ATCC*”.

Amostras de tecido não tumoral e tumoral

As amostras controle (substância branca não tumoral) que foram utilizadas neste projeto foram obtidas de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica para tratamento de epilepsia no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. As amostras tumorais (Tabela 2) foram obtidas de pacientes submetidos à cirurgia para retirada dos tumores no mesmo hospital. Os fragmentos foram coletados no momento da cirurgia, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80°C até o momento do uso. Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento e o uso destas amostras para fins de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (processo HCRP n. 7645/99).

Os fragmentos congelados foram microdissecados em criótomo pelo patologista responsável, para ressecção das áreas bem preservadas do tecido (sem necrose) e com as características histológicas de interesse (substância branca normal ou glioma). Os fragmentos microdissecados que confirmam o diagnóstico de interesse foram então mantidos em freezer -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA das amostras foi extraído e avaliado para verificação de sua pureza e qualidade. A concentração e a pureza das amostras de RNA foram acessadas

através de leitura em espectrofômetro de luz UV para medida da absorbância (A) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. O valor médio da $A_{260/280}$ das amostras que foram utilizadas neste estudo são de 1,81 ($\pm 0,07$), o que reflete um bom grau de pureza. A integridade dos RNAs foi avaliada através da razão das intensidades das bandas 28S e 18S após eletroforese em gel de agarose desnaturante. As amostras fornecidas para este estudo apresentaram razão entre as bandas 28/18S $> 1,7$.

Além destas, foram avaliadas 20 amostras de tecidos não tumorais (*Human Total RNA Master Panel II – Clontech*) comercialmente disponíveis.

Tabela 1. Dados de origem e caracterização genética das linhagens utilizadas

NOME	CLASSE	ORGÃO	ORGANISMO	INFORMAÇÕES	DOENÇA	CARIÓTIPO
ACBRI371	Não Tumoral	CÉREBRO	Homo sapiens	Cortex cerebral adulto	Astrócito humano não tumoral	(Derivado de cultura primária. Cariótipo não realizado)
SW1088	Tumoral		Homo sapiens	Homem, caucasiano, 72 anos	Astrocitoma de grau 3	Mutação no gene p53
U-87-MG			Homo sapiens	Homem, caucasiano, 47 anos	glioblastoma	Hipodiploidia do cromossomo 44 (48% das células) Taxa de ploidia 5,9%. Há somente uma cópia do cromossomo X.
T98G			Homo sapiens	Homem, caucasiano, 61 anos	glioblastoma	Hiperpentaploide, maioria dos marcadores apresentam permuta nos complexos intercromossômicos. Há somente uma cópia do cromossomo X. Mutação no gene p53.
U-138MG			Homo sapiens	Homem, caucasiano, 47 anos	glioblastoma	De hiper a pentaploidia. Os marcadores [t(11:5), t(8q;4), t(19;?18), M1 and M2] são comuns a maioria dos cromossomos na fase S da metáfase. Composição cromossômica uniforme. Mutação no gene p53.
U251MG			Homo sapiens	Homem, caucasiano, 47 anos	glioblastoma	Hipoploidia (2n=46), mutação no gene p53.
U343MG			Homo sapiens	Homem, 55 anos	glioblastoma	20% de poliploidia. Ganho do cromossomo 7 e perda do 10 e 22 são frequentes.
MCF10-2A	Não tumoral	MAMA	Homo sapiens	Mulher, caucasiana, 36 anos	Fibrose (glandula mamaria)	wt p53
SK-BR-3	Tumoral		Homo sapiens	Mulher, caucasiana, 43 anos	adenocarcinoma	Mutação no gene p53
MRC5	Não Tumoral	PULMÃO	Homo sapiens	Homem, caucasiano, 14 meses de gestação	Normal	wt p53
A549	Tumoral		Homo sapiens	Homem, caucasiano, 58 anos	Carcinoma de pulmão	wt p53
HaCat	Não Tumoral	COLO ÚTERO	Homo sapiens		-	-
SiHa	Tumoral		Homo sapiens		Carcinoma de célula escamosa	wt p53

Retirado e adaptado de: -ATCC (The Global Bioresource Center);

- TP53 website (<http://p53.fr/>).

-IISHII, N. et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. BrainPathology (Zurich, Switzerland),v.9,p.469-479,1999;

Tabela 2. Classificação das amostras tumorais e dados clínicos dos pacientes

REGISTRO	GÊNERO	DIAGNÓSTICO	DATA DE NASC	DATA DA CIRURGIA	ÚLTIMO REGISTRO	MORTO1VIVO 0	DIAS ATÉ ÓBITO	BIÓPSIA
SNC 02	M	AST2	01/04/1958	27/06/2002	unk	unk	unk	07037/02
SNC 08	F	AST2	14/02/1958	25/07/2002	01/05/2005	1	1011	8134/02
SNC 220	F	AST2	25/07/1976	27/10/2004	25/10/2006	1	728	11735/04
SNC 250	M	AST2	30/09/1959	02/02/2006	12/03/2010	1	1499	1162/2006
SNC 482	F	AST2	12/08/1966	24/09/2008	21/08/2009	1	331	13733/2008
SNC 71	M	AST3	05/08/1966	20/03/2003	09/06/2005	1	812	2886/03
SNC 85	M	AST3	18/08/1970	29/04/2003	24/01/2004	1	270	4441/2003
SNC 169	M	AST3	15/08/1961	17/03/2004	24/02/2005	1	344	2858/2004
SNC 234	M	AST3	09/08/1961	18/02/2005	30/08/2009	1	1654	1895/05
SNC 243	M	AST3	15/10/1941	13/06/2005	14/10/2005	1	123	7104/05
SNC 06	F	GBM	23/08/1938	23/07/2002	04/10/2002	1	73	08005/2002
SNC 96	F	GBM	07/07/1931	28/05/2003	03/06/2003	1	6	5598/03
SNC 114	F	GBM	17/09/1924	23/07/2003	31/07/2004	1	374	7723/2003
SNC 134	M	GBM	23/05/1979	16/10/2003	31/10/2006	1	1111	11402/03
SNC 174	M	GBM	13/10/1937	26/03/2004	01/10/2004	1	189	3337/2004
SNC 179	F	GBM	18/10/1958	28/04/2004	06/05/2004	1	8	4780/04
SNC 198	M	GBM	01/09/1985	29/07/2004	16/01/2005	1	171	7754/04
SNC 199	M	GBM	24/06/1935	04/08/2004	06/01/2005	1	155	8011/2004
SNC 219	M	GBM	20/02/1938	25/10/2004	15/03/2005	1	141	11638/04
SNC 228	M	GBM	27/09/1967	01/12/2004	19/11/2012	0	2910	13184/04

Registro e informações clínicas das amostras tumorais de pacientes submetidos à cirurgia para retirada de tumor no Hospital das Clínicas – Ribeirão Preto. Grupos: AST2 – astrocitoma de grau 2; AST3 – astrocitoma de grau 3; GBM – glioblastoma, grau 4.

Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração de RNA das células, todo o meio da placa de seis poços foi retirado e adicionados 500 µL de TRIzol (Invitrogen®), seguido da ressuspensão para lise celular. Após aguardar 5 minutos a temperatura ambiente para dissociação de nucleoproteínas, o conteúdo de cada poço foi transferido para um tubo eppendorf. Foram adicionados 100uL de Clorofórmio a cada tubo, seguido de agitação vigorosa durante 15 segundos e incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Ao termino da incubação, os tubos foram centrifugados a 12000RPM por 15 minutos a 4°C para a separação do RNA (fase aquosa - superior) do DNA com as proteínas (fase orgânica – inferior – contendo clorofórmio + trizol). Os lipídeos formarão uma interface esbranquiçada. A fase aquosa foi coletada com muito cuidado para não perturbar a interfase lipídica e a fase orgânica, seguido de transferencia para um novo tubo. Para a precipitação do RNA foram adicionados 250uL de isopropanol gelado a fase aquosa, seguidos de homogenização delicada. Nesta etapa as amostras foram incubadas em gelo por 1 hora visando o melhor eficiência no processo de precipitação do RNA. As amostras foram centrifugadas a

12000RPM por 10 minutos a 4°C, tornado visível o pellet de RNA proporcional a quantidade de células lisadas. O sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado de forma intercalada a centrifugações de 12000RPM por 5 minutos a 4°C. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e o tubo colocado coberto em bancada para secar o resíduo de etanol. Por fim, após 10 minutos, o pellet foi resusendido em 30uL de água tratada com DEPC e as amostras foram quantificadas no aparelho Nanovue® seguido do estoque em freezer -80°C.

Para a transcrição reversa de RNA é utilizado o kit "High Capacity cDNA Archive" (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os RNAs de amostras tumorais já estavam disponíveis, não necessitando passar pela parte de extração de RNA e verificação.

PCR Convencional

Para a realização da PCR convencional, foram desenhados *primers* (F:forward; R:reverse) de forma flanquear em éxons alternativos e amplificar fragmentos de diferentes tamanhos de cada transcrito para as isoformas da proteína HJURP (Tabela 3).

Tabela 3. Primers utilizados para RT-PCR convencional

PRIMERS PCR CONVENCIONAL					
NOME	SEQUÊNCIA	POSIÇÃO RELATIVA (TRANSCRITO 1)	ISO 1	ISO 2	ISO 3
>HJURP1_F	5'-GGACAGATGGCTCCGTGCAA-3'	Éxon 4	109pb	NA*	NA*
>HJURP1_R	5'-CTGGTCTGACGTGGCATCGA-3'	Éxon 5			
>HJURP2-3_F	5'-ATGGCCACGCTGACCTACGA-3'	Éxon 2	489pb	329pb	NA*
>HJURP2_R	5'-TGCACCTTGTAGCAGTATATCC-3'	Éxon 6			
>HJURP2-3_F	5'-ATGGCCACGCTGACCTACGA-3'	Éxon 2	641bp	481pb	389pb
>HJURP3_R	5'-CAGTGAAGGCAGCGGAGTCA-3'	Éxon 7			

Sequência de *primers* referentes à amplificação por RT-PCR convencional dos diferentes transcritos de HJURP. As sequências foram desenhadas utilizando como base a posição relativa de cada éxon dentro do maior transcrito (que codifica a isoforma 1 de HJURP) com auxílio do software OligoExplorer1.2 e sintetizadas por "Síntese Biotecnologia LTDA – Belo Horizonte – MG". Cada par de primer pode amplificar mais de um fragmento, porém o tamanho deste diferencia a isoforma detectada. O tamanho do fragmento de interesse está destacado. ISO1/ISO2/ISO3: Fragmento formado pela amplificação dos transcritos 1, 2 e 3. * Não amplifica.

A reação foi construída para um volume final de 25,0µL contendo 5,0µL de cDNA; 2,5µL de tampão 10x; 1,0µL de dNTP 10 mM; 1,5mM de MgCl₂; 1,25µL de cada *primer* (F e R) 10uM; 12,5µL de água DEPC e 0,5µL de enzima Taq DNA

Polimerase 5,0 U/ μ L (Invitrogen, CA, EUA). Esses tubos foram submetidos a amplificação em termociclador como se segue:

CICLO	TEMPERATURA	TEMPO	ETAPA
1	94°C	3 min	Desnaturação cDNA
40	94°C	45 seg	Anelamento de <i>primers</i> Extensão da sequência Extensão Final Resfriamento
	55°C	1 min	
	72°C	45 seg	
1	72°C	10 min	
Final	4°C	-	

Para a avaliação dos produtos de amplificação, foram retirados cada tubo de 15-25 μ L de amostra e aplicados em gel de agarose 2% (Sigma), diluído em tampão TAE 1x (Tris-acetato-EDTA), o qual foi submetido a corrente de 100V durante uma hora para a eletroforese. A visualização dos produtos de amplificação foi auxiliada por aparelho transiluminador após submeter o gel a incubação com 0,8mg/mL de brometo de etídeo (Sigma) em tampão TAE 1x. A melhor visualização dos produtos de amplificação foi obtida com exposição do gel pronto por 15min em solução de iodeto de propídeo 0,8mg/mL em TAE 1X seguido por 5 min de lavagem em banho de água destilada.

PCR Quantitativo

A partir do produto da síntese de cDNA foi realizada a análise de PCR quantitativo, utilizando *primers* específicos para a amplificação seletiva de cada transcrito da proteína HJURP e transcritos totais (Tabela 4) e SYBR Green (Applied Biosystems®) para detecção do produto de amplificação. A quantificação do produto da reação foi feita através da emissão de fluorescência verde após a ligação do reagente entre a dupla fita de DNA. O procedimento de amplificação foi feito de acordo com o seguinte protocolo:

CICLO	TEMPERATURA	TEMPO
1	50°C	2 min
1	95°C	10 min
40	95°C	15 seg
	60°C	1 min
Final	4°C	-

As reações de qRT-PCR para as linhagens celulares foram feitas em triplicatas experimental e para as amostras tumorais em duplicata devido sua escassez. Para cada reação de volume final igual 12 μ L, foram utilizado 3 μ L de solução de *primers* (F e R) em concentração variável de acordo com o gene usado, 6 μ L de SYBR Green (Applied Biosystems®) e 3 μ L de cDNA.

Os resultados da amplificação foram processados pelo software do equipamento (7500 Real Time PCR System – Applied Biosystems®) e analisados conforme o método do 2^{-DDCt} (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os genes/transcritos estudados neste trabalho (Tabela 4) tiveram seus valores de Ct (Threshold Cycle – nº de ciclos) normalizados com os resultados de expressão obtidos para o gene HPRT, que não apresenta variação significativa no modelo experimental que utilizamos (VALENTE *et. al.*, 2009). A análise estatística dos dados de expressão referente às linhagens celulares foi feita utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparision Test que compara dois grupos entre si (controle x experimental).

Tabela 4. Primers utilizados para PCR quantitativo

PRIMERS RT-PCR QUANTITATIVO			
NOME	SEQUÊNCIA	TM (°C)	POSIÇÃO RELATIVA (TRANSCRITO 1)
>HJURP1_F	5'-GGACAGATGGCTCCGTGCAA-3'	60,2	Éxon 4
>HJURP1_R	5'-CTGGTCTGACGTGGCATCGA-3'	59,5	Éxon 5
>HJURP1#2_F	5'-AGATCCAGGACTCCTCCATG-3'	61,9	Junção Éxon 3 com 4
>HJURP1#2_R	5'-TGAATCGGCTCCCAGGACT-3'	63,4	Junção Éxon 4 com 5
>RT-PCR HJ2_F	5'-AGAGATCCAGCCTGCAGTGC-3'	59,8	Junção Éxon 3 com 6
>RT-PCR HJ2_R	5'-CCCTTCCAGCTCTGTTACCTG-3'	57,3	Éxon 7
> RT-PCR HJ3_F	5'-GAGAGATCCAGTGTGCAGGT-3'	56,5	Junção Éxon 3 com 7
> RT-PCR HJ3_R	5'-CACCAGGACTCTTTCTGGAG-3	54,7	Éxon 8
HJURP TOTAL_F	5'-GAAGGGATGTACGTGTGACTC-3	56,5	Éxon 8
HJURP TOTAL_R	5'-CCATTCTCTGGGAGATGAAGC-3	55,6	Éxon 8
>HPRT_F	5'-TGAGGATTTGGAAAGGGTGT-3'	58,6	-
>HPRT_R	5'-GAGCACACAGAGGGCTACAA-3'	58,2	-

Sequência de *primers* referentes à amplificação por RT-qPCR quantitativo dos diferentes transcritos de HJURP. As sequências foram desenhadas utilizando como base a posição relativa de cada éxon dentro do maior transcrito (que codifica a isoforma 1 de HJURP) com auxílio do software OligoExplorer1.2 e sintetizadas por “Síntese Biotecnologia LTDA – Belo Horizonte – MG”, de forma que cada par de *primers* amplifique apenas sua isoforma correspondente (HJ1, HJ2 e HJ3). A sequência HJURP TOTAL amplifica todos os transcritos de HJURP.

Silenciamento dirigido através da transfecção com siRNAs

O princípio desta metodologia envolve a introdução de oligonucleotídeos de RNA dupla fita curtos em células eucarióticas, utilizando vesículas lipídicas artificiais os lipossomos, que se fundem com a membrana celular entregando o seu conteúdo no citoplasma.

Para conduzir experimento de silenciamento, foram utilizadas placas de 6 poços sendo que cada poço recebeu 1,25µL dos oligonucleotídeos (solução a 10 µM ou 50uM), dirigidos para o RNA referente ao transcritos hjurp total, hjurp1, hjurp2,

hjurp3 ou controle de sequência aleatória, em 250µL de meio Opti-MEM (Life Technologies) seguido de homogeneização. Em seguida, foram adicionados 2,5 µL de lipofectamina (RNAi MAX Invitrogen) em cada poço, a mistura foi homogeneizada novamente e deixada em repouso por 20 minutos. Após o repouso, 1 mL da suspensão celular com $1,5 \times 10^5$ células/mL (em meio de cultura contendo SFB) foi gotejada lentamente nos poços sobre o meio contendo os complexos de lipossomos com siRNA já formados. A microplaca foi tampada, homogeneizada e incubada por 24 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação, 750 µL do meio (com SFB) foi trocado e a placa incubada novamente por mais 24 horas. A eficiência do silenciamento do transcrito hjurp1, hjurp2, hjurp3 e hjurp total nas linhagens selecionadas, foi avaliado por qPCR utilizando o gene HPRT como controle endógeno.

Tabela 5. Oligonucleotídeos de RNA utilizados para silenciamento de mRNA

SIRNA'S		
NOME	SEQUÊNCIA	POSIÇÃO RELATIVA (TRANSCRITO 1)
siHJURP TOTAL	5'- CAGGCUGAGUUUACCUUCCAGCAAA -3'	Éxon 8
siHJURP 1	5'-CACGUCAGACCAGGAAGAGUCAGUU-3'	Éxon 4
siHJURP 2	5'-AGGAGAGAUCCAGCCUGCAGUGCCU-3'	Junção Éxon 3 com 6
siHJURP 3	5'-AGGAGAGAUCCAGUGUGCAGGUAA-3'	Junção Éxon 3 com 7
siControle	5'-GCGCGCUUUGUAGGAUUCGTT-3'	-

Ensaio de Apoptose e Morte Celular

Após plaqueamento e transfecção com oligonucleotídeos, as células foram tripsinizadas da placa e transferidas para tubos de 1,5mL e centrifugadas. Em seguida, o pellet foi lavado com PBS 1x e ressuspendido em uma mistura de anexina V – Alexa 488 (Molecular Probes®) e tampão de ligação (0,7µl de anexina: 100µl de tampão). No momento da leitura no citômetro de fluxo foi adicionado 1µl de iodeto de propídeo (0,1mg/ml). Essa metodologia fornece uma análise quantitativa dos níveis de apoptose e morte celular através da marcação com anexina e iodeto de propídeo, respectivamente. O fosfolipídeo fosfatidil-serina, que é reconhecido pela anexina, é normalmente mantido na face interna da bicamada lipídica da membrana, sendo exteriorizado apenas quando a célula entra em apoptose. Desse modo, a quantificação da marcação com anexina, que está conjugada a um fluoróforo específico (Alexa Flúor-488), fornece uma estimativa da quantidade de células em apoptose. O iodeto de propídeo marca as células mortas, uma vez que estas já

perderam totalmente o controle de permeabilidade da membrana, permitindo assim a entrada das moléculas de iodeto. As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCanto, BD®) para determinação da porcentagem de células marcadas na população.

Ensaio de Senescência celular

Conduzimos o experimento de silenciamento por transfecção de siRNA, como descrito acima, até a troca de 750uL do meio (com SFB) da placa, seguido de incubação em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por mais 48 horas (3 dias de silenciamento) ou 96 horas (5 dias de silenciamento). Ao fim do período de recuperação, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 10 minutos. As células foram lavadas com PBS 1X e incubadas em tampão SA-betal-gal contendo X-gal por 24h em estufa a 37°C. A solução contendo X-gal foi substituída por PBS 1x e as imagens das células foram capturadas em microscópio de contraste de fase (NIKON Eclipse TS100) para análise visual das células marcadas.

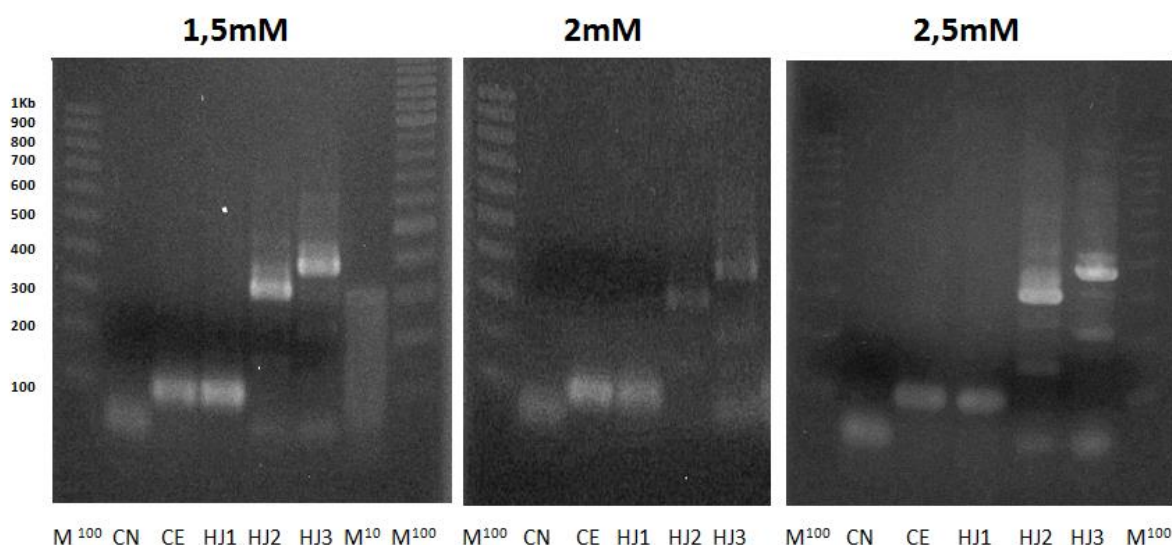
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

PCR Convencional

Padronização da concentração de magnésio

Durante o período de padronização da PCR convencional foi utilizado um mix do cDNA das diferentes linhagens. Nesse período foram realizados vários ajustes para aumentar a seletividade da reação, visando a obtenção dos produtos de amplificação adequados. A concentração de magnésio na reação de amplificação dos fragmentos de cDNA foi o principal alvo de ajuste. Dentre as três concentrações testadas, observamos boa especificidade e melhor eficiência na concentração de 1,5mM (Figura 4). Portanto, esta foi a concentração utilizada para analisar a presença dos transcritos (qualitativamente) em cada uma das linhagens separadamente.

Figura 4. Produtos de amplificação correspondentes às isoformas de HJURP obtidos em diferentes concentrações de íons magnésio

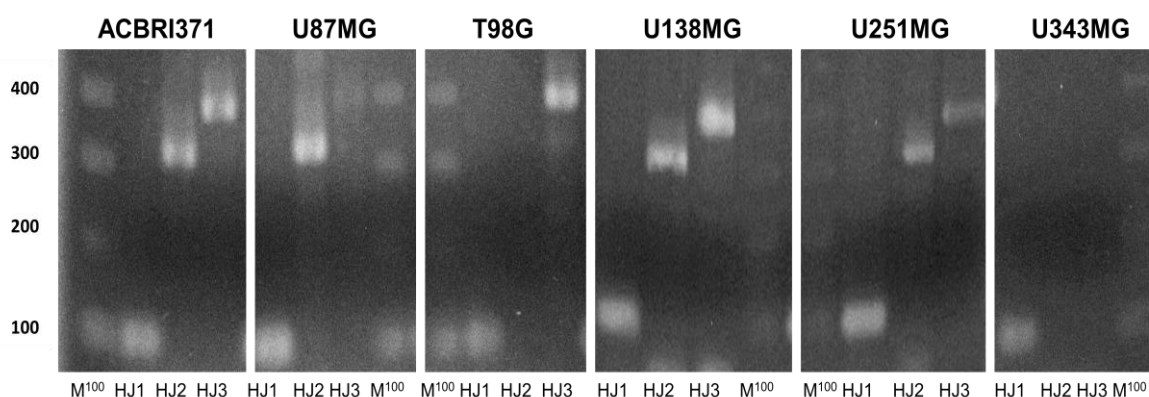


Cada conjunto de primers foi utilizado em reações de amplificação com Taq DNA polimerase convencional (Invitrogen) e 5uL da mistura contendo porções iguais dos cDNA das células ACBRI, T98G, U87MG, U138MG, U251MG e U343MG, seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos obtidos foram separados através de eletroforese em gel de agarose 2%, corados com solução de brometo de etideo e visualizados com exposição a luz *ultra-violeta*. São mostrados os resultados das reações de PCR utilizando 1,5mM (A) 2mM (B) ou 2,5mM (C) de magnésio. CN: ausência do cDNA; CE: controle de expressão constitutiva (HPRT); HJ1/HJ2/HJ3: conjuntos de primers que produzem fragmentos específicos de cada transcrito de HJURP M¹⁰: marcador de 10bp; M¹⁰⁰: marcador de 100bp.

Deteccão dos transcritos de HJURP nas diferentes linhagens celulares

Notamos que as três transcritos se mostram presentes nos astrócitos não tumorais (ACBRI371), U87MG, U138MG e U251MG. Apenas a linhagens T98G e U343MG apresentaram variações. As células T98G expressam somente as isoformas 1 e 3, enquanto que as células U343MG expressam apenas a isoforma 1 (Figura 5).

Figura 5. Produtos de amplificação correspondente às isoformas de HJURP em astrócitos não tumorais e linhagens



Cada conjunto de primers foi utilizado em reações de amplificação com Taq DNA polimerase convencional (Invitrogen) e 2 μ L do cDNA das células ACBRI, T98G, U87MG, U138MG, U251MG e U343MG, seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos obtidos foram separados através de eletroforese em gel de agarose 2%, corados com solução de brometo de etideo e visualizados com exposição a luz *ultra-violeta*.; HJ1/HJ2/HJ3: conjuntos de primers que produzem fragmentos específicos de cada transcrito de HJURP M¹⁰: marcador de 10bp; M¹⁰⁰: marcador de 100bp.

PCR Quantitativo

Definição da concentração ótima dos primers

A primeira etapa de padronização consistiu na execução de uma reação de PCR quantitativa, utilizando cinco diluições dos primers (0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M, 2,0 μ M e 2,5 μ M) para a avaliação da concentração ideal de uso na reação de qPCR. Nestas reações foi utilizado como *template*, uma mistura dos cDNAs das linhagens T98G, U87MG, U138MG, U251MG e U343MG e dos astrócitos não tumorais ACBRI371. A quantidade ideal de cada oligonucleotídeo foi determinada pela menor concentração de *primers* suficiente para obtenção do menor valor possível de Ct (*Cycle threshold*). Os valores de Ct são definidos na fase exponencial da reação e indicam o momento (em qual ciclo) a fluorescência de cada reação atinge o limiar definido como limite. Portanto, a quantidade de produto inicial na reação pode então

ser estimada através do tempo (número de ciclos) que foi necessário para atingir determinado nível de fluorescência. Desse modo, os valores de Ct são inversamente proporcionais ao número de cópias geradas e são utilizados para o cálculo de expressão relativa de cada gene/transcrito em estudo. Nas tabelas de 6 a 9 estão mostrados os valores de Ct das reações feitas em triplicata para os gene/transcritos HPRT, HJURP 1, HJURP 1#2, HJURP 2, HJURP 3, respectivamente. As concentrações ideais obtidas para cada *primer* foram destacadas nas tabelas abaixo.

Tabela 6. Padronização da concentração ótima dos *primers* para HPRT

CYCLE THRESHOLD					
CONCENTRAÇÃO	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	MÉDIA	DPR (%)*
0,5µM	17,6618	17,6196	17,6891	17,6568	0,1981
1,0µM	17,7340	17,5878	17,8226	17,7148	0,6691
1,5µM	17,8524	17,8346	17,8207	17,8359	0,0892
2,0µM	17,6176	-	17,7313	17,6744	0,4549
2,5µM	18,4202	18,5891	-	18,4122	0,5408

(*)DPR = desvio padrão relativo (%). Valores de 0,5 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas por serem consideradas variações muito altas entre as medidas. A exclusão foi representada por um traço.

Tabela 7. Padronização o da concentração ótima dos *primers* para HJURP1

CYCLE THRESHOLD					
CONCENTRAÇÃO	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	MÉDIA	DPR (%)*
0,5µM	20,5582	20,5191	20,5007	20,5260	0,1430
1,0µM	20,4029	20,5940	20,4818	20,4929	0,4687
1,5µM	20,7373	20,6177	20,5786	20,5112	0,4033
2,0µM	20,9367	20,7763	20,9627	20,8919	0,4833
2,5µM	19,9269	20,1237	-	20,0253	0,6949

(*)DPR = desvio padrão relativo (%). Valores de 0,5 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas por serem consideradas variações muito altas entre as medidas. A exclusão foi representada por um traço.

Tabela 8. Padronização o da concentração ótima dos *primers* para HJURP1#2

CYCLE THRESHOLD					
CONCENTRAÇÃO	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	MÉDIA	DPR (%)*
0,5µM	34,0754	-	34,5473	34,3114	0,9725
1,0µM	32,3338	32,2251	-	32,2795	0,2380
1,5µM	34,6937	34,3646	-	34,529	0,6740
2,0µM	-	32,4805	32,7866	32,6335	0,6631
2,5µM	33,0599	32,6767	32,0011	32,5792	1,6455

(*)DPR = desvio padrão relativo (%). Valores de 0,5 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas por serem consideradas variações muito altas entre as medidas. A exclusão foi representada por um traço.

Tabela 9. Padronização da concentração ótima dos *primers* para *HJURP2*

CYCLE THRESHOLD					
CONCENTRAÇÃO	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	MÉDIA	DPR (%)*
0,5µM	26,0919	25,7707	-	25,8960	0,6634
1,0µM	25,3397	-	25,7127	25,5262	1,0333
1,5µM	25,1766	24,7569	-	24,9667	1,1885
2,0µM	23,4669	23,6235	23,9117	23,6674	0,9532
2,5µM	-	24,0800	24,5691	24,3245	1,4217

(*)DPR = desvio padrão relativo (%). Valores de 0,5 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas por serem consideradas variações muito altas entre as medidas. A exclusão foi representada por um traço.

Tabela 10. Padronização da concentração ótima dos *primers* para *HJURP3*

CYCLE THRESHOLD					
CONCENTRAÇÃO	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	MÉDIA	DPR (%)*
0,5µM	27,38461	26,84962	27,38428	27,20617	1,134965
1,0µM	27,64958	-	27,2775	27,46354	0,958013
1,5µM	25,67094	25,69406	25,49902	25,62134	0,415909
2,0µM	25,21414	25,31392	25,1232	25,21709	0,378294
2,5µM	25,21539	25,4537	-	25,33454	0,665152

(*)DPR = desvio padrão relativo (%). Valores de 0,5 unidade de Ct entre as curvas foram excluídas por serem consideradas variações muito altas entre as medidas. A exclusão foi representada por um traço.

Avaliação da eficiência de amplificação dos *primers*

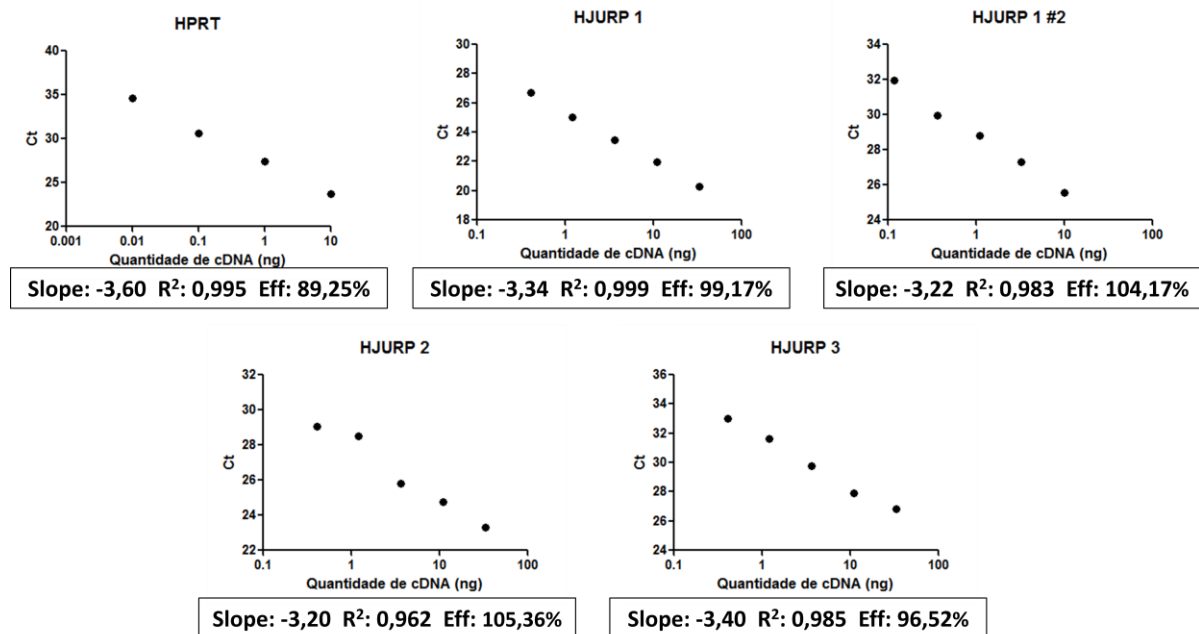
Após a determinação da concentração ideal de cada primer, foram realizadas diluições seriadas de uma mistura de cDNAs para a verificação da eficiência de amplificação dos primers. Conforme os padrões de diluição obtidos para cada gene (1:10 para HPRT e 1:3 para HJURP 1, 1#2, 2 e 3), foi possível obter a curva de eficiência ideal para cada par de *primers* (Figura 6). As curvas foram obtidas a partir da interpolação dos valores de Ct obtidos de cada reação (Eixo Y) e os respectivos logaritmos da concentração relativa de cDNA das amostras (Eixo X). A reta média foi traçada a partir dos valores médios de Ct de cada diluição de cDNA e a eficiência da reação (E) de qRT-PCR foi calculada segundo RAMAKERS *et al.*, 2003, utilizando a seguinte fórmula:

$$E = 10^{[-1/slope]}$$

O *slope* corresponde ao coeficiente de inclinação da reta da curva padrão. Uma reação com 100% de eficiência apresenta um valor de *slope* de -3,3 para análises da variação de Ct em função do log₁₀ de diluições de cDNA 1:10. O coeficiente de correlação (R²) determina a proximidade entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras, onde valores próximos a 1 indicam uma proporção ideal entre esses parâmetros. Isso indica que, sob

condições ideais de amplificação, a quantidade de produto gerado aumenta exponencialmente, dobrando a cada ciclo de reação.

Figura 6. Curva padrão das reações de verificação de eficiência de amplificação dos primers para HPRT, HJURP1, HJURP1#2, HJURP2, HJURP3



O nível de mRNA dos transcritos em estudo foram avaliados no mix de cDNA's das linhagens celulares através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green, com kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems). O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A verificação da eficiência dos primers foi calculada através da reta média segundo RAMAKERSET *al.*, 2003. Os gráficos foram construídos através do software GraphPadPrism 5.

Para esse estudo foram considerados razoáveis valores de eficiência entre 90 e 110%. A figura 6 mostra as curvas padrão (valores de Ct plotados em função do $\log_{10}$ da concentração de cDNA utilizado como *template*) obtidas para cada gene, assim como os valores de eficiência da reação, R² e o coeficiente de inclinação da reta (*slope*). Consideramos viável a utilização dos primers de HPRT, HJURP 1,1#2, 2 e 3 após a verificação de suas satisfatórias eficiências.

Quantificação dos transcritos do locus HJURP nas linhagens celulares de GBM

Os níveis de expressão dos transcritos para as isoformas de HJURP 1, 2 e 3, foram avaliados nas linhagens celulares de GBM (U87MG, T98G, U138MG,

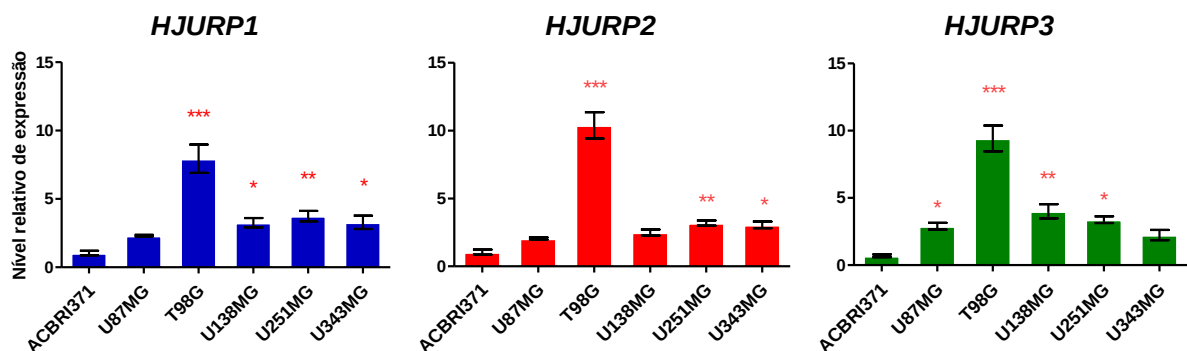
U251MG, U343MG) e nos astrócitos não tumorais ACBRI371 em triplicata biológica, sendo cada uma em quadruplicata técnica. Para a quantificação, os transcritos foram normalizados em relação ao gene HPRT (controle endógeno de expressão constitutiva) em todas as amostras. Para facilitar a comparação, os dados numéricos referentes à expressão relativa média dos transcritos (Tabela 11) estão também apresentados sob a forma de gráficos (Figura 7). Nossos resultados demonstram que os três transcritos de HJURP estão presentes em maiores níveis nas linhagens celulares de GBM quando comparados aos astrócitos não tumorais ACBRI371, sendo que cada um deles apresentou um aumento proporcional em cada linhagem analisada.

Tabela 11. Expressão relativa média dos transcritos de HJURP nas linhagens celulares de GBM em relação aos astrócitos não tumorais ACBRI371

LINHAGEM	EXPRESSÃO RELATIVA (MÉDIA)		
	HJURP 1	HJURP 2	HJURP 3
ACBRI371	1,041	1,046	1,321
U87MG	2,312	2,092	2,892*
T98G	7,941***	10,385***	9,429***
U138MG	3,256*	2,615	4,007**
U251MG	3,747**	3,770**	3,388*
U343MG	3,287*	3,046	2,239*

Desvio padrão. * p<0,05, **p<0,001 e ***p<0,0001.

Figura 7. A expressão relativa dos três transcritos de HJURP é aumentada nas linhagens celulares de GBM em relação aos astrócitos não tumorais ACBRI371



O nível de mRNA dos transcritos em estudo foram avaliados através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green, com kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems). O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. O cálculo de expressão relativa foi feito pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e as células ACBRI371 foram usadas como referência. A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPadPrism 5 e os testes aplicados foram One-way ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. * p<0,05, **p<0,001 e ***p<0,0001.

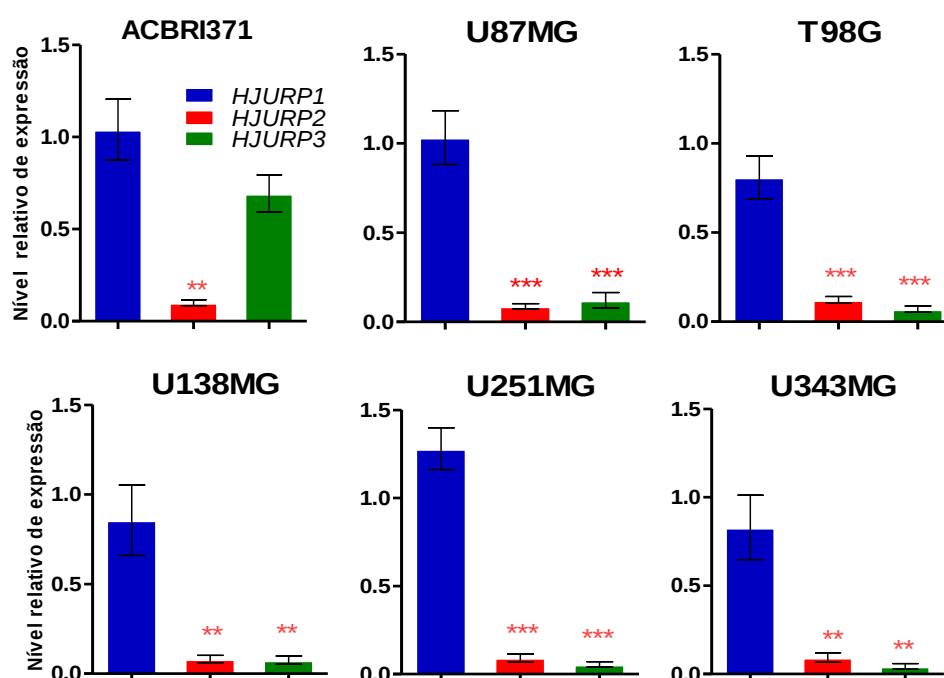
Comparando o perfil de expressão dos diferentes transcritos entre si (Tabela 12, Figura 8), percebemos que o transcrito HJURP1 é fortemente predominante em todas as linhagens. Os transcritos HJURP2 e HJURP3 apresentam aproximadamente 8% e 5% dos níveis de expressão do transcrito 1, respectivamente, em todas as células estudadas. Estes dados fortalecem a suposição de uma função majoritária do transcrito 1 nas células de GBM.

Tabela 12. Expressão relativa média dos transcritos de HJURP em relação ao transcrito *HJURP1* nas linhagens celulares de GBM e astrócitos não tumorais

LINHAGEM	EXPRESSÃO RELATIVA (MÉDIA)		
	HJURP 1	HJURP 2	HJURP 3
ACBRI371	1,041	0,088**	0,043
U87MG	1,007	0,083***	0,118***
T98G	0,822	0,113***	0,059***
U138MG	0,762	0,063**	0,069**
U251MG	1,260	0,077***	0,048***
U343MG	0,879	0,074**	0,032**

Desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Figura 8. Expressão relativa de cada transcrito em relação ao transcrito *HJURP1* nas linhagens celulares de GBM e astrócitos não tumorais



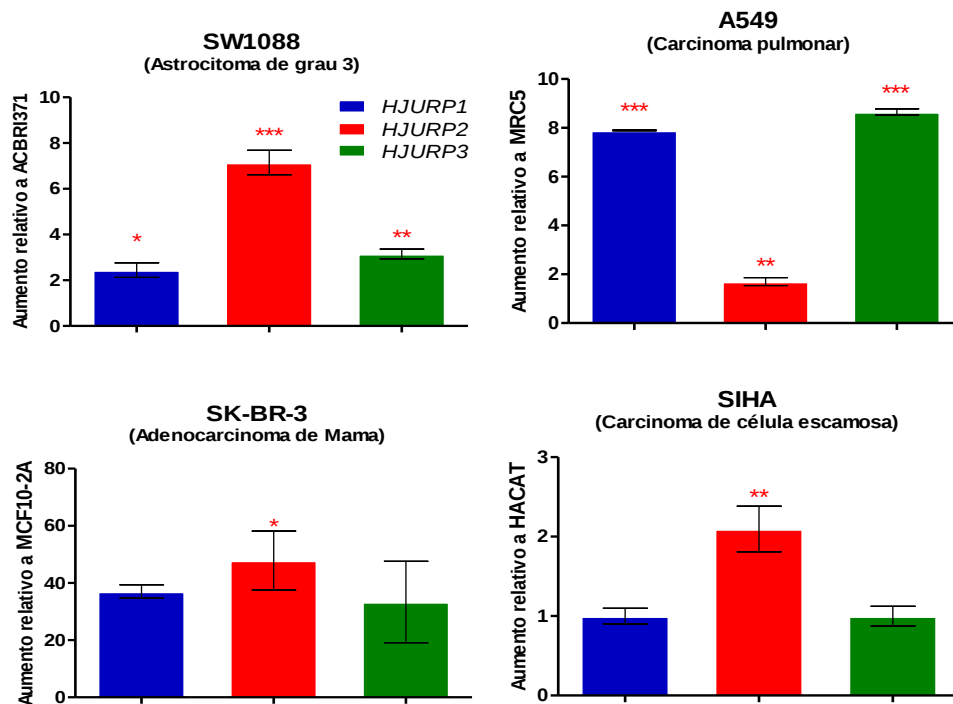
O nível de mRNA dos transcritos em estudo foram avaliados através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green, com kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems). O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. O cálculo de expressão relativa foi feito pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e a média da expressão do transcrito HJURP 1 foi utilizado como normalizador em cada linhagem. A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPadPrism 5 e os testes aplicados foram One-way ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Quantificação dos transcritos do locus HJURP em linhagens tumorais / não tumorais de origens distintas

Os nível de expressão dos transcritos das isoformas HJURP1, 2 e 3 também foram avaliados em 4 pares de linhagens tumorais/não tumorais provenientes de diferentes tecidos. Para a quantificação, o gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. As linhagens não tumorais foram utilizadas como referência para os cálculos de expressão de cada transcrito na linhagem tumoral correspondente.

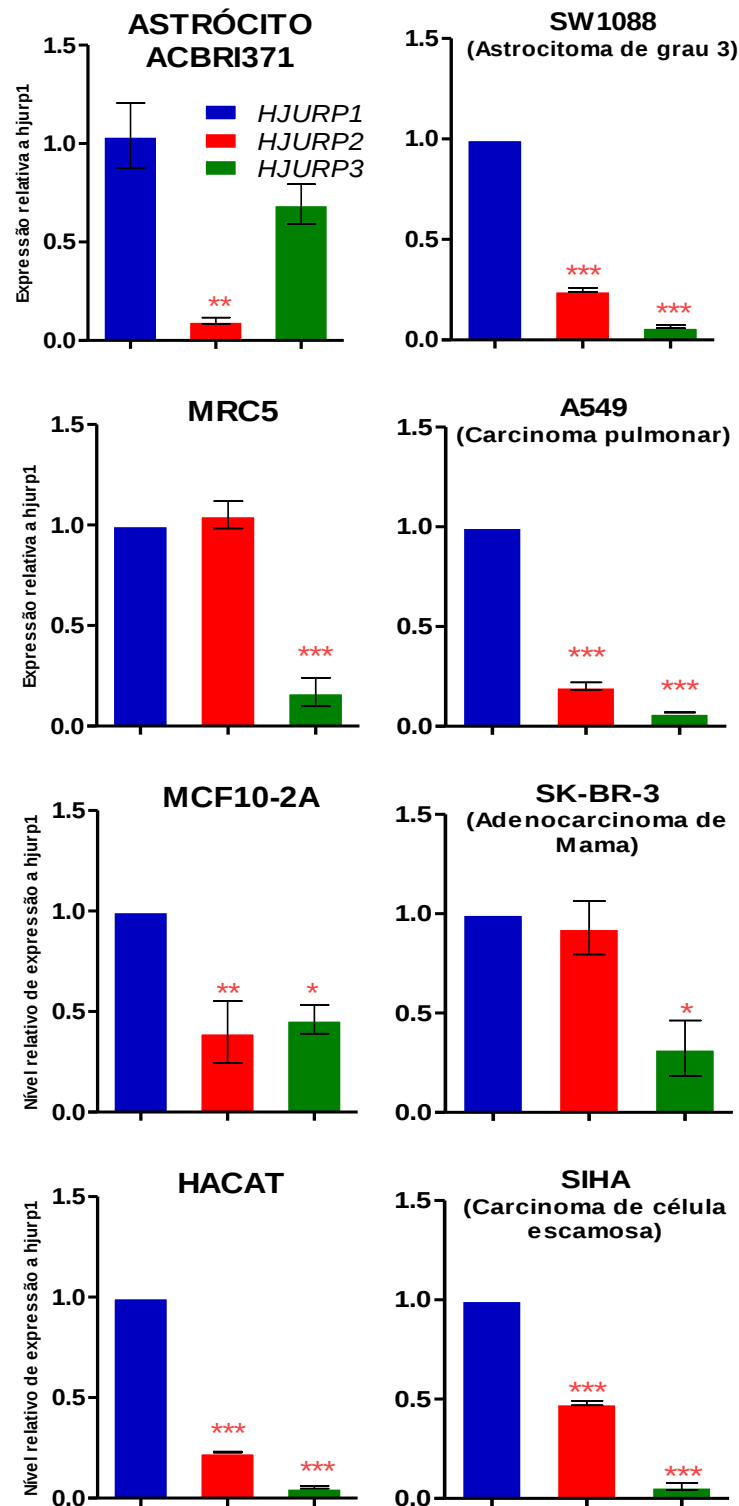
Assim como observado anteriormente, o nível de expressão dos transcritos de HJURP é superior nas linhagens tumorais (SW1088, A549, SK-BR-3 e SIHA) quando comparadas com seus pares não tumorais (ACBRI371, MRC5, MCF10-2A, HACAT) (Figura 9). Observamos um aumento de 1-40x para o transcrito HJURP 1, 2-45x para o HJURP 2 e 1-30x para HJURP 3, com destaque para a linhagem SK-BR-3, que apresentou os maiores níveis de expressão dos transcritos quando comparada ao seu linhagem não tumoral MCF10-2A (Figura 9). Esses dados são condizentes com o aumento na expressão de HJURP já demonstrado para linhagens de câncer de mama (HU *et al.*, 2010), pulmão (KATO *et al.*, 2007) e astrocitomas (VALENTE *et al.*, 2009). Quando analisamos as linhagens de forma isolada, apesar do transcrito 2 apresentar o maior aumento relativo nas linhagens SW1088, SK-BR-3 e SIHA (Figura 9), ele não supera a expressão total do transcrito 1 (Figura 10), assim como já observado para linhagens de GBM (Figura 8).

Figura 9. A expressão dos transcritos do locus *HJURP* é aumentada nas linhagens tumorais em relação a sua linhagem não tumoral



O nível de mRNA dos transcritos em estudo foram avaliados através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green, com kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems). O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. A expressão de cada transcrito nas linhagens não tumorais (ACBRI371, MRC5, MCF10-2A, HACAT) foram utilizadas como normalizadores da expressão desses genes na linhagem respectiva tumoral (SW1088, A549, SKBR3, SIHA). A análise estatística entre os pares de colunas foi realizada com auxílio do software GraphPadPrism 5 e os testes aplicados foram One-way ANOVA seguido doDunnett'sMultipleComparison Test.* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Figura 10. Expressão relativa de cada transcrito do lócus *HJURP* em relação a *HJURP1* em diferentes linhagens celulares tumorais e não tumorais



O nível de mRNA dos transcritos em estudo foram avaliados através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green, com kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems). O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. O cálculo de expressão relativa foi feito pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e a média da expressão do transcrito HJURP 1 foi utilizado como normalizador em cada linhagem. A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPadPrism 5 e os testes aplicados foram One-way ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test. * p < 0,05, ** p < 0,001 e *** p < 0,0001.

Quantificação dos transcritos do locus *HJURP* em astrocitomas de diferentes graus

A expressão dos transcritos *HJURP*1, 2 e 3, também foi avaliada em 16 casos de astrocitomas de diferentes graus e 5 amostras de tecido cerebral não tumoral (substância branca) em uma replica biológica realizada em triplicata técnica. Para a quantificação, os transcritos alvo foram normalizados em relação ao gene *HPRT* (controle endógeno de expressão constitutiva). Os dados numéricos referentes à expressão relativa dos transcritos nas amostras de paciente (Tabela 13) estão divididos por classes de astrocitoma e apresentados em forma de gráfico (Figura 11). Todos os grupos tumorais (AST 2, AST3 e GBM) mostraram maior expressão dos transcritos de *HJURP* quando comparados ao grupo substância branca (SB). Entretanto, claramente as isoformas 1 e 3 se destacaram, apresentado cerca de 20 e 50 vezes os níveis observados no grupo SB, para *hjurp*1 e *hjurp*3, respectivamente. Enquanto que, a isoforma 2 mostrou um aumento bem mais sutil, de aproximadamente 4 vezes nos tumores em relação ao grupo SB.

Tabela 13. Expressão relativa dos transcritos de *HJURP* em amostras de tecido cerebral tumoral (AST 2, AST 3 e GBM) em relação a média de cada transcrito do grupo de tecido cerebral não tumoral (SB)

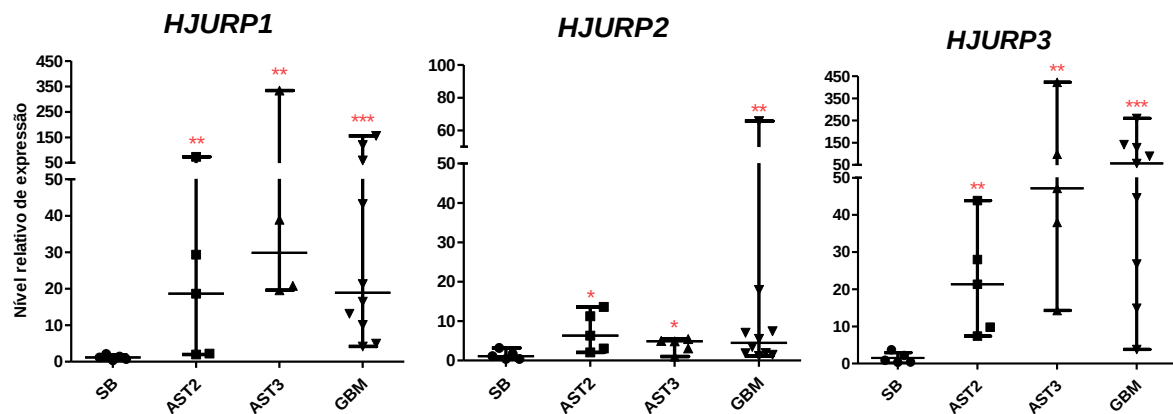
		EXPRESSÃO RELATIVA		
REGISTRO	DIAGNÓSTICO	HJURP 1	HJURP 2	HJURP 3
SNC SB 68	-	0,725	0,385	2,198
SNC SB 95	-	0,381	0,421	3,724
SNC SB 79	-	1,451	1,725	0,403
SNC SB 81	-	2,141	3,217	0,895
SNC SB 90	-	1,166	1,112	0,339
SNC 02	AST 2	1,991	2,054	9,808
SNC 08	AST 2	18,655	6,333	7,400
SNC 220	AST 2	2,232	3,074	43,848
SNC 250	AST 2	29,321	11,253	21,327
SNC 482	AST 2	73,467	13,590	28,016
SNC 71	AST 3	38,909	4,913	98,459
SNC 85	AST 3	20,821	1,033	14,291
SNC 169	AST 3	334,237	5,450	423,097
SNC 234	AST 3	19,588	4,973	38,005

		EXPRESSÃO RELATIVA		
REGISTRO	DIAGNÓSTICO	HJURP 1	HJURP 2	HJURP 3
SNC 06	GBM	13,189	7,090	128,140
SNC 96	GBM	21,328	1,898	26,773
SNC 114	GBM	10,126	1,856	14,910
SNC 134	GBM	4,989	1,510	3,803
SNC 174	GBM	59,631	7,460	89,449
SNC 179	GBM	156,217	17,920	259,841
SNC 198	GBM	43,269	3,490	44,589

Amostras não tumorais: (SB) Substância Branca. Amostras tumorais: (AST 2) Astrocitoma de grau 2; (AST 3) Astrocitoma de grau 3; (GBM) Glioblastoma Multiforme. ND: Não Detectável.

Analisando cada amostra (tumoral e não tumoral) de forma isolada (Tabela 14 e Figura 12), percebemos que os grupos astrocitoma de baixo grau (AST2) e substância branca apresentam maiores níveis de expressão do transcrito *hjurp2* quando comparado aos demais grupos (AST3 e GBM). Curiosamente, todas amostras não tumorais (substância branca) apresentaram maiores níveis de expressão para o transcrito 2 (Figura 12), diferentemente dos grupos tumorais (AST3 e GBM), onde o transcrito 1 se destaca (Figura 12).

Figura 11. Expressão relativa dos transcritos de *HJURP* em amostras de tumores cerebrais (AST 2, AST 3 e GBM) em relação a média de cada transcrito no grupo de tecido



O nível de mRNA dos transcritos em estudo foram avaliados através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green, com kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems). O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. O cálculo de expressão relativa foi feito pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e a média de expressão de cada transcrito do grupo Substância Branca (SB) foi utilizado como referência. A faixa horizontal destaca a expressão média de cada transcrito para cada grupo de amostras. A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPadPrism 5 e os testes aplicados foram Teste T seguido de Mann-Whitney test para comparação de cada grupo tumoral (AST2, AST3, GBM) com o grupo controle não tumoral (SB). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

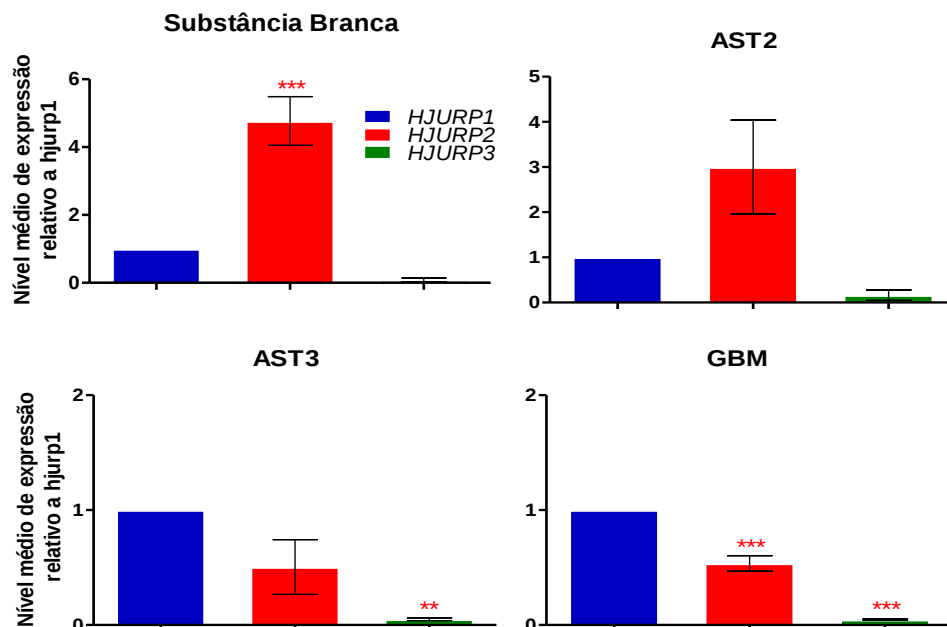
Tabela 14. Expressão relativa dos transcritos de *HJURP* nos grupos tecido cerebral não tumoral (SB) e amostras de tecido cerebral tumoral (AST 2, AST3 e GBM) em relação a expressão do transcrito *HJURP1*

REGISTRO	DIAGNÓSTICO	EXPRESSÃO RELATIVA AO TRANSCRITO 1	
		HJURP 2	HJURP 3
SNC SB 68	-	2,402027	0,09492
SNC SB 95	-	4,989375	0,305899
SNC SB 79	-	5,370078	0,008684
SNC SB 81	-	6,788164	0,013074
SNC SB 90	-	4,310869	0,009105
SNC 02	AST 2	4,661345	0,154183
SNC 08	AST 2	1,533947	0,012414
SNC 220	AST 2	6,220833	0,614654
SNC 250	AST 2	1,73416	0,022763
SNC 482	AST 2	0,835816	0,011934
SNC 71	AST 3	0,570581	0,079191
SNC 75	AST 3	0,224159	0,02148
SNC 169	AST 3	0,073671	0,039614
SNC 234	AST 3	1,147049	0,060717

REGISTRO	DIAGNÓSTICO	EXPRESSÃO RELATIVA AO TRANSCRITO 1	
		HJURP 2	HJURP 3
SNC 06	GBM	0,537556	0,067291
SNC 96	GBM	0,402142	0,039283
SNC 114	GBM	0,82805	0,046081
SNC 134	GBM	1,367822	0,023857
SNC 174	GBM	0,56526	0,046943
SNC 179	GBM	0,518308	0,052053
SNC 198	GBM	0,364467	0,032249

Amostras não tumorais: (SB) Substância Branca. Amostras tumorais: (AST 2) Astrocitoma de grau 2; (AST 3) Astrocitoma de grau 3; (GBM) Glioblastoma Multiforme. ND: Não Detectável.

Figura 12. Expressão relativa de cada transcrito do locus *HJURP* nos grupos de tecido cerebral não tumoral (SB) e tumores de diferentes graus (AST 2, AST3 e GBM)

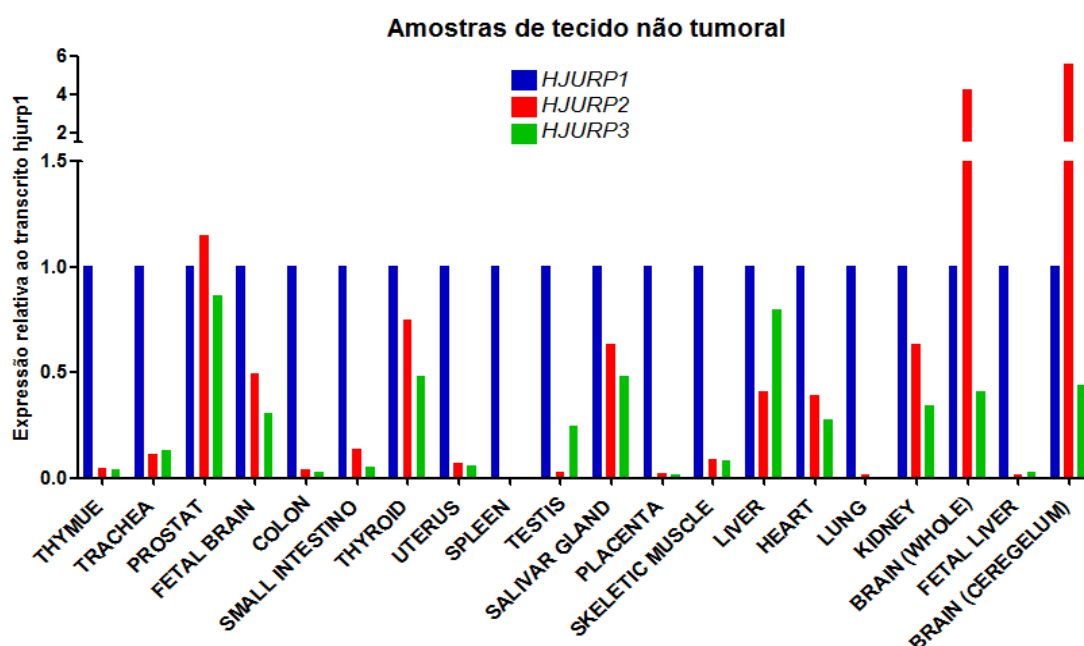


O nível de mRNA médio dos transcritos em estudo foram avaliados através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green. O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. O cálculo de expressão relativa foi feito pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e a expressão do gene *HJURP 1* foi utilizado como referência em cada amostra. A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPadPrism 5 e os testes aplicados foram One-way ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Quantificação dos diferentes transcritos do locus *HJURP* em diferentes tecidos não tumorais

Para consolidar os dados observados para o grupo de amostra de tecido não tumoral (SB), avaliamos o perfil de expressão dos transcritos de *HJURP* em um painel de 20 amostras de diferentes tecidos não tumorais (*Human Total RNA Master Panel II – Clontech* (Figura 13). O perfil de expressão dos transcritos de *HJURP* varia de acordo com o tecido analisado, porém a expressão dos transcritos 2 e 3 se mostra elevada em várias amostras. Além disso, observamos que o transcrito 2 é o mais abundante nas amostras de tecido prostático e cerebral (4-6x maior que a expressão do transcrito 1) (Figura 13), de acordo com os resultados observados para o grupo substância branca (Figura 12). Esses dados sugerem que o transcrito 2 deva apresentar função majoritária nesses tecidos.

Figura 13. Expressão relativa dos transcritos *HJURP2* e *HJURP3* em diferentes amostras de tecido não tumoral em relação a expressão do transcrito *HJURP1*



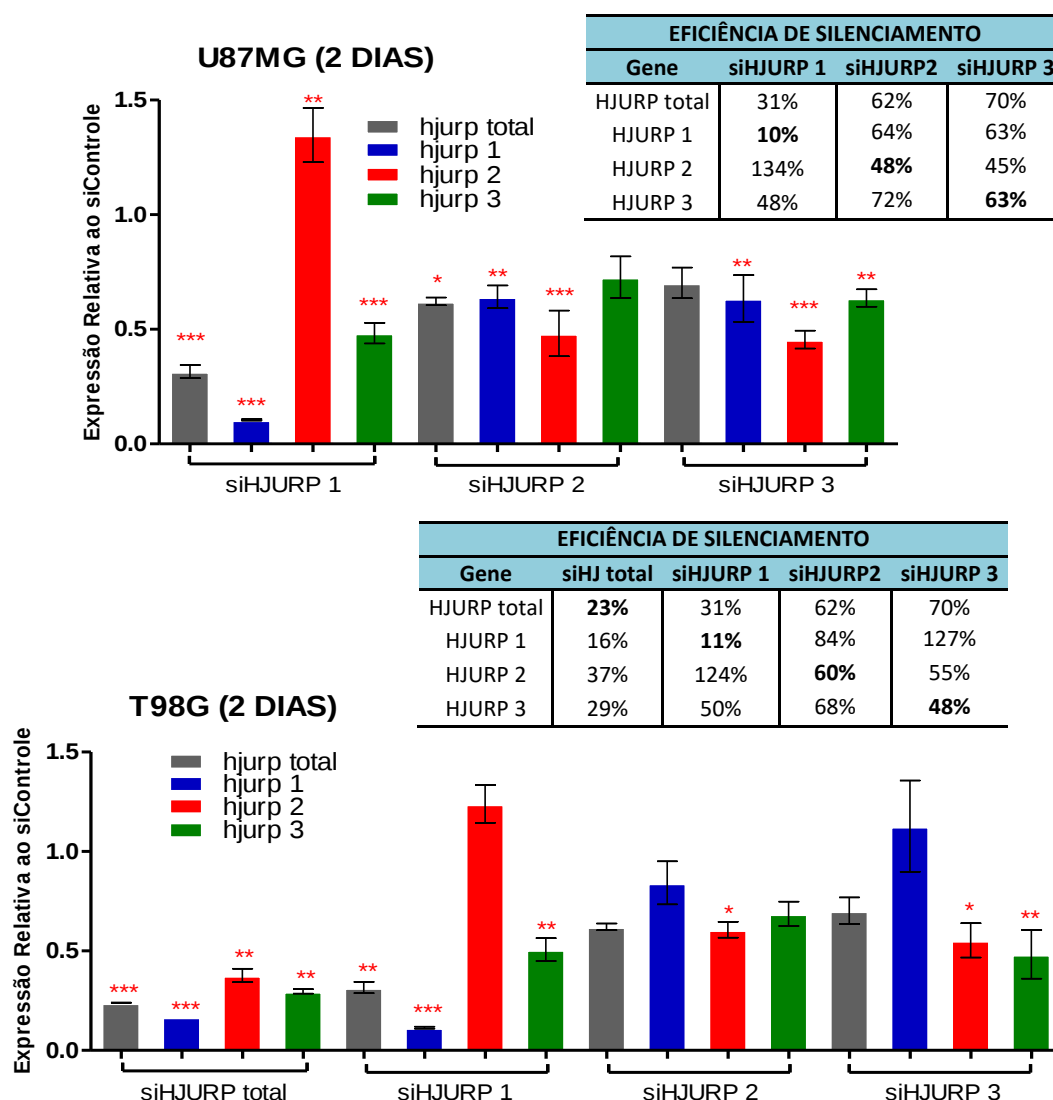
O nível de mRNA dos transcritos em estudo foram avaliados através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green, com kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems). O gene *HPRT* foi utilizado como controle de expressão constitutiva. O cálculo de expressão relativa foi feito pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sendo que a expressão do transcrito *hjurp1* foi utilizada como normalizador em cada amostra. A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPadPrism 5 e os testes aplicados foram One-way ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$. # amostras com expressão superestimada para o transcrito 1.

Silenciamento dirigido aos difrentestranscritos do locus HJURP

Com objetivo de avaliar o impacto da supressão específica de cada transcrito, realizamos tentativas de silenciamento de cada um deles nas linhagens U87MG e T98G, através da transfecção com siRNAs dirigidos para pontos de junção éxon-éxon exclusivos. Para normalizar os dados encontrados utilizamos uma sequência aleatória (siControle). Após 48 horas de transfecção, percebemos que o siHJURP-1 foi eficiente e seletivo ao transcrito 1, reduzindo a expressão deste gene para aproximadamente 10% nas linhagens U87MG e T98G. Os oligonucleotídeos direcionados aos transcritos 2 e 3 foram testados em concentrações de 10mM e 50mM, porém não apresentaram eficiência e seletividade satisfatória. Estas sequências também afetaram a expressão dos demais transcritos de HJURP (Figura 14). Sendo assim, apenas o siHJURP-1 foi selecionado para os experimentos seguintes.

Conforme visto anteriormente, o transcrito 1 compõe aproximadamente 80% da expressão de de HJURP nas linhagens de GBM (Figura 8). Quando utilizamos o siHJURP-1 nas linhagens U87MG e T98G, também observamos uma queda na expressão total dos transcritos de HJURP para 30% (Figura 14), o que é esperado devido aos altos níveis do transcrito 1 nestas linhagens (Figura 8). Interessante, a supressão do transcrito 1 induziu a expressão do transcrito 2 para 120-130% de seus níveis originais (Figura 14). Supostamente, a ausência do transcrito 1 parece gerar um “efeito compensatório”, aumentando a expressão do transcrito 2 em ambas linhagens.

Figura 14. Silenciamento dirigido aos transcritos *HJURP1*, *HJURP2* e *HJURP3* através da transfecção com siRNAs

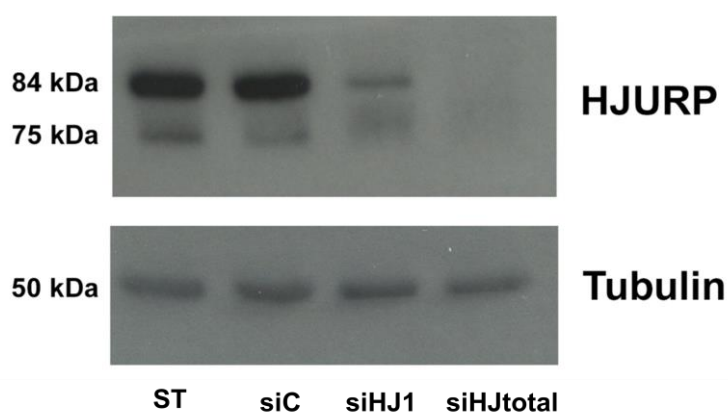


O nível de mRNA dos transcritos em estudo foram avaliados através de PCR em tempo real utilizando-se o sistema baseado no fluorocromo SYBR Green, com kit "Power SYBR Green Master Mix" (Applied Biosystems). As linhagens U87MG e T98G foram transfectadas com oligonucleotídeos de sequência aleatória (siControle – 10uM), dirigidos a proteína HJURP total (10uM), dirigidos ao transcrito hjurp1 (10uM), dirigidos ao transcrito hjurp2 (50uM) e hjurp3 (50uM). O gene HPRT foi utilizado como controle de expressão constitutiva. O cálculo de expressão relativa foi feito pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sendo que a expressão dos transcritos no grupo silenciamento controle como normalizador em cada amostra. A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPadPrism 5 e os testes aplicados foram One-way ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$. # amostras com expressão superestimada para o transcrito 1.

Além da análise a nível de RNA mensageiro, avaliamos o impacto do silenciamento dirigido ao transcrito HJURP1 a nível protéico. O tratamento direcionado ao silenciamento da proteína total faz com que a proteína não seja mais

detectada. Porém, após o silenciamento dirigido ao transcrito 1, notamos a presença de duas bandas condizentes as formadas na ausência de transfecção e no silenciamento controle. Conjuntamente, esses dados sugerem que o silenciamento dirigido ao transcrito 1 reduz a expressão da isoforma 1, possivelmente não afetando a expressão das isoformas 2 e 3 no período avaliado.

Figura 15. Silenciamento dirigido a isoforma HJURP1 através da transfecção com siRNA



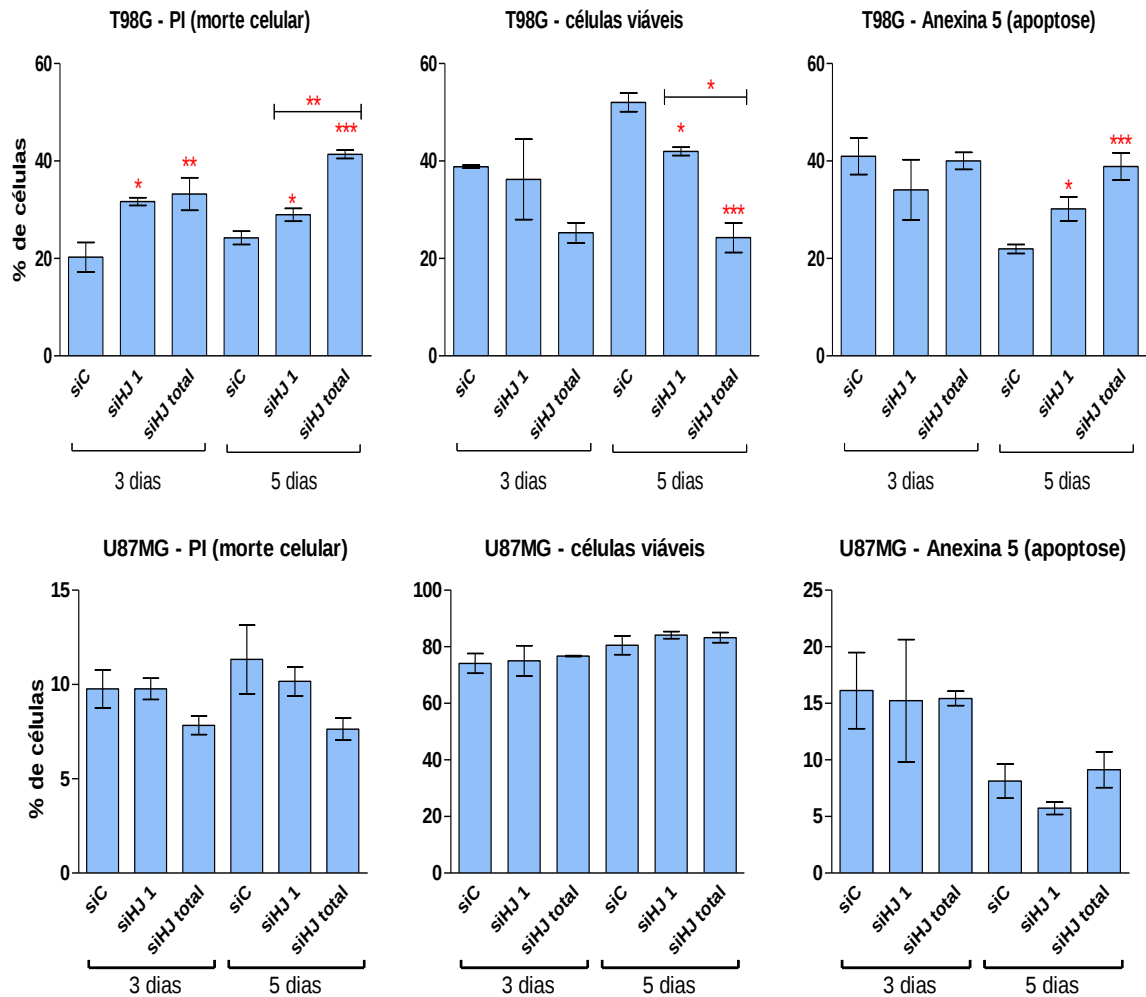
As células foram tratadas com 10uM de siControle, siHJURP Isoform 1 e siHURP total. A cultura foi cultivada e lisada após 2 dias da transfecção. O lisado foi aplicado em gel SDS-PAGE e feito western blot.

Quantificação de apoptose e morte celular efetiva após o silenciamento dirigido ao transcrito HJURP1

Após a confirmação da eficiência no silenciamento dirigido ao transcrito HJURP1 (Figura 14), avançamos para a avaliação da apoptose/viabilidade celular nas linhagens U87MG e T98G, após 3 e 5 dias da transfecção com os siRNAs. As células T98G apresentaram um significativo aumento de morte celular na presença do siHJURP-1, assim como para o siHJURP-total (Figura 16), como já observado anteriormente (VALENTE V. *et al*, 2013). Entretanto, depois de 5 dias da transfecção, observa-se claramente que a indução de apoptose e morte celular efetiva é bem mais branda no silenciamento específico da isoforma 1, quando comparado ao silenciamento da proteína total (Figura 16). Esses dados revelam que a sustentação de expressão das isoformas 2 e 3 é capaz de reverter parcialmente o fenótipo gerado pelo silenciamento de HJURP total, demonstrando que as isoformas

2 e 3 podem atuar na manutenção da viabilidade das células T98G. O silenciamento específico de HJURP1 não mostrou diferenças significativas do silenciamento de HJURP total na ativação de apoptose/morte celular efetiva para as células U87MG.

Figura 16. Níveis de morte celular efetiva e apoptose das células T98G após silenciamento da proteína HJURP1 e HJURP total

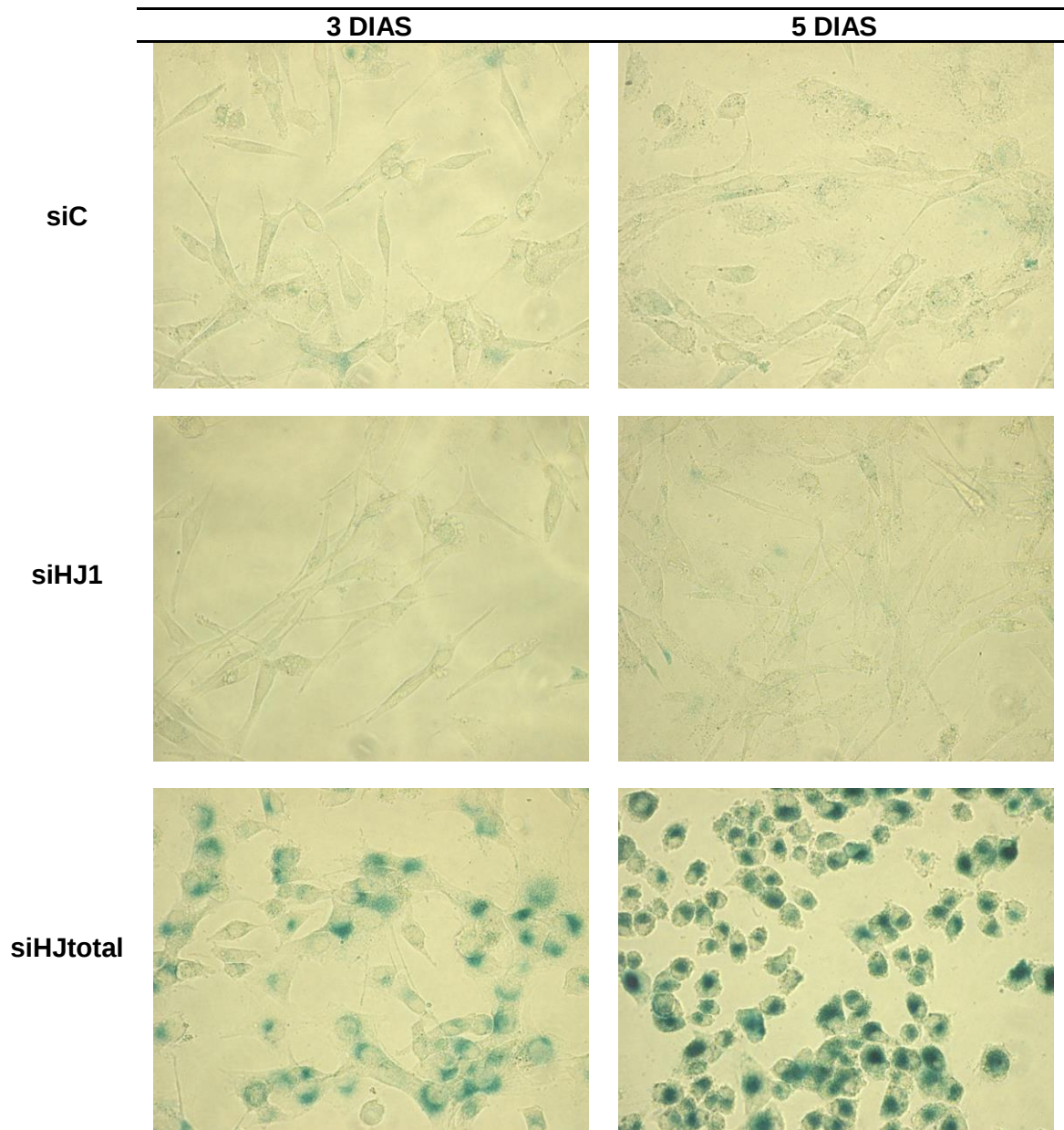


As células foram tratadas com 10uM de oligonucleotídeos. Tiveram 3 e 5 dias para recuperação, foram tripsinizadas e ressuspensas em tampão de ligação de anexina. Em seguida, anexina V foi adicionado e incubado por 15 minutos a 25°C no escuro. Por fim, iodeto de propídio foi adicionado e análise feita por citometria de fluxo (FACSCanto, BD®). Os níveis encontrados para siHJ1 e siHJtotal foram normalizados pelo grupo siC em cada dia. Para a linhagem T98G, também foram comparados os níveis encontrados para siHJ1 e siHJtotal para cada dia. A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPadPrism 5 e os testes aplicados foram One-way ANOVA seguido de Dunnett's Multiple Comparison Test: * p < 0,05, ** p < 0,001 e *** p < 0,0001. siC: silenciamento controle; siHJ1: silenciamento HJURP1; siHJtotal: silenciamento HJURP total.

Senescência celular na ausência de HJURP

Outro aspecto relevante da função de HJURP já descrito na literatura é o seu envolvimento na ativação senescência em células HDF, HUVEC e U87MG (HEO *et al.*, 2013; VALENTE *et al.*, 2013). Avaliamos o perfil de ativação de senescência da linhagem U87MG após 3 e 5 dias do silenciamento dirigido ao transcrito 1 (siHJURP-1) ou aHJURP total (siHJURP-total). Observamos que as células U87MG, com silenciamento de HJURP total, apresentam ativação de senescência a partir do terceiro dia pós-transfecção, culminando com uma massiva quantidade de células senescentes no quinto dia pós-silenciamento. Porém, o silenciamento dirigido para o transcrito HJURP 1 não apresentou incremento na quantidade de células senescentes em relação ao silenciamento controle (Figura 17), demonstrando que nestas células o silenciamento da isoforma 1 somente parece não trazer impacto no período avaliado. Esses dados reforçam a existência e atividade dos transcritos 2 e 3 de HJURP, que possivelmente auxiliam na manutenção da viabilidade das células U87MG na ausência da isoforma HJURP1.

Figura 17. A manutenção da expressão das isoformas HJURP2 e HJURP3 impede a ativação de senescência em células U87MG



Células U87MGtransfectadas com 10 μ M desiControle, siHJURP1 ou siHJURP foram processadas para o ensaio de β -galactosidase no terceiro e quinto dia após a transfecção. As imagens foram capturadas em microscópio de contraste de fase (NIKON Eclipse TS100).siC: silenciamento controle; siHJ1: silenciamento HJURP1; siHJtotal: silenciamento HJURP total.

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que os três transcritos do locus HJURP são de fato expressos e apresentam maiores níveis nas linhagens celulares de GBM quando comparados aos astrócitos não tumorais. O aumento na expressão dos diferentes mRNAs de HJURP é similar em cada linhagem tumoral, embora o transcrito HJURP1 seja bem mais abundante do que os outros dois. A linhagem T98G se destacou na superexpressão (8 a 10 vezes o observado nas células controle) dos três mensageiros expressos pelo locus HJURP. Estes dados estão de acordo com resultados anteriores de nosso grupo, onde observamos maiores quantidades de mRNA e proteína HJURP total nestas células (VALENTE V *et al.*, 2013).

Assim como nas linhagens, os tecidos tumorais de pacientes (AST 2, AST3 e GBM) apresentaram maior expressão dos transcritos de HJURP quando comparados ao grupo controle não tumoral (SB). Porém, claramente as isoformas 1 e 3 se destacam quanto ao incremento na superexpressão, apresentado cerca de 25 (HJURP1) e 40 (HJURP3) vezes os níveis observados no grupo SB. Além disso, a isoforma 3 mostra um aumento progressivo que correlaciona-se com a malignidade dos tumores, sendo que os maiores níveis são encontrados nas amostras de GBM. Curiosamente, analisando isoladamente cada amostra, o transcrito 2 apresenta maiores níveis nos grupos não tumoral (SB) e astrocitoma de baixo grau (AST2), quando comparado com a expressão do transcrito 1. Já nos grupos de AST3 e GBM, o transcrito 1 se mostra mais abundante. A análise do painel de amostras de diferentes tecidos normais revelou resultado heterogêneo quanto a expressão dos transcritos de HJURP. As amostras de tecido prostático e cerebral do painel mostraram padrão semelhante ao observado para substância branca, onde o transcrito 2 é o predominante.

De forma geral, a expressão global de HJURP é inferior tanto em linhagens quanto em tecidos não tumorais. Além disso, a expressão do transcrito HJURP2 se destaca nos tecidos não tumorais, enquanto o transcrito HJURP1 predomina em linhagens de diferentes tipos tumorais e em astrocitomas de alto grau. Esses dados sugerem que, durante a progressão tumoral dos astrocitomas, a alta expressão do transcrito 2 é gradativamente sobreposta por um grande incremento na expressão do transcrito 1, o que parece ser fundamental para a alta atividade proliferativa das

células tumorais. Além disso, observamos que a ausência do transcrito 1 não afeta tão drasticamente a viabilidade celular e a promoção de senescência, quando comparado ao silenciamento de HJURP total. Desta forma, podemos concluir que o produto dos transcritos 2 e 3 de HJURP são ativos e apresentam importante função na manutenção da viabilidade celular de linhagens de GBM.

REFERÊNCIAS*

1. ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010.
2. BARNHART, M. C.; KUICH, P. H. J. L.; STELLFOX, M. E. *et al.* HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. **The Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 2, p. 229-243, 18 jul 2011.
3. BEHIN, A.; HOANG-XUAN, K.; CARPENTIER, A. F.; DELATTRE, J.-Y. Primary brain tumours in adults. **Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 323-31, 25 jan 2003.
4. DAVID N. L.; PERRY, A.; REIFENBERGER, A. *et al.*, - The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **ActaNeuropathologica**, v.131, p. 803–820, 2016. DOI 10.1007/s00401-016-1545-1, fev 2016.
5. FALK, S.J., *et al.*, CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere. **Science** v.348, p.699-703, 2015.
6. FILIPESCU, D., *et al.*, Essential role for centromeric factors following p53 loss and oncogenic transformation. **Genes & Development**, v.31, p.1-18, 2017.
7. FOLTZ, D. R.; JANSEN, L. E. T.; BAILEY, A. O. *et al.* Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 472-84, 1 maio 2009.
8. HU, Z.; HUANG, G.; SADANANDAM, A. *et al.* The expression level of HJURP has an independent prognostic impact and predicts the sensitivity to radiotherapy in breast cancer. **Breast cancer research**, v. 12, n. 2, p. R18, jan 2010.
9. HU, B.; WANG, Q.; WANG, Y. *et al.* Holliday junction–recognizing protein promotes cell proliferation and correlates with unfavorable clinical outcome of hepatocellular carcinoma. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 2601–2607, maio 2017.
10. INCA – Instituto nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde:INCA, 2016.
11. ISHII, N. *et al.* Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. **Brain Pathology**, v.9, p.469-479, 1999.
12. JANSEN, M.; YIP, S.; LOUIS, D. N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **Lancet Neurology**, v. 9, n. 7, p. 717-26, jul 2010.

*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

13. KATO, T.; SATO, N.; HAYAMA, S. et al. Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 18, p. 8544-53, 15 set 2007.
14. MAHER, E. A; BRENNAN, C.; WEN, P. Y. et al. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11502-13, 1 dez 2006.
15. MEIR, E. G. VAN.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D. *et al.* Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166-93, 2010.
16. MULLER, S.; MONTES, R. O.; LACOSTE, N. *et al.* Phosphorylation and DNA Binding of HJURP Determine Its Centromeric Recruitment and Function in CenH3CENP-A Loading. **Cell Reports**, v.8, n.1, p. 190-193, July 10, 2014.
17. NARDI, I. K.; ZASADZIŃSKA E.; STELLFOX, M. E. *et al.* Licensing of Centromeric Chromatin Assembly through the Mis18a-Mis18b Heterotetramer". **Molecular Cell**, v. 61, n.5, p. 774–787, 2016. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.014.
18. NOUSHMEHR, H.; WEISENBERGER, D. J.; DIESFES, K. et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. **Cancer Cell**, v. 17, n. 5, p. 510-522, 18 mai 2010.
19. SERAFIM R. B. **Investigação do papel de HJURP (HollidayJunctionRecognizing Protein) na resistência de células de glioblastoma multiforme à radiação ionizante.** 2014. 47f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicada a farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2014.
20. SUBRAMANIAN L, MEDINA-PRITCHARD B, BARTON R, et al. Centromere localization and function of Mis18 requires Yippee-like domain-mediated oligomerization.**EMBO Reports**. v.17, n.4, p. 496-507, 2016. doi:10.15252/embr.201541520. Abril 2016.
21. STANKOVIC et al., A Dual Inhibitory Mechanism Sufficient to Maintain Cell-Cycle-Restricted CENP-A Assembly; **Molecular Cell**, v. 65, p.231-246, Janeiro, 2017.
22. VERHAAK, R. G. ROEL.; HOAL, A. K.; PURDOM, E. *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, p. 98–110, January 19, 2010.
23. VALENTE, V.; SERAFIM, R. B.; DE OLIVEIRA, L. C.; ADORNI, F. S. et al. Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) levels is correlated with glioblastoma cells survival. **PLOS One**, v.8, n.4, e62200. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062200>. 25 abr 2013.

24. VALENTE, V.; TEIXEIRA, S. A; NEDER, L. et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, p. 17, jan 2009.
25. WANG, J., et al., Mitotic Regulator Mis18B interacts with and specifies the centromeric assembly of molecular chaperone holliday junction recognition protein (HJURP). **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 8326-8336, 2014.
26. ZASADZINSKA, E. et al., Dimerization of the CCENP-A assembly factor HJURP is required for centromeric nucleosome deposition., **EMBO Journal**, v.32, p. 2113-2124., 2013.