



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

RENATA BARBOSA VAHIA DE ABREU

Aminoglicosídeos como Agentes de Restauração de Mutações Inativadoras no Gene
BRCA1

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho

RIO DE JANEIRO
2013



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-graduação em Oncologia

RENATA BARBOSA VAHIA DE ABREU

Aminoglicosídeos como Agentes de Restauração de Mutações Inativadoras no Gene
BRCA1

Dissertação apresentada ao Instituto
Nacional de Câncer, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Oncologia.

Orientador: Marcelo Alex de Carvalho.

RIO DE JANEIRO
2013



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-graduação em Oncologia

RENATA BARBOSA VAHIA DE ABREU

AMINOGLICOSÍDEOS COMO AGENTES DE RESTAURAÇÃO DE MUTAÇÕES
INATIVADORAS DO GENE *BRCA1*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho

Aprovada em: 13 de maio de 2013.

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Turán P. Urményi – IBCCF/UFRJ

Prof. Dr. Miguel Ângelo. M. Moreira – Genética/INCA

Prof. Dr. Fernando Regla Vargas – Genética/INCA

Prof. Dr. Claudio Gustavo Stefanoff – Serv. Pesquisa Clínica/BNT (Suplente)

Prof. Dr. José Marques de Brito Neto – ICB/UFRJ (Suplente)

RIO DE JANEIRO

2013

A162a Abreu, Renata Vahia de.
Aminoglicosídeos como agentes de restauração de mutações
inativadoras no gene BRCA1./ Renata Barbosa Vahia de Abreu.-
Rio de Janeiro: INCA,2013.
xxv.; 98fl.; il..

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-
Graduação em Oncologia - Instituto Nacional de Câncer José
Gomes da Silva, 2013.

Orientador: Marcelo Alex de Carvalho.

1. Neoplasias Mamárias. 2. Aminoglicosídeos. 3. Códon de
Parada Prematura. I. Carvalho, Marcelo Alex de (orient.). II.
Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III.
Título.

CDD 616.99449

“A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre.”

Louis Dearborn L'Amour

AGRADECIMENTOS

Existem poucas oportunidades de agradecer publicamente às pessoas que nos ajudam no dia-a-dia e nos momentos de dificuldade. Gostaria de agradecer a todos os que tanto me ajudaram, e a eles dedicar esse trabalho.

Agradeço ao meu orientador pelos seus ensinamentos técnicos, pelos conselhos pra vida, pela atenção e, principalmente, pela paciência extrema com “o material humano com o qual ele trabalha”. Mais que tudo, obrigada por acreditar em mim, por me ensinar a “fazer ciência” e por me incentivar a querer sempre fazer melhor.

À todos os companheiros do grupo de pesquisa, Renato, João, Giuliana, Vanessa, Thales e Amanda. Obrigada pela ajuda na bancada, pela convivência agradável de cada dia e por me suportar conversando com as minhas células.

Ao prof. Dr. Guilherme Suarez-Kurtz, por seus ensinamentos e contribuições científicas que ajudaram tanto a enriquecer esse trabalho quanto a minha formação profissional, e por ceder o espaço e equipamentos do laboratório da Farmacologia/CPq-INCA para que eu pudesse desenvolver este projeto.

À todos os amigos e companheiros da Farmacologia: Vera, Mateus, Cyntia, Diogo, Marcelo Sobral, Daniela, Vanessa Índio e Ivone. Obrigada pela companhia agradável, pelos momentos de descontração, papos-cabeça e suporte.

Aos colegas da Pesquisa Clínica, Amanda, Daniela, Hayna, Joyce, Natália, Verônica, e Viviane. Obrigada pela torcida, incentivo, boa vontade e pelos inúmeros momentos de descontração e gargalhadas.

Ao prof. Dr. Martin Bonamino e seu aluno Douglas Rodrigues, pela disponibilidade e pelo auxílio na confecção das partículas virais e transduções.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de análise desse trabalho, enriquecendo-o com críticas e sugestões.

Este trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), do Instituto Nacional do Câncer (INCA), do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) e da Fundação do Câncer – Programa de Oncobiologia.

RESUMO

As mutações em *BRCA1* são responsáveis pela maioria dos casos de câncer da síndrome hereditária de câncer de mama e ovário (SHCMO). As mutações sem sentido são caracterizadas pelo aparecimento de um códon de parada prematura que dá origem a uma proteína truncada. Essas variantes representam ~12% das mutações no gene *BRCA1* e seus portadores são mais propensos a desenvolverem câncer de mama e ovário. Para esses indivíduos pouco pode ser feito para uma significativa redução do risco de câncer além de rotinas periódicas de monitoramento e cirurgias profiláticas. A supressão do códon de parada prematura potencialmente restauraria a função da proteína. Diversos estudos demonstraram que os aminoglicosídeos são capazes de induzir transleitura de códons de parada prematura, gerando, em alguma extensão, proteínas com sua função biológica restaurada. Devido à carência de alternativas para o tratamento de SHCMO, o uso de aminoglicosídeos pode representar uma importante estratégia na prevenção do câncer hereditário de mama e ovário associado a mutações sem sentido. Esse estudo se propôs a avaliar o uso de aminoglicosídeos como agentes de restauração de variantes sem sentido do gene *BRCA1*. Para tal, foram selecionadas variantes naturais de *BRCA1* que apresentam códon de parada prematura. Os variantes foram gerados por rotinas de mutagênese sítio-dirigida e clonados no vetor retroviral pQCXIH, em fusão com EGFP ou GAL4DBD. Linhagens de células humanas (células HeLa) foram desenvolvidas de forma a expressarem estávelmente essas construções. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados para diferentes aminoglicosídeos (G418, gentamicina, higromicina B e puromicina) em células da linhagem HeLa. Os resultados sugerem que todos os aminoglicosídeos avaliados possuem toxicidade limitada em células HeLa, permitindo o uso de concentrações apropriadas nos ensaios de transleitura *in vitro*. Os níveis proteicos de *BRCA1:EGFP* foram avaliados em células humanas estáveis tratadas ou não com G418 por (a) microscopia confocal, (b) citometria de fluxo e (c) *western blotting* e imunodeteção. A restauração dos níveis proteicos foi observada 48 horas após o tratamento com G418 por microscopia confocal e citometria de fluxo. No entanto, não foi possível identificar a presença da proteína quimérica por *western blotting* e imunodeteção, provavelmente devido ao limite de sensibilidade da técnica. Esses dados sugerem que o fármaco G418 é capaz de restabelecer a síntese da proteína cadeia completa de variantes sem sentido de *BRCA1*. Ensaios de ativação transcricional serão conduzidos utilizando as construções GAL4:*BRCA1* para avaliar a restauração funcional da proteína e validar os dados previamente obtidos nesse modelo. No geral, esse é o primeiro estudo que avalia a transleitura de variantes de *BRCA1* com códon de parada prematura; um gene de relevância clínica para o câncer de mama e ovário.

Palavras-chave: *BRCA1*, câncer de mama, transleitura, aminoglicosídeos, códon de parada prematura.

ABSTRACT

Mutations in *BRCA1* are responsible for most cases of hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC). Nonsense variants are characterized by a premature stop codon that leads to an inactive truncated protein. These variants account for ~ 12% of germ line mutations in the *BRCA1* gene and the carriers are highly prone to develop breast and ovarian cancer. For these individuals little can be done to a significant reduction in the cancer risk besides periodic monitoring routine and prophylactic surgeries. The suppression of a premature stop codon potentially restores the function of the protein. Different studies have shown that aminoglycosides induce premature stop codons readthrough and, at least in part, bring forth proteins with restored biological function. Given the lack of alternatives to HBOC treatment, the use of aminoglycosides may represent an important strategy for the prevention of hereditary breast and ovarian cancer associated with nonsense mutations. Our study intends to evaluate the use of aminoglycosides on the restoration of nonsense variants of the *BRCA1* gene. Therefore, naturally occurring *BRCA1* variants encoding different premature stop codons were selected for the study. They were generated by site-directed mutagenesis and cloned into pQCXIH, a retroviral vector, as a fusion with EGFP or GAL4DBD. Human cell lines (HeLa cells) stably expressing these constructs were developed. Cytotoxicity assays for different aminoglycosides (G418, gentamicin, hygromycin B and puromycin) were performed in HeLa cells. Our findings suggest that all aminoglycosides assayed show limited toxicity, allowing proper concentrations for *in vitro* readthrough assays. Thus, BRCA1:EGFP protein levels were evaluated on G418 treated and non-treated human stably expressing cells by: (a) confocal microscopy, (b) flow cytometry and (c) immunoblotting. Protein restoration was observed after 48h G418 treatment by both microscopy and flow cytometry analysis. However, we were not able to detect protein restoration by immunoblotting, probably due to the limited sensitivity. These data suggest that G418 can restore full-length protein synthesis in human cells encoding *BRCA1* nonsense variants. Transcription activation assays will be performed using the GAL4:BRCA1 pQCXIH constructs to assess protein functional restoration and validate this approach. Overall, this is the first study that evaluates the readthrough of premature stop codon variants with clinical relevance in the breast and ovarian cancer predisposing gene *BRCA1*.

Keywords: *BRCA1*, breast cancer, readthrough, aminoglycosides, premature stop codon.

LISTA DE QUADROS

Quadro I: Iniciadores utilizados na geração das construções.	25
Quadro II: Reagentes para a transfecção por fosfato de cálcio.....	35
Quadro III: Variantes naturais selecionados para o estudo.	40
Quadro IV: Linhagens desenvolvidas para o estudo.	41
Quadro V: Variantes de BRCA1 selecionados para o estudo e suas substituições após a transleitura.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2012 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma	2
Figura 1.2: Diagrama da estrutura proteica de BRCA1 e seus domínios	7
Figura 1.3: Representação esquemática do comportamento de transativação transcricional da região C-terminal de BRCA1 (vermelho) quando fusionado ao DBD (amarelo)	10
Figura 1.4: Representação gráfica da frequência dos diversos polimorfismos encontrados ao longo da região codificante de <i>BRCA1</i>	12
Figura 1.5: Estrutura dos aminoglicosídeos	16
Figura 1.6: Interação entre os aminoglicosídeos e a hélice 44 do rRNA 16S	17
Figura 1.7: Comparação dos centros de decodificação de <i>Escherichia coli</i> (16S rRNA) e humanos (18S rRNA)	18
Figura 1.8: Representação esquemática da indução de transleitura por aminoglicosídeos	19
Figura 3.1: Mapa do plasmídeo pCDNA3 – BRCA1 ^{éxon13-24} previamente gerado pelo grupo (Carvalho <i>et al.</i> , 2007)	26
Figura 3.2: Modelo esquemático da mutagênese sítio dirigida por sobreposição de fragmentos	28
Figura 3.3: Representação das construções em pCR [®] 2.1 – TOPO [®]	30
Figura 3.4: Representação das construções em pQCXIH	32
Figura 4.1: Representação esquemática do modelo de expressão BRCA1:EGFP ..	42
Figura 4.2: Sensibilidade à G418 da linhagem celular HeLa	44
Figura 4.3: Sensibilidade à gentamicina da linhagem celular HeLa	45
Figura 4.4: Sensibilidade à higromicina B da linhagem celular HeLa	47
Figura 4.5: Sensibilidade à puromicina da linhagem celular HeLa	48
Figura 4.6: Análise dos níveis proteicos por <i>western blotting</i> e imunodeteção para observação da proteína de fusão BRCA1:EGFP e EGFP nas linhagens celulares do estudo	49
Figura 4.7: Análise de transleitura por microscopia confocal	51
Figura 4.8: Análise de transleitura por microscopia confocal	52
Figura 4.9: Análise de transleitura por microscopia confocal	53
Figura 4.10: Indução de transleitura por G418 em diferentes linhagens	55
Figura 4.11: Indução de transleitura por G418 em diferentes linhagens	56

Figura 4.12: Análise da indução de transleitura após tratamento com G418 por <i>western blotting</i> e imunodeteccção	57
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS

°C – graus Celsius

aa – aminoácido (s)

AD1 – *Activation Domain 1*

AD2 – *Activation Domain 2*

ATM – *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATR – *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*

BARD1 – *BRCA1-associated RING Domain Protein 1*

BIC – *Breast Cancer Information Core*

BRCA1 – *Breast Cancer Susceptibility Gene 1*

BRCA2 – *Breast Cancer Susceptibility Gene 2*

BRCT – *BRCA1 C-terminal*

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CFTR – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

CtIP – *C-terminal Binding Protein (CtBP) Interacting Protein*

DBD – *DNA Binding Domain*

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiamina tetraacético

EJC – *Exon-exon junction complex*, complexo de junção éxon-éxon

g – gravidade ($g = 9,8 \text{ cm/s}^2$)

GTE – solução de glicose/ Tris/ EDTA

GWAS – *Genome Wide Association Studies*

H₂O – água

HCl – ácido clorídrico

HER2 – *Tyrosine kinase-type cell surface receptor*

HR – *Homologous recombination pathway*, via de recombinação homóloga

IgG – imunoglobulina G

kb – quilobases

KOH – hidróxido de potássio

Kda – quilodalton

kV – quilovolts

LB – Luria-Bertani

M – molar

mL – mililitro

mM – milimolar
Na₂PO₄ – fosfato dissódico
NaCl – cloreto de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
NHEJ – *Non-homologous end joining pathway*, via de junção de pontas não homólogas
NLS – *Nuclear Localization Signal*, sinal de localização nuclear
nm – nanômetros
NMD – *Nonsense-Mediated Decay pathway*
p/v – peso por volume
PALB2 - *Partner and localizer of BRCA2*
PBS – tampão fosfato-salino
pH – potencial hidrogeniônico
RING – *Real Interesting New Gene* (domínio protéico)
RNA – ácido ribonucleico
RNAm – RNA mensageiro
RNAr – RNA ribossomal
S – Fase de síntese do ciclo celular
SFB – Soro Fetal Bovino
SDS – dodecil sulfato de sódio
TP53 – *Tumor Protein p53*
UPF (1, 2 ou 3) – *Up-frameshift proteins*
UTR – *Untranslated region*
v/v – volume por volume
 α – alfa
 β – beta
 μ g – micrograma
 μ L – microlitro
 μ m – micrômetros

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	I
1.1 - CÂNCER.....	1
1.2 - CÂNCER DE MAMA	2
1.3 - BRCA1.....	4
1.3.1 - O gene.....	4
1.3.2 - A estrutura proteica	5
1.3.3 - A função de BRCA1.....	8
1.3.4 – Os domínios BRCT	8
1.3.5 – Variantes do gene <i>BRCA1</i>	10
1.4 – TRANSLEITURA DE CÓDONS DE PARADA PREMATURA	13
1.4.1 – Mutações sem sentido	13
1.4.2 – Aminoglicosídeos.....	15
1.4.3 – Transleitura de códon de parada prematura.....	19
1.4.4 – Transleitura na clínica médica	20
1.4.5 – Novos fármacos	21
2 – OBJETIVOS.....	23
2.1 – OBJETIVOS GERAIS	23
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 – IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS VARIANTES PARA ESTUDO.....	24
3.2 – GERAÇÃO DE CONSTRUÇÕES	24
3.2.1 – Mutagênese	24
3.2.2 – Clonagem no vetor pCR®2.1-TOPO®.....	29
3.2.3 – Subclonagem no vetor retroviral pQCXIH.....	30
3.3 – INDUÇÃO DE ELETROCOMPETÊNCIA, TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E EXTRAÇÃO PLASMIDIAL	32
3.4 – SEQUENCIAMENTO	33
3.5 – CULTURA DE CÉLULAS.....	33
3.6 – ENSAIOS DE TOXICIDADE CELULAR	34
3.7 – TRANSDUÇÕES.....	34
3.7.1 – Preparação dos retrovírus	35
3.7.2 – Infecção e estabilização das linhagens celulares	36
3.8 – ENSAIOS DE TRANSLEITURA	36

3.8.1 – Microscopia confocal	36
3.8.2 – Citometria de fluxo	37
3.8.3 – Avaliação dos níveis proteicos	37
3.8.3.1 – Extração de proteínas.....	37
3.8.3.2 – <i>Western blotting</i> e imunodeteção	37
3.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1 – GERAÇÃO DOS VARIANTES SEM SENTIDO DE <i>BRCA1</i>	39
4.2 – ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	42
4.3 – CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS PROTEICOS.....	49
4.4 – ENSAIOS PARA INDUÇÃO DE TRANSLEITURA.....	49
4.4.1 – Microscopia confocal	50
4.3.2 – Citometria de fluxo	54
4.3.3 – <i>Western blotting</i> e imunodeteção.....	57
5 – DISCUSSÃO	58
6 - CONCLUSÕES.....	69
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - CÂNCER

Câncer é um termo empregado, há muitos séculos, para designar um conjunto de mais de 100 desordens, incluindo tumores malignos de diferentes localizações. Essas doenças são caracterizadas pela perda do controle do ciclo celular, levando a um crescimento desordenado e invasão de outros tecidos (<http://www.inca.gov.br/>).

Por ser uma desordem genética, o câncer pode ter como origem fatores esporádicos ou hereditários. Os casos associados a fatores esporádicos podem ser desencadeados por exposição a fatores ambientais, tais como: tabagismo, hábitos alimentares, sedentarismo, obesidade, agentes mutagênicos, doenças infecciosas e disfunções imunológicas (<http://www.cancer.org/>). Nos casos hereditários, além da participação dos fatores ambientais, é possível correlacionar o surgimento do tumor com uma mutação em um gene importante para a progressão da tumorigênese.

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, transformando-se em um evidente problema de saúde pública mundial. Segundo Organização Mundial de Saúde (OMS), podem ser esperados para o ano de 2030 cerca de 27 milhões de novos casos de câncer com 17 milhões de mortes, e 75 milhões de pessoas vivas com câncer (INCA, 2011).

De acordo com o relatório da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o impacto global do câncer mais que dobrou nos últimos trinta anos. No ano de 2008, o câncer foi responsável por 7,8 milhões de mortes no mundo, representando cerca de 13% dos casos totais de morte previstos para o mesmo ano (IARC, 2008). O crescimento populacional, bem como o aumento da expectativa de vida, continua a afetar de forma significativa o impacto do câncer na população mundial.

No Brasil estima-se que cerca de 385 mil novos casos de câncer tenham sido diagnosticados no ano de 2012, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2011). Segundo as projeções feitas pelo Instituto Nacional de Câncer, os quatro tumores mais incidentes para o sexo masculino serão o câncer de próstata (60 mil), pulmão (17 mil), cólon e reto (14 mil) e estômago (13 mil). Para o sexo feminino, destacam-se os tumores de mama (53 mil), colo de útero (18 mil),

cólon e reto (16 mil) e glândula tireoide (11 mil) como os quatro tipos tumorais mais incidentes (Fig. 1.1).

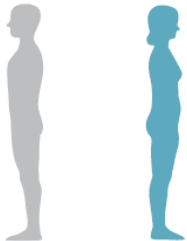
Localização primária	casos novos	percentual	Homens	Mulheres	Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%			Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

Figura 1.1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2012 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma. Adaptado de INCA, 2011.

1.2 - CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a segunda neoplasia mais frequente na população mundial e a primeira entre as mulheres. Segundo dados da *American Cancer Society*, somente nos Estados Unidos, aproximadamente 290.000 novos casos de câncer de mama terão sido diagnosticados no ano 2012 e até 39.510 pessoas terão sido vítimas fatais dessa doença (<http://www.cancer.org/>). As estimativas para o Brasil apontam que aproximadamente 52.680 novos casos terão sido descritos para o mesmo ano em todo território nacional, o que indica um risco de 52 casos a cada 100 mil mulheres (52:100.000). Na Região Sudeste, o câncer de mama possui uma incidência mais representativa, com estimativa de 69 casos a cada 100 mil mulheres (69:100.000) (INCA, 2011).

Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente nas mulheres da Região Sul (65:100.000), Centro-Oeste (48:100.000) e Nordeste (32:100.000); e é a segunda neoplasia mais frequente entre as mulheres da Região Norte (19:100.000) (INCA, 2011).

A prevenção primária dessa neoplasia ainda não é totalmente possível devido ao grande número de fatores de risco e componentes genéticos envolvidos na etiologia dessa doença. O principal fator de risco para o câncer de mama é a idade. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, aumentam de forma lenta e progressiva. Outros fatores de risco bem estabelecidos

são predisposição hereditária, fatores dependentes da composição hormonal e fatores externos, como fatores ambientais compostos por agentes físicos, químicos ou biológicos capazes de causar dano ao genoma (Amendola; Vieira, 2005; Gomes; Skaba; Vieira, 2002).

As recomendações do Ministério da Saúde para a detecção precoce e diagnóstico dessa neoplasia baseiam-se no Documento de Consenso para o Controle do Câncer de Mama de 2004. Esse documento considera como principais estratégias de rastreamento o exame clínico anual das mamas para mulheres acima de 40 anos e um exame mamográfico a cada dois anos para mulheres acima de 50 anos. Para mulheres que se encontram em grupos de risco elevado, recomenda-se o exame clínico e mamografia anualmente a partir dos 35 anos (INCA, 2009).

Apesar de ser um câncer de prognóstico favorável, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade ainda são elevadas no Brasil, devido ao diagnóstico tardio da doença. A sobrevida média após cinco anos na população de países desenvolvidos tem apresentado um discreto aumento, chegando a 85%. Entretanto, nos países em desenvolvimento, a sobrevida fica em torno de 60% (INCA, 2011).

As neoplasias de mama podem ser classificadas como esporádicas ou hereditárias. De acordo com a teoria dos dois eventos (*two-hit theory*), no caso do câncer hereditário, o indivíduo heterozigoto herda um alelo inativo (mutação germinativa) e um alelo normal para um determinado gene supressor de tumor (Knudson, 1971). O aparecimento de uma mutação somática inativadora no alelo normal leva a perda dos níveis de proteína funcional, culminando no início do processo de tumorigênese. No entanto, em casos esporádicos não é possível determinar claramente uma correlação entre a herança genética e o aparecimento do tumor. Nos casos de câncer esporádico, é necessário que ocorram duas mutações somáticas inativadoras para o surgimento da tumorigênese, uma vez que o indivíduo herdou dois alelos normais.

O câncer de mama esporádico acomete mulheres depois dos 50 anos e tem como fatores de risco a menarca precoce, o uso de contraceptivo oral, a reposição hormonal, dentre outros. O tipo histológico mais comum nos casos esporádicos é o carcinoma ductal infiltrante, que representa 80% dos casos diagnosticados no mundo (<http://www.inca.gov.br/>).

Estima-se que cerca de 5 a 10% dos casos de câncer de mama sejam relacionados à predisposição hereditária associada a mutações germinativas em

genes determinantes de susceptibilidade ao câncer (Easton *et al.*, 1993; Ford *et al.*, 1998; Van Der Groep; Van Der Wall; Van Diest, 2011). Os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *TP53* e *CHK2* aparecem mutados em 6% dos indivíduos com câncer de mama hereditário (Dapic; Carvalho; Monteiro, 2005). Com auxílio de estudos de associação que englobam todo o genoma, os GWAS (*Genome Wide Association Studies*), outros genes como *ASIP*, *RALY* e *RAD51B* foram correlacionados ao aparecimento desse tipo de tumor, porém em uma parcela menor da população (Orr *et al.*, 2012; Siddiq *et al.*, 2012).

O câncer de mama hereditário com mutação em *BRCA1* tem como característica uma maior instabilidade genética o que leva a um acometimento precoce, antes dos 50, e uma maior agressividade das células tumorais (Van Der Groep; Van Der Wall; Van Diest, 2011). Uma grande parcela dos tumores associados a mutações em *BRCA1* possui pouca ou nenhuma diferenciação celular, tendem a ser aneuplóides, e a apresentar proliferação intensa (alto grau histológico em 75% dos casos). As morfologias principais são o carcinoma ductal, não específico (75%) e o carcinoma medular (10%). Os casos hereditários usualmente são classificados como tumores triplo-negativos. Esse fenótipo é de difícil tratamento devido à ausência dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2, o que limita o uso da terapia hormonal, por exemplo (Amendola; Vieira, 2005; Narod; Foulkes, 2004).

A determinação do risco de câncer de mama hereditário está se tornando cada vez mais importante devido à existência de um crescente número de opções de ações profiláticas disponíveis para pacientes e familiares como, por exemplo, o tratamento quimioterápico profilático com Tamoxifeno (Sifri; Gangadharappa; Acheson, 2004).

1.3 - BRCA1

1.3.1 - O GENE

Em 1990, Hall e colaboradores mapearam o primeiro gene determinante de predisposição para o surgimento do câncer de mama, *BRCA1* (*Breast Cancer Susceptibility Gene 1*). Anos mais tarde, um segundo gene foi mapeado, *BRCA2* (*Breast Cancer Susceptibility Gene 2*) (Wooster *et al.*, 1994). Apesar de ambos

serem genes supressores de tumor, não há homologia de sequência entre eles. BRCA1 e BRCA2 atuam em conjunto nos sistemas de reparo de dano ao DNA, interagindo através da proteína PALB2 (*Partner and Localizer of BRCA2*) (Sharan *et al.*, 1997; Vogelstein; Kinzler, 1994; Welcsh *et al.*, 2002).

O gene *BRCA1* foi originalmente descrito no braço longo do cromossomo 17 e, posteriormente, foi identificado na posição 17q21 (17q12 – q23) por meio de estratégias de clonagem posicional (Hall *et al.*, 1990; Miki *et al.*, 1994). O gene é composto por 24 éxons, dos quais 22 são codificantes, distribuídos por aproximadamente 100Kb. O gene codifica uma fosfoproteína de 1.863 aminoácidos e 220KDa, que se encontra presente na maioria dos tecidos, sendo mais abundante no testículo e no timo (Miki *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996).

1.3.2 - A ESTRUTURA PROTEICA

A análise da estrutura proteica de BRCA1 (Fig. 1.2) revela a existência de vários motivos estruturais conservados entre os diferentes ortólogos (Szabo; Worley; Monteiro, 2004). A região N-terminal da proteína encerra um domínio RING-finger (1-101 aa) que apresenta atividade ubiquitina E3 ligase. Já foi demonstrado que BRCA1 interage com BARD1 através desse domínio e esta interação potencializa a atividade E3 ubiquitina ligase de BRCA1 (Baer; Ludwig, 2002; Brzovic *et al.*, 2001; Ruffner *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1996; Wu-Baer *et al.*, 2003). Cerca de 75% do conteúdo celular de BRCA1 encontra-se complexado com BARD1, sugerindo uma função biológica importante para o heterodímero (Yu; Baer, 2000).

Estudos recentes questionam se a função E3 ubiquitina ligase seria essencial para a função supressora de tumor de BRCA1. Shakya e colaboradores (2011) demonstraram que essa atividade seria dispensável para o reparo de dano ao DNA e supressão de tumor, no entanto outro estudo demonstrou que a interação BRCA1-BARD1 é importante para evitar a tumorigênese e a letalidade embrionária, apesar de não parecer importante para o reparo do DNA via recombinação homóloga (Drost *et al.*, 2011). Mutações do tipo *missense* no domínio RING-finger, que rompem a interação entre BRCA1 e BARD1, foram identificadas em famílias com histórico de câncer de mama (Morris *et al.*, 2006).

A porção central de BRCA1 consiste de uma região pouco conservada que separa o domínio RING-finger dos domínios BRCTs (BRCA1 C-terminal). Nela há dois motivos que correspondem a sinais de localização nuclear (NLS; aa 500-508 e

609-615) e pelo menos um desses sinais (aa 500-508) é essencial para a apropriada localização nuclear da proteína (Thakur *et al.*, 1997). Uma região maior da porção central da proteína, entre os resíduos 452 e 1079, é a responsável por mediar a interação de BRCA1 com o DNA, especificamente com o DNA cruciforme (Paull *et al.*, 2001).

A presença de diversos sítios de fosforilação na região central da proteína corrobora os dados que demonstram o envolvimento de BRCA1 nos mecanismos de reparo de dano ao DNA (Ouchi, 2006). Em resposta a insultos ao DNA, diversos resíduos de serina e treonina são rapidamente fosforilados pelas quinases Aurora A, ATM, ATR, e CHK2 (Cortez *et al.*, 1999; Gatei *et al.*, 2001; McGowan, 2002; Ouchi *et al.*, 2004; Tibbetts *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). BRCA1 também é alvo de fosforilação de CDK2 durante a fase S do ciclo celular (Ruffner *et al.*, 1999).

Na região carboxi-terminal de BRCA1 foi identificado um motivo *coiled-coil* conservado entre os ortólogos, encerrado entre os resíduos 1391 a 1424 (Hu *et al.*, 2000). O domínio *coiled-coil* é crítico para a atividade transcricional da região na qual ele se encontra encerrado, AD1 (*Activation Domain 1*). Essa região também participa na interação de BRCA1 com parceiros como JunB, JunD e PALB2 (Hu; Li, 2002; Sy; Huen; Chen, 2009). É importante ressaltar que PALB2 é responsável por mediar a interação entre BRCA1 e BRCA2, e mutações em sua sequência são associadas a um aumento à predisposição ao câncer de mama (Rahman *et al.*, 2007; Sy; Huen; Chen, 2009).

A região C-terminal encerra ainda dois domínios em *tandem* chamados de BRCTs, característico de uma superfamília de proteínas envolvidas nas vias de reparo de dano de DNA e controle de pontos de checagem do ciclo celular (Fan *et al.*, 1999; Mesquita *et al.*, 2010; Miki *et al.*, 1994; Vidarsson *et al.*, 2002). A integridade desses domínios, bem como de sua circunvizinhança, é essencial para a atividade transcricional característica dessa região, AD2 (*Activation Domain 2*). O BRCT N-terminal compreende a região dos aminoácidos 1649 a 1735, e o BRCT C-terminal, os aminoácidos 1756 a 1855. Esses dois domínios são ligados por uma região denominada *linker* que consiste em uma estrutura flexível de 23 aminoácidos (Gayther *et al.*, 1996; Koonin; Altschul; Bork, 1996).

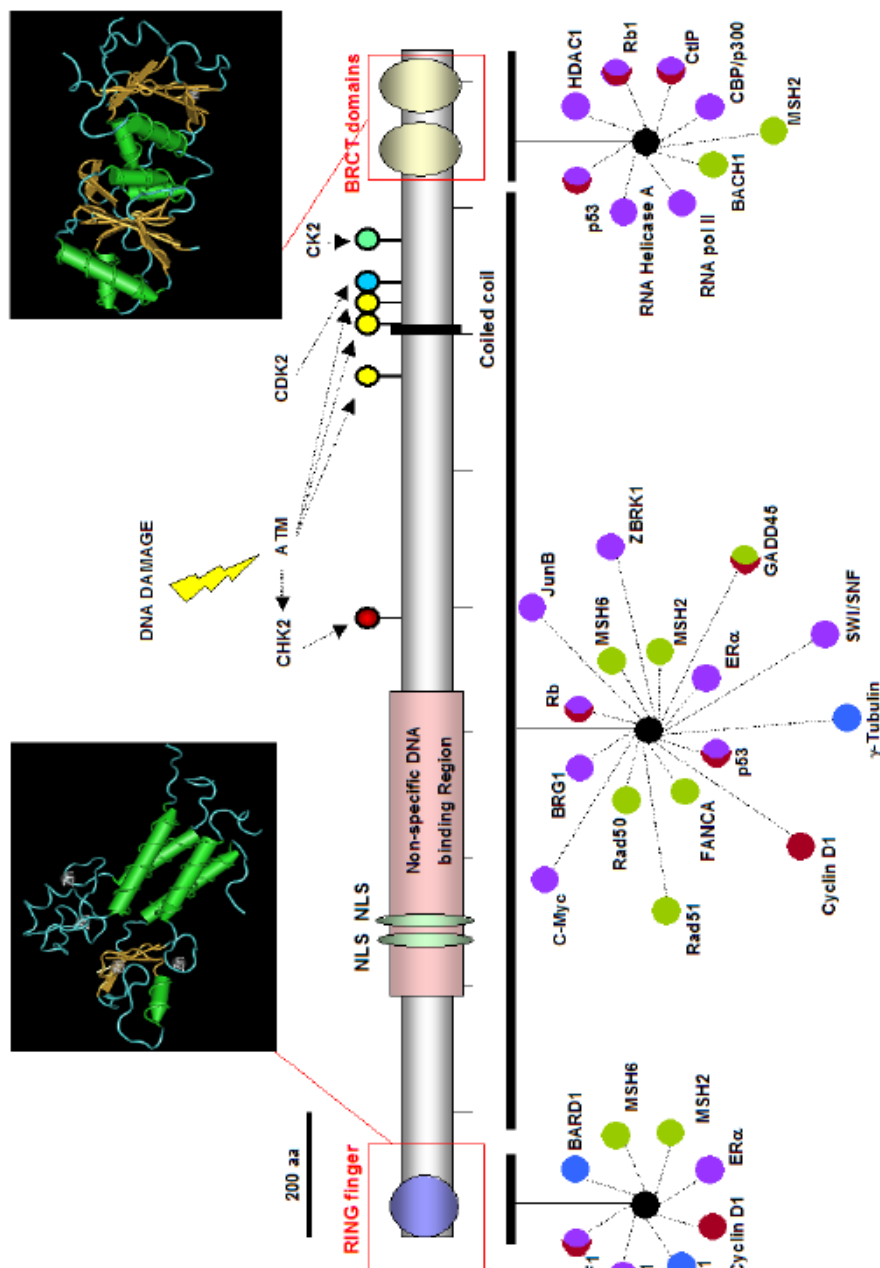


Figura 1.2: Diagrama da estrutura proteica de BRCA1 e seus domínios. As estruturas dos domínios estão representadas na escala. As caixas vermelhas indicam as regiões para as quais está disponível a estrutura tridimensional. As estruturas geradas a partir de modelos *in silico* do RING-finger e dos domínios BRCTs são representadas por fitas (folhas β -pregueadas) e tubos (α -hélices). NLS, sinais de localização nuclear. A região necessária para a ligação não específica com o DNA está representada pelo retângulo rosa. Os sítios de fosforilação são retratados por círculos cheios de cor vermelha (CHK2), amarela (ATM), azul (CDK2) e verde (CHK2). O painel inferior mostra os parceiros de BRCA1 separados pelas regiões de interação (representada pelas barras pretas). Para simplificar, apesar de alguns parceiros estarem denotados por um único círculo, podem representar um complexo proteico (por exemplo, RNA polimerase II). Para facilitar a visualização do papel de BRCA1 em diferentes processos, os parceiros de interação estão representados por cores diferentes dependendo de sua função. Lilás: regulação transcricional e remodelamento de cromatina; vermelho: controle do ciclo celular; verde: resposta ao dano ao DNA; azul: outros. Nos casos em que o parceiro possui mais de uma função, este se encontra representado por duas cores. Adaptado de Dapic; Monteiro, 2006.

1.3.3 - A FUNÇÃO DE BRCA1

BRCA1 participa de diferentes vias que possuem como objetivo final manter a integridade genética e a estabilidade genômica. BRCA1 atua principalmente no reparo de dano ao DNA através da recombinação homóloga (*Homologous Recombination* – HR), uma via de reparo que gera um baixo índice de erros. Nessa via, BRCA1 interage com o complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) na ressecção de pontas e com PALB2/BRCA2, facilitando a interação de RAD51 com as pontas de DNA ressectadas. BRCA1 também interage com outras proteínas envolvidas no reparo de dano ao DNA, controle do ciclo celular e apoptose, fosforilando-as (Huen; Sy; Chen, 2010; Narod; Foulkes, 2004; Roy; Chun; Powell, 2012).

Devido a sua interação com diferentes moléculas, incluindo os produtos de expressão de genes supressores de tumor e proto-oncogenes, proteínas envolvidas no reparo de dano ao DNA e com ativadores e repressores do ciclo celular, acredita-se que BRCA1 se comporta como uma plataforma de coordenação para a ancoragem de diversas proteínas efetoras, com o objetivo de manter a homeostase celular ou, em caso de falha, encaminhar essa célula para a morte programada (Narod; Foulkes, 2004; Roy; Chun; Powell, 2012).

A ausência de BRCA1 funcional gera uma grave instabilidade genômica, levando a célula a um acúmulo de mutações e aberrações cromossômicas como deleções, translocações e aneuploidias. Esses defeitos são consequência da ativação de um mecanismo de reparo deficiente, a via de junção de pontas não homólogas (*non-homologous end-joining*, NHEJ), que se encontra mais ativa em células que apresentam defeitos na via de HR (Huen; Sy; Chen, 2010; Wu; Lu; Yu, 2011).

1.3.4 – OS DOMÍNIOS BRCT

Como dito anteriormente, a região C-terminal de BRCA1 possui dois domínios BRCTs em *tandem*. Esses domínios são regiões globulares de interação proteína-proteína que medeiam a associação com diversas proteínas envolvidas em vias que BRCA1 participa como, por exemplo, replicação do DNA, reparo de dano ao DNA, transcrição, controle do ciclo celular e processos de ubiquitinação (Narod; Foulkes, 2004; Roy; Chun; Powell, 2012).

Os domínios BRCTs em *tandem* de BRCA1 interagem de maneira singular, se comportando como um único domínio proteico (Mesquita *et al.*, 2010; Mirkovic *et al.*, 2004; Williams; Green; Glover, 2001). Essa conformação dos domínios faz com que se forme um sulco em sua estrutura, região importante para a interação de BRCA1 com resíduos fosforiláveis como os de CtIP e BACH1 (Tischkowitz *et al.*, 2008). A integridade da região C-terminal é essencial para o exercício da função supressora de tumor e mutações nesses domínios, bem como em sua circunvizinhança, podem conferir um aumento a predisposição ao câncer (Friedman *et al.*, 1994).

A concentração de resíduos carregados negativamente sugere a participação direta da região C-terminal de BRCA1 em processos de transcrição (Miki *et al.*, 1994). Com a demonstração da interação entre BRCA1 e a RNA polimerase II, através da associação com a RNA helicase A, bem como sua interação com uma série de fatores de ativação e repressão transcricional, coativadores, correpressores, enzimas de remodelamento de cromatina e fatores de processamento de RNA, ficou clara a participação de BRCA1 em processos de transcrição (Anderson *et al.*, 1998; Bochar *et al.*, 2000; Hu; Li, 2002; Monteiro, 2000; Ouchi *et al.*, 1998; Pao *et al.*, 2000; Scully *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Wang; Takenaka; Takeda, 2010; Yarden; Brody, 1999).

Monteiro e colaboradores (1996) demonstraram que a região C-terminal de BRCA1, especificamente os domínios BRCTs, possui a capacidade de transativar um gene repórter quando fusionado a um domínio heterólogo de ligação ao DNA (DBD) (Fig. 1.3). Em 2007, Carvalho e colaboradores (2007) mostraram que essa capacidade de transativação transcricional pode servir como medida da integridade da proteína e, por conseguinte, ser usado como modelo de avaliação funcional para estudar variantes compreendidos entre os éxon 13 e 24 (resíduos 1396 a 1863 da proteína).

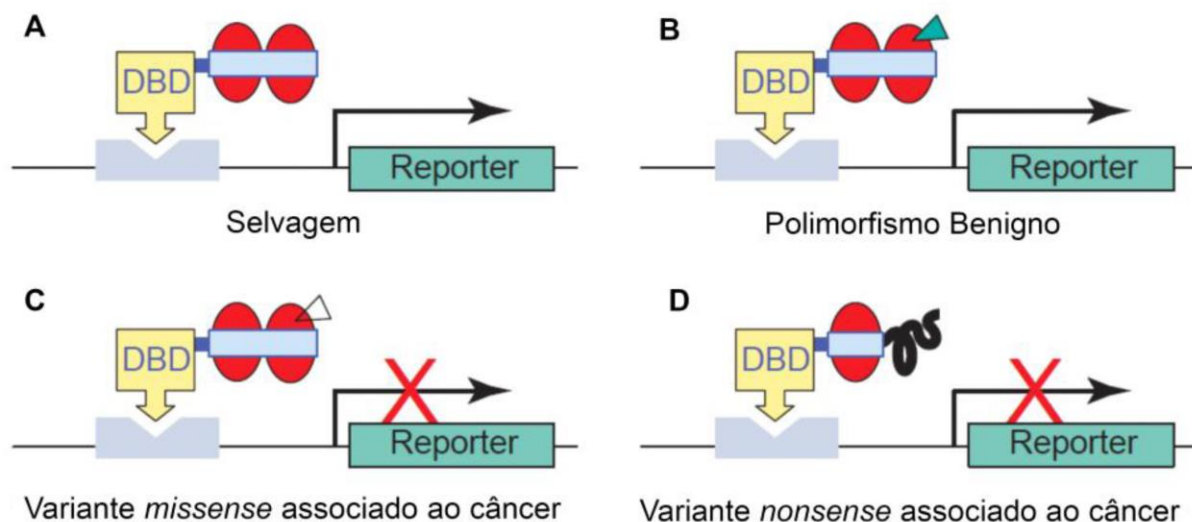


Figura 1.3: Representação esquemática do comportamento de ativação transcricional da região C-terminal de BRCA1 (vermelho) quando fusionado ao DBD (amarelo). A, representa o comportamento da proteína selvagem; B, da proteína com um polimorfismo benigno; C, um variante *missense* associado ao câncer; D, um variante sem sentido também associado ao câncer. Figura adaptada de Monteiro, 2000.

1.3.5 – VARIANTES DO GENE *BRCA1*

O gene *BRCA1* é muito polimórfico e já foram documentados cerca de 1800 variantes (Fig. 1.4) (<http://www.research.nhgri.nih.gov/bic/>). Mutações germinativas no gene *BRCA1* podem ser encontradas em cerca de 45% das famílias com casos de câncer de mama hereditário e 80% das famílias com casos de câncer de mama e ovário hereditários (Dapic; Carvalho; Monteiro, 2005). Mulheres com predisposição hereditária associada a mutações em *BRCA1* têm um risco estimado de 56-80% para o desenvolvimento do câncer de mama (contra 11% da população geral) e de 16-60% para o câncer de ovário (contra 1,4-2,5% na população geral) (Easton *et al.*, 1993).

Aproximadamente 70% dos variantes descritos em *BRCA1* são alelos que não codificam plenamente a proteína, seja pela geração de proteínas truncadas ou pela simples incapacidade de expressão do gene. Nesse grupo estão mutações em regiões regulatórias, alterações em sítios de *splicing*, rearranjos, deleções, inserções, mutações *missense* e mutações sem sentido (Van Der Groep; Van Der Wall; Van Diest, 2011).

De acordo com o *Breast Cancer Information Core*, as mutações sem sentido, consequência de uma mutação de base única, correspondem a 11% do total de variantes descritos na população (<http://www.research.nhgri.nih.gov/bic/>).

Estudos populacionais que consideram análise de segregação e associação alélica observaram que das alterações genéticas encontradas em *BRCA1* na população, 14 a 25% eram mutações sem sentido (Håkansson *et al.*, 1997; Serova *et al.*, 1996). Foi demonstrado também que todas as mutações que conduzem a terminação prematura de *BRCA1* conferem maior risco para o desenvolvimento de câncer (Dapic; Monteiro, 2006). Estudos funcionais mostraram que a perda dos 10 últimos resíduos de aminoácidos, junto à porção C-terminal, é o suficiente para sua inativação (Carvalho; Couch; Monteiro, 2006; Monteiro; August; Hanafusa, 1996).

Para indivíduos carreadores de mutações deletérias em *BRCA1* pouco, ou nada, pode ser feito para uma significativa redução do risco de câncer além de rotinas periódicas de monitoramento. A única opção clínica apresentada a esses indivíduos são as cirurgias profiláticas: a mastectomia e a ooforectomia, ambas bilaterais; ou a quimioterapia profilática (Dapic; Monteiro, 2006; Sifri; Gangadharappa; Acheson, 2004).

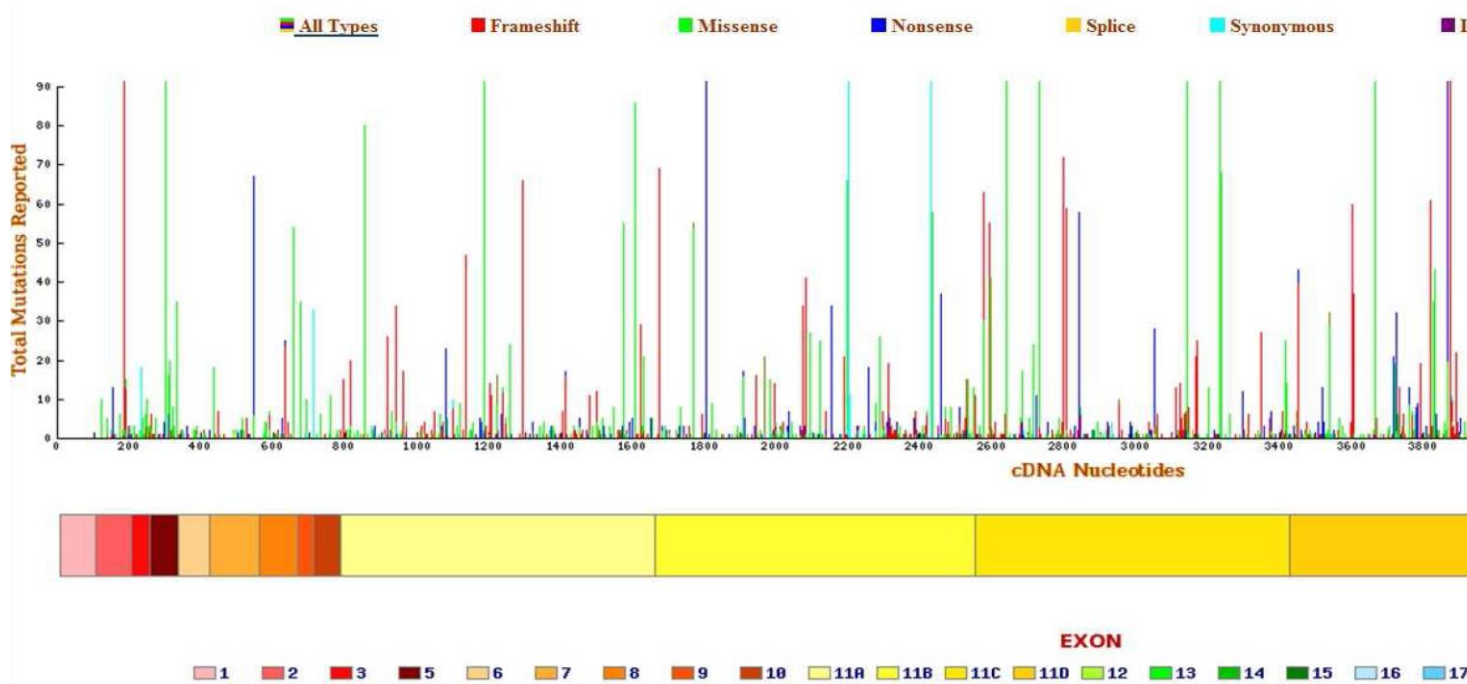


Figura 1.4: Representação gráfica da frequência dos diversos polimorfismos encontrados ao longo da região cDNA. Os exons correspondentes à sequência de nucleotídeos do gráfico estão esquematizados. Adaptado de <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>.

1.4 – TRANSLEITURA DE CÓDONS DE PARADA PREMATURA

O conceito de transleitura de códons de parada prematura surgiu em 1996 como uma possível vantagem terapêutica para doenças genéticas humanas causadas pela presença de códons de parada prematura. Estudos *in vitro* realizados por Howard e colaboradores (1996) e Bedwell e colaboradores (1997) observaram resultados bastante promissores para o tratamento da fibrose cística, relatando uma recuperação importante na atividade da proteína CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*).

Em 2003, Wilschanski e colaboradores realizaram um importante estudo clínico mostrando que pacientes com fibrose cística causada por códons de parada prematura obtiveram uma recuperação parcial de expressão e atividade de CFTR após o uso de gentamicina, o que não aconteceu em pacientes portadores da mutação DF -508 (deleção de um códon) ou em voluntários sadios (Blau *et al.*, 2003).

Estudos realizados em pacientes com distrofia muscular de Duchenne também demonstram um efeito importante, principalmente da gentamicina, na restauração parcial e funcionalidade da distrofina, alcançando uma melhoria fenotípica de aproximadamente 15% em relação à expressão normal (selvagem) (Malik *et al.*, 2010a, 2010b).

1.4.1 - MUTAÇÕES SEM SENTIDO

As mutações sem sentido são caracterizadas por alterações na sequência do gene, por mutações de base única, que geralmente ocorrem nos éxons, gerando um dos três diferentes códons de parada (UAG, UGA ou UAA). Esse tipo de evento mutacional representa 11,2% das mais de 123.000 mutações presentes em 461 genes associados a doenças humanas hereditárias (<http://www.hgmd.org>), tais como a distrofia muscular de Duchenne (15% dos casos), fibrose cística (5% dos casos), ataxia-telangiectasia, mucopolissacaridose tipo I (70% dos casos), cistinose e alguns tipos de câncer (Kellermayer, 2006; Zingman *et al.*, 2007).

Os processos de terminação normal e terminação prematura da tradução não são considerados processos bioquímicos equivalentes. Códons de parada naturais localizam-se nas regiões terminais dos éxons, flanqueadas por regiões não

traduzidas (3'UTR) que são reconhecidas por proteínas que modulam a eficiência da terminação da tradução (Amrani *et al.*, 2006).

A frequência com que os diferentes códons de parada ocorrem naturalmente é de aproximadamente 49,5% para UGA, 28% para UAA e 22,5% para UAG (Sun *et al.*, 2005), diferentemente dos códons de parada oriundos de mutações sem sentido que apresentam frequências de 40,5% para UAG, 38,5% para UGA e 21% para UAA (Mort *et al.*, 2008).

As mutações sem sentido levam a reduções drásticas nos níveis proteicos por suprimirem a tradução dos éxons, culminando no truncamento da proteína. A presença de códons de parada prematura leva também a reduções drásticas nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) do gene carreador da mutação em função da ação do mecanismo NMD (*Nonsense-Mediated Decay*) (Khajavi; Inoue; Lupski, 2006).

NMD é um mecanismo de vigilância encontrado em todas as células eucariotas e é responsável por eliminar moléculas de RNAm portadoras de mutações sem sentido. Caso esses transcritos sejam traduzidos, as proteínas resultantes podem ter um efeito dominante negativo, competindo com a própria proteína selvagem por sítios de interação ou substrato (Baker; Parker, 2004).

Os fatores UPF1, UPF2 e UPF3 (*up-frameshift proteins*), que formam o complexo mensageiro dessa via, são conservados entre diferentes ortólogos. O fator UPF1 participa no processo de desmontagem das subunidades do ribossomo. Em mamíferos, UPF2 e UPF3 fazem parte do complexo de junção éxon-éxon (EJC) que se encontra associado ao RNAm após o processamento da via de *splicing*, juntamente com outras proteínas (Baker; Parker, 2004; Chang; Imam; Wilkinson, 2007; Kervestin; Jacobson, 2012).

A detecção de transcritos com mutações sem sentido ocorre durante a tradução do RNAm. O modelo mais aceito sugere que, durante a primeira tradução do novo RNAm, o ribossomo remove os EJCs conforme ele evolui ao longo da fita. Caso algum complexo permaneça ligado ao RNAm ao final da primeira tradução, o sistema NMD é ativado (Chang; Imam; Wilkinson, 2007).

Resumidamente, o fim da tradução ou sua interrupção leva a formação de um complexo no RNAm, que UPF1 participa. A tradução incompleta leva à desmontagem prematura do ribossomo, e junções éxon-éxon a jusante da posição do ribossomo não serão removidas do transcrito. Se o códon de parada prematura estiver situado entre 50 e 55 nucleotídeos antes da última junção éxon-éxon, UPF1

interagirá com UPF2 e UPF3 presentes na junção, promovendo a fosforilação de UPF1. Uma vez fosforilada, UPF1 interage com as proteínas efetoras SMG-6, com atividade endonuclease, SMG-5 e SMG-7, que promovem deadenilação e decapeamento da fita alvo. O término da via de NMD, incluindo a liberação do ribossomo e degradação do RNAm ocorre em regiões específicas do citoplasma chamadas *P-bodies* (Kervestin; Jacobson, 2012).

Esse sistema de controle é capaz de eliminar de 75% a 95% das moléculas de RNAm alvejadas (Isken; Maquat, 2007). Devido à eficiência dessa via, não é possível detectar proteínas truncadas em pacientes carreadores de mutações sem sentido. No entanto, alguns pacientes carreadores de mutações de outros tipos que apresentam um quadro clínico mais brando possuem níveis detectáveis da proteína afetada. Acredita-se que essa mudança de fenótipo ocorra devido à atividade residual da proteína mutada (Bidou *et al.*, 2012; Bordeira-Carriço *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2004; Lee; Dougherty, 2012).

Hipoteticamente, restaurar os níveis celulares dessas proteínas reduziria o fenótipo das desordens genéticas, bem como o risco do desenvolvimento de tumores.

1.4.2 – AMINOGLICOSÍDEOS

Os aminoglicosídeos são antibióticos utilizados no combate às infecções causadas por bactérias aeróbias Gram-negativas. Os agentes mais utilizados possuem uma estrutura comum composta por um anel central 2-desoxistreptamina ligado a dois aminoaçúcares nas posições 4 e 6 (gentamicina, kanamicina, tobramicina, amicacina e G418) ou nas posições 4 e 5 (paromomicina e neomicina). Outro aminoglicosídeo bem conhecido é a estreptomicina, cuja estrutura é caracterizada por um anel de estreptamina e um glicosídeo ligado na posição 4 (Fig. 1.5) (Keeling; Bedwell, 2005).

Os aminoglicosídeos exercem seu efeito bactericida por inibição da síntese proteica em estruturas ribossomais, se ligando ao sulco maior da hélice 44 através da região de pareamento não canônico dos ribonucleotídeos A1408 e A1493 e da base não pareada A1492 do centro de decodificação na unidade 16S do RNA ribossomal (RNAr) de procariotos. Esta região crítica para a manutenção da fidelidade de ligação códon-anticódon sofre mudanças conformacionais (Fig. 1.6) e,

consequentemente, diminuição da fidelidade no processo de elongação das cadeias polipeptídicas (Vicens; Westhof, 2001).

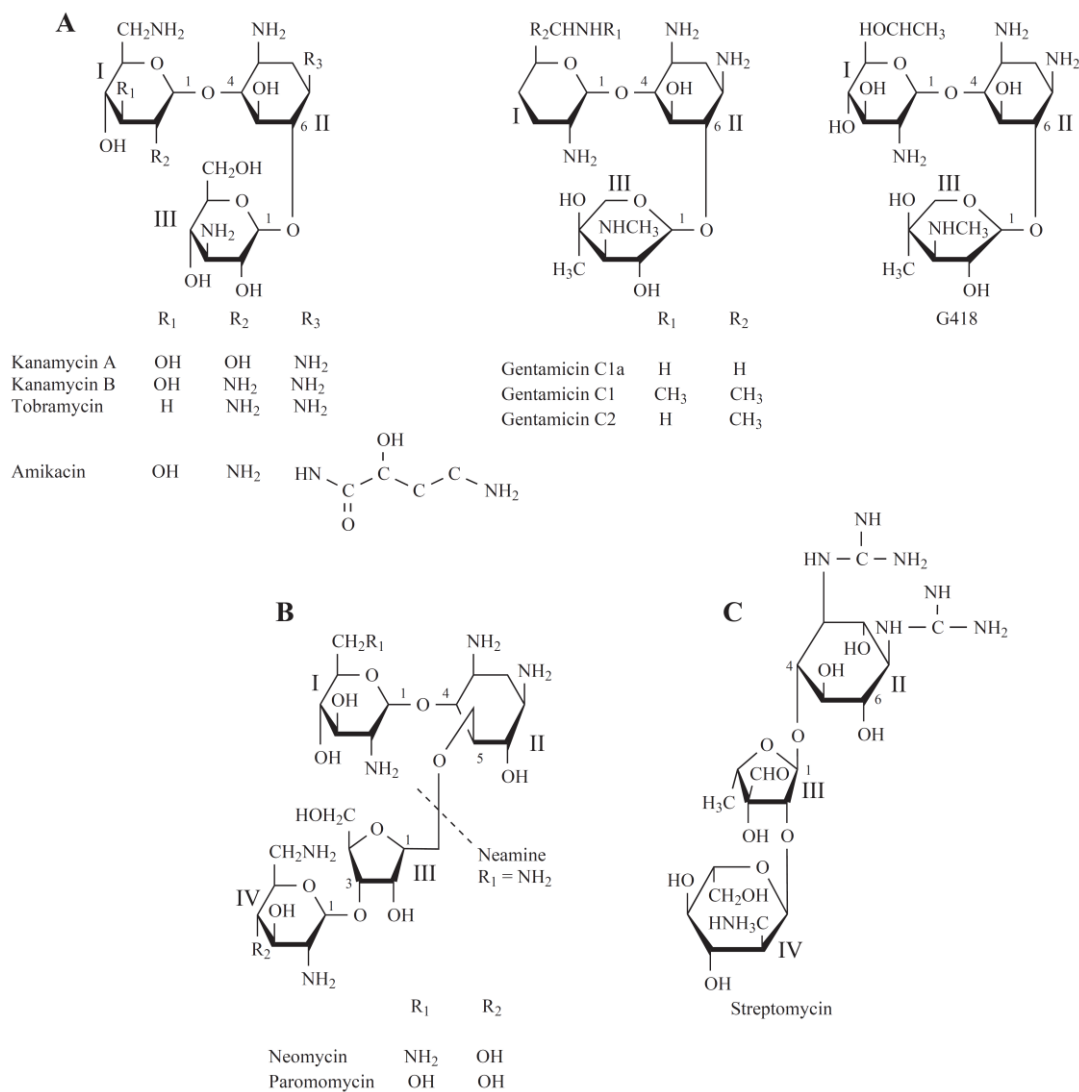


Figura 1.5: Estrutura dos aminoglicosídeos. A, aminoglicosídeos contendo o anel 2-desoxistreptamina (II) ligados a aminoaçúcares nas posições 4 (I) e 6 (III). B, aminoglicosídeos contendo o anel 2-desoxistreptamina (II) ligados a aminoaçúcares nas posições 4 (I) e 5 (III e IV). C, estreptomicina contendo um anel estreptamina (II) ligado a aminoaçúcares na posição 4 (III e IV). Adaptado de Keeling; Bedwell, 2005.

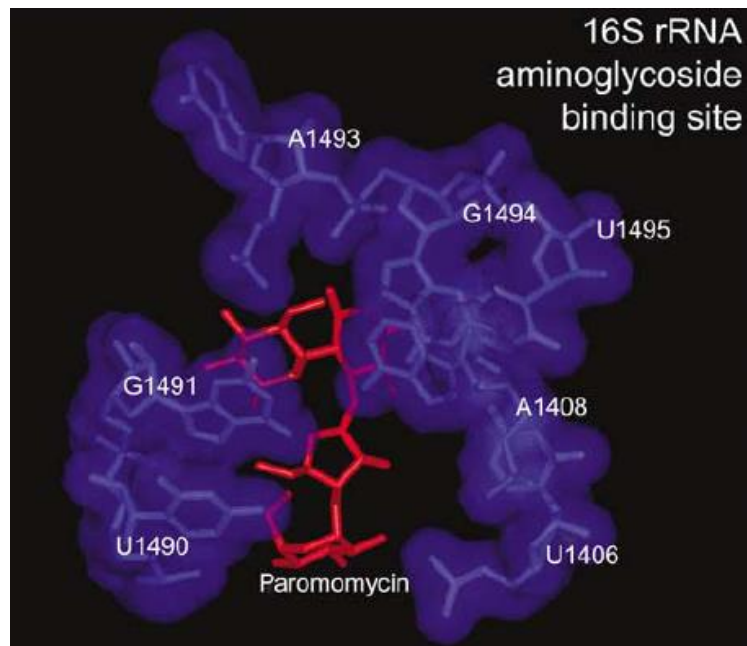


Figura 1.6: Interação entre os aminoglicosídeos e a hélice 44 do RNAr 16S. A ligação do aminoglicosídeo paromomicina corrompendo o pareamento não canônico A1408-A1493 do RNAr, levando à mudança conformacional e redução da fidelidade nas ligações códon-anticódon. Adaptado de Zingman *et al.*, 2007.

Este mecanismo de ação é bastante eficiente em procariotos e em mitocôndrias, e apesar da menor eficiência, também são capazes de induzir redução na fidelidade de elongação das cadeias polipeptídicas em células eucarióticas, levando à troca de aminoácidos ou, mais comumente, à incorporação de um aminoácido no lugar de um códon de parada, num processo conhecido como transleitura traducional. Entretanto, são necessárias concentrações de 10 a 15 vezes maiores em relação àquelas utilizadas para efeito bactericida (Keeling; Bedwell, 2005). Van De Peer e colaboradores (1994), sugeriram que isto se deve ao fato de o RNAr eucarioto possuir algumas diferenças na sequência nucleotídica, mais especificamente uma guanina na posição 1408 da subunidade 18S (Fig. 1.7), em vez de uma adenina, diminuindo assim a afinidade de ligação com os aminoglicosídeos.

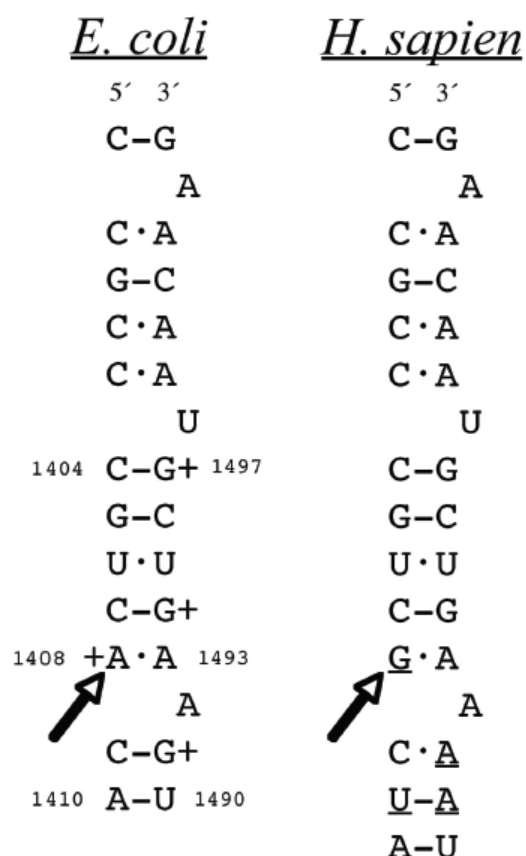


Figura 1.7: Comparação dos centros de decodificação de *Escherichia coli* (16S RNAr) e humanos (18S RNAr). Nucleotídeos não conservados estão sublinhados na estrutura eucariótica. As setas mostram a troca de A pra G no ribonucleotídeo da posição 1408 da subunidade 18S de eucariotos. Adaptado de Keeling; Bedwell, 2005.

Apesar do interesse clínico no mecanismo de transleitura, o uso crônico de aminoglicosídeos é limitado devido a sua ototoxicidade e nefrotoxicidade. O mecanismo de desenvolvimento desses efeitos tóxicos ainda não é plenamente compreendido, porém parece haver uma correlação com a megalina, um receptor transmembranar presente em células do túbulo proximal renal, da cóclea e vestibulo, e retina (Nagai; Takano, 2004; Schmitz *et al.*, 2002; Warchol, 2010). A ligação a megalina resultaria na endocitose do aminoglicosídeo, levando a uma protonação do composto dentro do lisossoma. O composto protonado se ligaria a fosfatidilserina ou fosfatidilinositol de forma catiônica, inibindo a ação de vias que dependem de fosfolipases como a via de IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato), por exemplo (Schmitz *et al.*, 2002).

1.4.3 – TRANSLEITURA DE CÓDON DE PARADA

A transleitura de códons de parada prematura ocorre especificamente pela inserção de um aminoácido cognato na posição codificada por um códon de parada prematura, permitindo assim a restauração da síntese da proteína cadeia completa e restauração parcial das funções da mesma (Fig. 1.8) (Fearon *et al.*, 1994; Keeling; Bedwell, 2005). A eficiência de indução de transleitura dos aminoglicosídeos varia entre 1% e 25% em células humanas, dependendo do códon de parada e do contexto em que ele se encontra inserido (Salas-Marco; Bedwell, 2005).

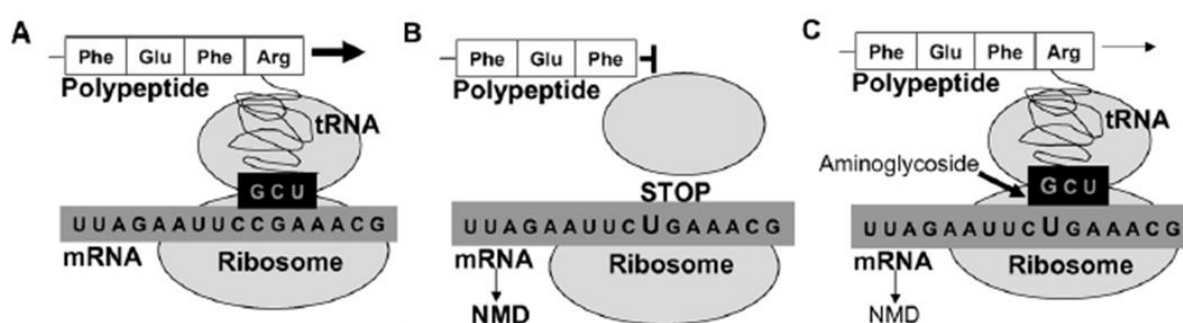


Figura 1.8: Representação esquemática da indução de transleitura por aminoglicosídeos. A, tradução normal do RNAm pelo ribossomo. B, a presença do códon de parada prematura terminando a tradução e formando uma proteína truncada. O RNAm portador da mutação sem sentido é alvo e degradado pelo sistema NMD. C, moléculas de aminoglicosídeo ocupando a subunidade menor do ribossomo levando a incorporação de um aminoácido cognato no códon de parada prematura. Adaptado de Kellermayer, 2006.

Manuvakhova e colaboradores (2000) demonstraram que quanto a eficiência de transleitura em células humanas, o códon UGA seria o mais facilmente translido, seguido por UAG com uma eficiência intermediária, e o códon UAA com o menor percentual de transleitura. Nesse mesmo estudo foi observada uma diferença significativa entre as eficiências de transleitura de acordo com o nucleotídeo posterior ao códon de parada, o tetranucleotídeo. De acordo com o estudo, a ordem relativa de susceptibilidade a transleitura para o códon de parada UGA seria C > A, G > U; para o códon UAG seria U > C, G > A; e para o códon UAA seria C > U > G > A.

O efeito do contexto em que o códon de parada está inserido já foi extensamente estudado em levedura e, em 2001, dois estudos descreveram a sequência nucleotídica que induz a melhor eficiência de transleitura: 5' NAA **STOP** CA(A/G) N(U/C/G)A 3', sendo N qualquer um dos quatro nucleotídeos possíveis (A/U/C/G) (Namy; Hatin; Rousset, 2001). No entanto, apenas em 2012 foi descrito o melhor contexto de indução de transleitura para células humanas. Através da análise estatística de 66 sequências que continham códons de parada prematura, Floquet e colaboradores (2012) determinaram uma sequência consenso mínima: 5' NNU **STOP** CNN 3'.

1.4.4 – TRANSLEITURA NA CLÍNICA MÉDICA

Outros estudos *in vitro* demonstraram que o tratamento com aminoglicosídeos, restaurou parcialmente a expressão e funcionalidade de proteínas com cadeia completa em modelos experimentais de atrofia muscular espinhal (Heier; DiDonato, 2009), acidúria metilmalônica (Buck *et al.*, 2009), deficiência de FVII (Pinotti *et al.*, 2006), deficiência do receptor de vasopressina (V2) (Sangkuhl *et al.*, 2004) e ataxia-telangiectasia (Lai *et al.*, 2004).

Além disso, resultados obtidos utilizando sistema gene repórter corroboram o efeito dos aminoglicosídeos enquanto agentes indutores de transleitura (Diop; Chauvin; Jean-Jean, 2007; Kulyté *et al.*, 2005; Salas-Marco; Bedwell, 2005). Esse sistema gene repórter utiliza uma proteína de fusão para a construção de um modelo ectópico. A sequência utilizada para a formação da proteína de fusão é composta pela sequência codificante da proteína de estudo, que não apresenta códon de parada natural, e a sequência codificante de uma proteína fluorescente a jusante da proteína alvo. As sequências selvagens apresentarão níveis proteicos de proteína de fusão fluorescente de maneira constitutiva, enquanto os variantes, devido à presença de um códon de parada prematuro, apresentarão detecção da fluorescência apenas quando ocorrer a transleitura (Fuchshuber-Moraes *et al.*, 2011; Keeling; Bedwell, 2005).

Apenas em 2010 começou a ser avaliada a aplicabilidade da transleitura em modelos oncológicos. Zilberberg; Lahav; Rosin-arbesfeld em 2010, utilizando o gene APC como modelo de estudo, demonstraram a restauração dos níveis proteicos de APC cadeia completa em linhagens celulares que carregavam mutações sem sentido, além de observar uma melhora clínica em camundongos que possuíam mutações

sem sentido no gene estudado. Em 2011, Floquet; Rousset; Bidou avaliaram a restauração da função da proteína APC translida após o tratamento com indutores de transleitura. Os resultados demonstram que mesmo níveis proteicos inferiores aos níveis detectáveis através da técnica de *western blotting* e imunodeteção são capazes de restaurar a funcionalidade da proteína a condições similares a da proteína selvagem.

Também em 2011, Floquet e colaboradores avaliaram os efeitos da transleitura no gene *TP53*. Nesse estudo, foi demonstrado que mesmo baixos níveis de transleitura são capazes de estabilizar o RNAm, antagonizando o sistema NMD, observação que havia sido descrita por Allamand e colaboradores (2008). A atividade da proteína translida foi avaliada em diferentes funções de p53 como a regulação transcricional de genes alvo e regulação da apoptose, demonstrando a restauração da atividade.

Os genes *APC* e *TP53* representam futuros alvos terapêuticos por serem genes supressores de tumor. A expressão de suas sequências resultando em proteína cadeia completa seria capaz de apresentar efeitos antitumorais, ao contrário de proto-oncogenes. Dessa forma, o gene *BRCA1* se apresenta como um possível candidato de avaliação de transleitura, com possíveis implicações clínicas.

1.4.5 – NOVOS FÁRMACOS

O consistente efeito dos aminoglicosídeos na restituição parcial da expressão das proteínas alteradas tem motivado estudos visando o desenvolvimento de novos compostos, com os quais o efeito de transleitura de códons de parada prematura seja potencializado e sua toxicidade limitada (Bidou *et al.*, 2012; Kerem *et al.*, 2008; Lee; Dougherty, 2012; Nudelman *et al.*, 2009; Welch *et al.*, 2007). Devido às restrições em tratamentos de longa duração, outros fármacos vêm sendo avaliados quanto a sua capacidade de indução de transleitura como a negamicina, um antibiótico dipeptídico, e a tilosina, um antibiótico da família dos macrolídeos (Bidou *et al.*, 2012). Esses, geralmente, apresentam níveis de indução de transleitura inferiores aos observados no uso dos aminoglicosídeos. Com a finalidade de contornar esse problema, novos fármacos vêm sendo estudados objetivando aumentar a indução de transleitura e reduzir sua toxicidade.

O Ataluren® (PTC Therapeutics), inicialmente chamado de PTC-124, vem sendo desenvolvido com base na estrutura e mecanismo de ação dos

aminoglicosídeos, na tentativa de alcançar níveis de transleitura ainda melhores e com toxicidade reduzida (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2010; Welch *et al.*, 2007). O Ataluren® apresenta altos níveis de indução de transleitura, maiores do que a indução provocada pelo uso do aminoglicosídeo com a maior taxa de indução, a geneticina (G418). O fármaco apresenta ainda uma toxicidade muito reduzida, e estudos clínicos de fase III usando a distrofia muscular de Duchenne e fibrose cística como modelos vêm sendo desenvolvidos.

Em um estudo clínico de fase II, Kerem e colaboradores (2008) mostraram que em pacientes com fibrose que apresentam um códon de parada prematura no gene *CFTR* se beneficiaram com o uso do fármaco Ataluren®, apresentando uma redução nas anormalidades eletrofisiológicas do epitélio causadas pela doença. O uso do Ataluren® surge como uma nova perspectiva terapêutica para doenças genéticas causadas por códons de parada prematura, como o câncer.

O composto NB54 é um aminoglicosídeo sintético de segunda geração que apresenta uma maior indução de transleitura do que a gentamicina e uma menor toxicidade. Apesar de apresentar resultados bastante promissores, diferente do PTC124, ainda não foram iniciados ensaios clínicos (Goldmann *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011; Nudelman *et al.*, 2009; Rowe *et al.*, 2011).

Dada a carência de alternativas ao tratamento dos casos de câncer de mama hereditário, o uso desses fármacos pode se apresentar como uma importante estratégia na prevenção do tumor; e, eventualmente, também em outras formas de câncer hereditário associado a mutações sem sentido.

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito de aminoglicosídeos na transleitura de variantes do gene *BRCA1*, encerrando códons de parada prematura, e na restauração dos níveis proteicos e sua atividade biológica.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar variantes de *BRCA1*, de ocorrência natural na população, que se adequem aos objetivos do estudo.
- Gerar os variantes de *BRCA1* selecionados para o estudo através rotinas de mutagênese *in vitro*.
- Gerar construções em vetores de expressão retroviral encerrando a sequência selvagem e os variantes selecionados do estudo para produção de proteínas quiméricas.
- Desenvolver linhagens celulares humanas, derivadas da linhagem de células HeLa, com expressão constitutiva das construções selvagem ou variantes do estudo.
- Avaliar e caracterizar o perfil de expressão das construções supracitadas nas linhagens de células humanas estabilizadas.
- Avaliar a toxicidade induzida por diferentes aminoglicosídeos em células da linhagem HeLa.
- Caracterizar a indução de transleitura por aminoglicosídeos no modelo desenvolvido.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS VARIANTES PARA ESTUDO

Os variantes selecionados para esse estudo foram identificados na base de dados do *Breast Cancer Information Core* – BIC (<http://www.research.nhgri.nih.gov/bic/>). Os critérios utilizados para a seleção desses variantes foram: ser uma mutação do tipo sem sentido de ocorrência natural na população e estar localizada na região C-terminal de BRCA1, compreendida entre os éxons 13 e 24 (correspondendo aos resíduos de aminoácidos 1396 a 1863).

3.2 – GERAÇÃO DE CONSTRUÇÕES

3.2.1 – MUTAGÊNESE

Para geração da sequência selvagem e dos variantes selecionados nos diferentes contextos (BRCA1:EGFP e GAL4:BRCA1), foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação da sequência codificante de *BRCA1* (NCBI – U14680) a partir do nucleotídeo 4303 até o 5711 (éxons 13 – 24, correspondente à região codificante dos resíduos de aminoácidos 1396 a 1863). Também foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para a geração das mutações desejadas, além de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação da sequência codificante de EGFP e para o domínio de ligação ao DNA (DBD) de GAL4 (Quadro I).

Quadro I: Iniciadores utilizados na geração das construções.

Sequência Alvo	Iniciador	Sentido	Sítio de Restrição	Região de Anelamento	Sequência Nucleotídica (5' → 3')
BRCA1	BRCA1:NOT	Senso	NotI	Início do éxon 13 de <i>BRCA1</i>	CGG CCG CCG CAT GCA GAG GGA TAC CA
BRCA1	BRCA1:AGE	Antissenso	AgeI	Fim do éxon 24 de <i>BRCA1</i>	CGA CCG GTG TAG TGG CTG TGG GGG AT
BRCA1	BRCA1:PAC	Antissenso	PacI	Fim do éxon 24 de <i>BRCA2</i>	CGT TAA TTA ATT ACT ATC AGT AGT GGC TGT G
GAL4	GAL4:AGE	Senso	AgeI	Início da sequência do DBD de <i>GAL4</i>	CGA CCG GTA TGA AGC TAC TGT CTT CT
EGFP	EGFP:AGE	Senso	AgeI	Início da sequência codificante de <i>EGFP</i>	CGA CCG GTA TGG TGA GCA AGG GCG AG
EGFP	EGFP:PAC	Antissenso	PacI	Fim da sequência codificante de <i>EGFP</i>	CGT TAA TTA ATT ACT ATC AGT TAT CTA GAT C
BRCA1 - S1457X	S1457X FW	Senso	-	Geração do variante SX na posição 1457	GCA GTA TTA ACT TGA CAG AAA AGT
BRCA1 - S1457X	S1457X RV	Antissenso	-	Geração do variante SX na posição 1457	CTA CTT TTC TGT CAA GTT AAT AC
BRCA1 - Q1785X	Q1785X FW	Senso	-	Geração do variante QX na posição 1785	GGA ATG GAT GGT ATA GCT GTG TGG
BRCA1 - Q1785X	Q1785X RV	Antissenso	-	Geração do variante QX na posição 1785	CCA CAC AGC TAT ACC ATC CAT TCC
BRCA1 - E1836X	E1836X FW	Senso	-	Geração do variante EX na posição 1836	GGT GAC CCG ATA GTG GGT GTT GG
BRCA1 - E1836X	E1836X RV	Antissenso	-	Geração do variante EX na posição 1836	CCA ACA CCC ACT ATC GGG TCA CC

Os produtos amplificados foram gerados por rotina de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Saiki *et al.*, 1988) utilizando Pfx50 DNA Polymerase (Invitrogen, Califórnia, EUA) nas condições especificadas abaixo.

Para as reações de amplificação da sequência codificante de *EGFP* foi usado como molde o vetor pEGFP – C3 (Clontech, Califórnia, EUA) e os iniciadores EGFP:AGE e EGFP:PAC.

Nas reações de mutagênese e amplificação de *BRCA1* foi utilizado como molde o plasmídeo pCDNA3 – *BRCA1*_{éxons 13-24} (Fig. 3.1), e os iniciadores de mutagênese combinados com os iniciadores *BRCA1*:NOT ou *BRCA1*:AGE.

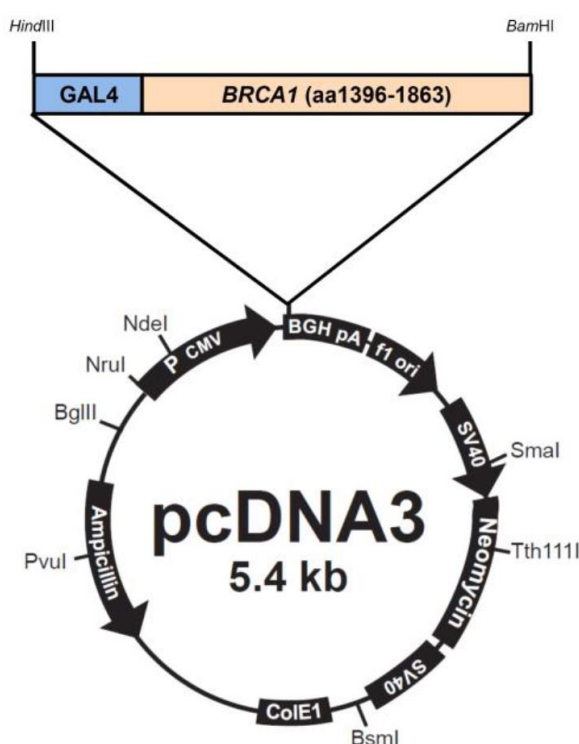


Figura 3.1: Mapa do plasmídeo pCDNA3 – *BRCA1*_{éxon13-24} previamente gerado pelo grupo (Carvalho *et al.*, 2007). O plasmídeo contém a sequência codificante do domínio de ligação ao DNA de GAL4 em fusão com a sequência codificante de *BRCA1* correspondente aos nucleotídeos 4305 a 5711 (início do éxon 13 ao fim do éxon 24, correspondentes aos resíduos de aminoácidos 1396 a 1863,). Essas sequências foram subclonadas direcionalmente no vetor pCDNA3 (Invitrogen, Califórnia, EUA) nos sítio de *HindIII* e *BamHI*.

As reações de mutagênese e amplificação da sequência *GAL4:BRCA1* também utilizaram como molde o plasmídeo pCDNA3 – *BRCA1*_{éxons 13-24} (Fig. 3.1) em associação com os iniciadores *GAL4*:AGE e *BRCA1*:PAC e os iniciadores de mutagênese.

Os variantes selecionados para o estudo foram gerados por rotinas de mutagênese sítio-dirigida por sobreposição de fragmentos (Ho *et al.*, 1989). A mutagênese por sobreposição de fragmentos emprega a técnica de PCR para inserir mutações específicas em uma sequência de DNA. Resumidamente, o protocolo consiste, inicialmente, na amplificação de dois fragmentos da sequência alvo (Fig. 3.2). Cada reação utiliza um iniciador que hibridiza em uma das extremidades da sequência alvo (iniciadores “a” ou “d”, Fig. 3.2) e um iniciador de mutagênese que hibridiza na região da mutação e contém um nucleotídeo alterado em relação à sequência alvo, correspondente a mutação de interesse (iniciadores “b” ou “c”, Fig. 3.2). Como os produtos das reações “1” e “2” são parcialmente complementares, é possível então combinar os fragmentos gerados (**AB** e **CD**, Fig. 3.2) utilizando-os como molde para uma nova etapa de amplificação da sequência variante em conjunto com os iniciadores “a” e “d” (reação “3”, Fig. 3.2).

As reações de amplificação foram conduzidas utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade, Pfx50 DNA Polymerase, de acordo com as especificações do fabricante. O programa de termociclagem utilizado para as reações foi definido como: (1) uma etapa de desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, (2) seguido por 35 ciclos de passos de desnaturação (30 segundos a 94°C), anelamento (30 segundos a 57°C) e extensão (1,5 minutos a 72°C) e por fim, (3) uma etapa de extensão de 5 minutos a 72°C.

Todos os iniciadores foram desenhados de forma a atenderem a mesma temperatura de anelamento.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti Dx Thermal Cycler (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE (45mM Tris base, 45mM Ácido Bórico, 1mM EDTA) de acordo com Ausubel (2002).

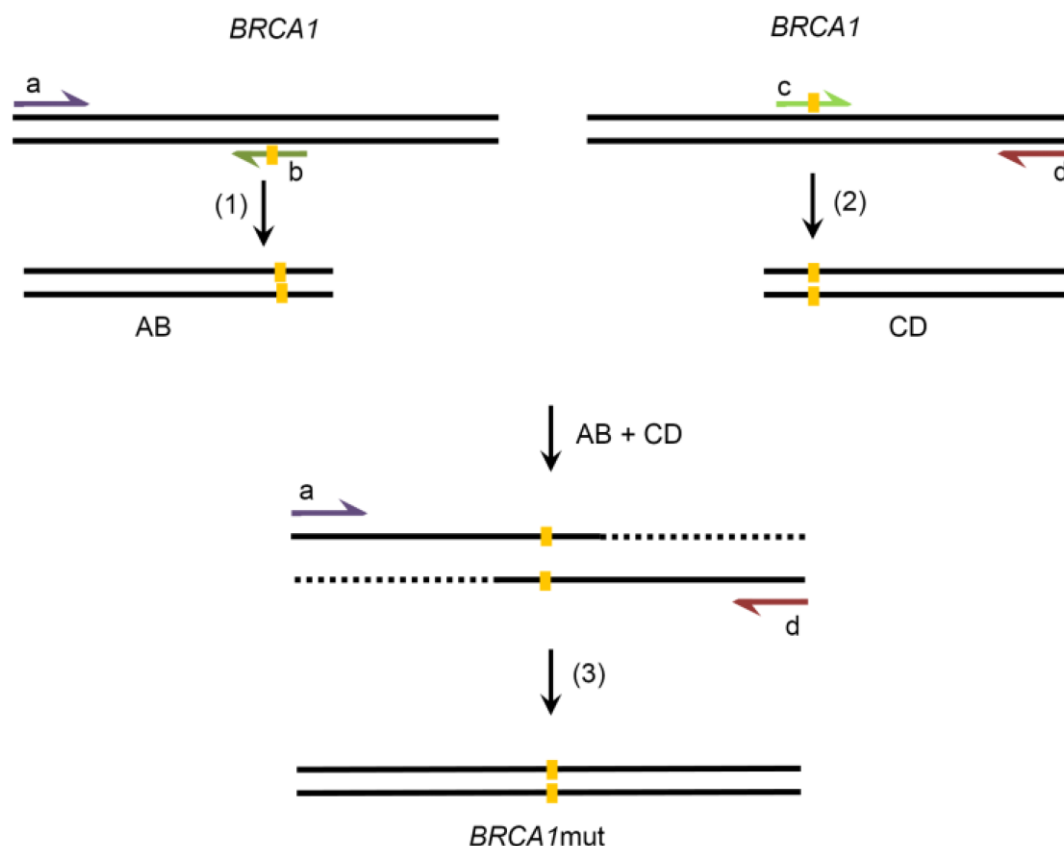


Figura 3.2: Modelo esquemático da mutagênese sítio dirigida por sobreposição de fragmentos. Os DNAs dupla-fita e os iniciadores estão representados por linhas com ou sem setas na orientação 5'→3'. O sítio de mutagênese está indicado pelo retângulo amarelo sobre as setas. Os iniciadores estão denotados por letras minúsculas e os produtos de PCR por pares de letras maiúsculas, correspondentes aos iniciadores utilizados para gerar cada produto. As rotinas 1 e 2 representam as reações parciais de mutagênese, usando a sequência codificante de *BRCA1* selvagem como molde e iniciadores mutados e iniciadores que flanqueiam a região a ser amplificada; a rotina 3 representa a reação de amplificação plena do fragmento mutado (*BRCA1*mut).

Os produtos de amplificação das rotinas de PCR de mutagênese (correspondentes às reações “1” e “2”, Fig. 3.2) foram purificados a partir de eletroforese preparativa em gel de agarose 1% (p/v) utilizando kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Purification Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), de acordo com instruções do fabricante.

Os produtos purificados foram analisados novamente por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

3.2.2 – CLONAGEM NO VETOR pCR®2.1-TOPO®

Os produtos das rotinas de amplificação foram clonados no vetor pCR®2.1 - TOPO utilizando o kit *TOPO TA Cloning®* (Invitrogen, Califórnia, EUA).

Resumidamente, os fragmentos purificados foram submetidos a uma etapa adicional de extensão com a DNA polimerase *Taq* (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo as recomendações do kit. Esse procedimento tem como finalidade a adição de adenosinas na extremidade 3' dos produtos de PCR para otimizar a rotina de ligação entre inserto (produto de PCR) e vetor (pCR®2.1 – TOPO®; Invitrogen, Califórnia, EUA) pela enzima Topoisomerase I .

O produto ligado foi transformado em bactérias comerciais quimiocompetentes (disponibilizadas pelo kit), seguindo as instruções do fabricante.

Os clones foram selecionados em meio LB-ágar contendo ampicilina (10 µg/mL) e X-gal (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA); como recomendado pelo fabricante.

Os clones de interesse foram expandidos e seu DNA plasmidial foi extraído e analisado como descrito no item 3.3.

Os produtos da rotina de mutagênese clonados no vetor pCR®2.1 – TOPO® (Fig. 3.3) foram confirmados através de rotina de sequenciamento automático, como descrito no item 3.4.

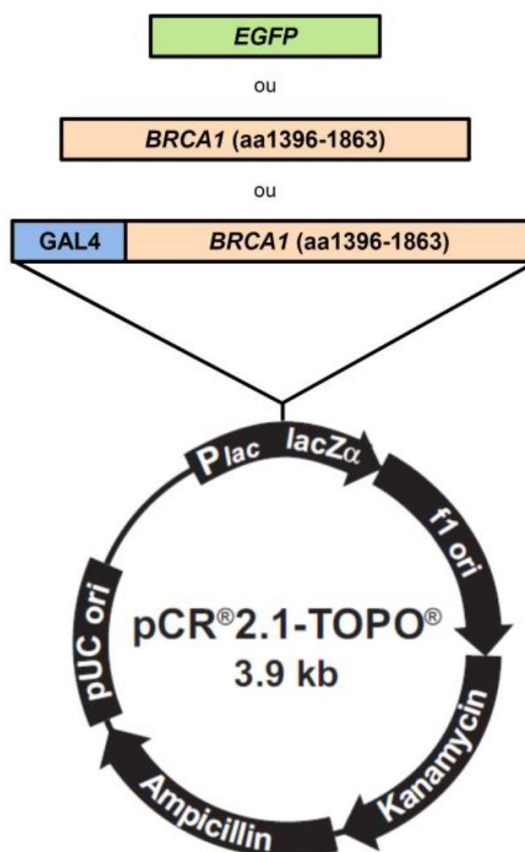


Figura 3.3: Representação das construções em pCR®2.1 – TOPO®. Os produtos obtidos pelas rotinas de amplificação (cassete EGFP, indicado em verde, ou; cassete BRCA1^{éxons 13-24}, indicado em laranja, ou; cassete GAL4: BRCA1^{éxons 13-24}, indicado em azul e laranja) foram clonados no vetor pCR®2.1 – TOPO®.

3.2.3 – SUBCLONAGEM NO VETOR RETROVIRAL pQCXIH

O cassete encerrando a sequência de GAL4:BRCA1, selvagem ou variantes, clonado no vetor pCR®2.1 – TOPO foi submetido a digestão para subclonagem direcional nos sítios de restrição de AgeI e PacI.

Resumidamente, os produtos clonados foram submetidos à reação de digestão com as enzimas de restrição AgeI e PacI (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos digeridos foram analisados por eletroforese preparativa em gel de agarose 1% (p/v). Os fragmentos de interesse foram purificados, como descrito no item 3.2.1, e analisados novamente por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

Os produtos de digestão purificados (insertos) foram usados em uma reação de ligação juntamente com o vetor pQCXIH (previamente digerido com as enzimas *AgeI* e *PacI* e purificado; Clontech, Califórnia, EUA), utilizando a enzima T4 DNA ligase (Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) segundo instruções do fabricante. Os produtos recombinantes gerados nas reações de ligação (Fig. 3.4) foram utilizados em rotina de transformação bacteriana, seguida da seleção de colônias que continham os plasmídeos de interesse (como descrito no item 3.3).

O cassette encerrando a sequência codificante de *EGFP* clonado no vetor pCR®2.1 – TOPO foi submetido à digestão para subclonagem direcional nos sítios *AgeI* e *PacI* no vetor retroviral pQCXIH, nas mesmas condições descritas anteriormente, dando origem ao plasmídeo pQCXIH-EGFP.

Os cassetes encerrando a região codificante de *BRCA1* correspondente aos éxons 13 ao 24 (*BRCA1*_{éxons 13-24}) selvagem ou variantes clonados no vetor pCR®2.1 – TOPO® foram submetidos a digestão e subclonados nos sítios de *NotI* e *AgeI* no plasmídeo pQCXIH-EGFP no mesmo quadro de leitura do cassette *EGFP* (Fig. 3.4), codificando a proteína quimérica *BRCA1*_{éxons 13-24}:EGFP. Os produtos recombinantes gerados nas reações de ligação foram utilizados em rotina de transformação e seleção de bactérias *Escherichia coli* (cepa DH5'α) que continham os plasmídeos de interesse (processo descrito no item 3.3).

A extração do DNA plasmidial e análise de todas as subclonagens ocorreram como descrito no item 3.3. Os produtos subclonados foram confirmados através de sequenciamento automático, como descrito no item 3.4.

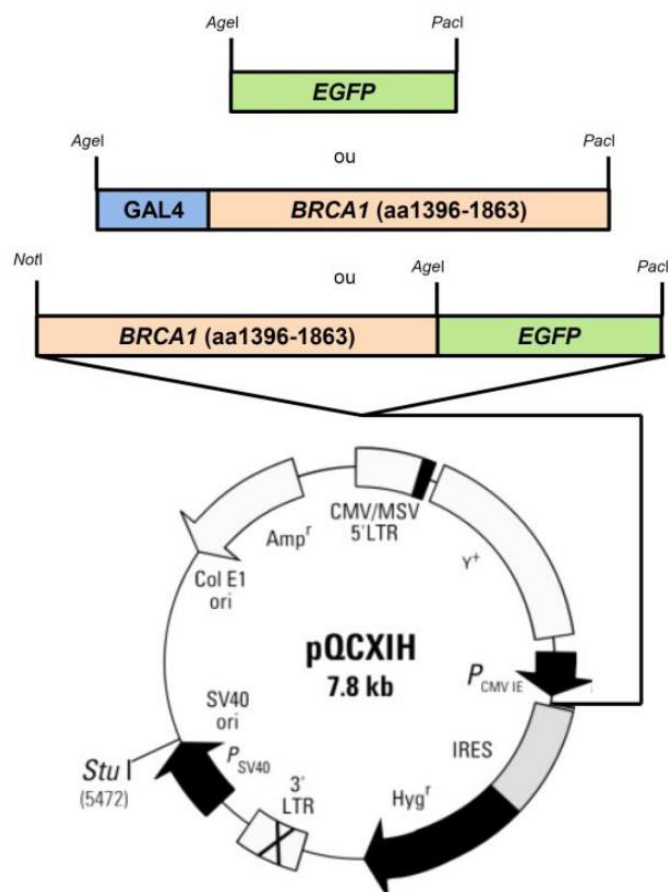


Figura 3.4: Representação das construções em pQCXIH. Os cassetes (cassete EGFP, indicado em verde, ou; cassete BRCA1_{éxons 13-24}, indicado em laranja, ou; cassete GAL4: BRCA1_{éxons 13-24}, indicado em azul e laranja) originalmente clonados no vetor pCR[®]2.1 – TOPO[®] foram subclonados direcionalmente no vetor pQCXIH nos sítios de restrição representados acima.

3.3 – INDUÇÃO DE ELETROCOMPETÊNCIA, TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

A transformação de bactérias usando as construções plasmidiais foi conduzida pelo processo de eletroporação (Neumann *et al.*, 1982). Bactérias eletrocompetentes foram obtidas conforme previamente descrito (Ausubel *et al.*, 2002; Miller; Nickoloff, 1995). Resumidamente, bactérias *E. coli* da cepa DH5 α foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani; peptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5 % (p/v), NaCl 0,5% (p/v)) até fase logarítmica de crescimento; as células foram recuperadas e sucessivamente lavadas com água e glicerol 10% (v/v), ambos gelados. A suspensão de bactérias foi estocada a -80°C.

Para a transformação, as bactérias eletrocompetentes foram incubadas com o DNA plasmidial (previamente dessalinizado) em banho de gelo, transferidas para

uma cubeta própria e submetidas a um pulso elétrico rápido de 1.8 kV em eletroporador MicroPulser (BIO-RAD Califórnia, EUA). Em seguida as bactérias foram recuperadas em meio LB a 37°C sob agitação e, posteriormente, plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (10µg/mL).

Para a obtenção do DNA plasmidial dos clones de interesse foi utilizada uma rotina de extração por lise alcalina, segundo Ausubel (2002). Resumidamente, as células foram ressuspensas em tampão GTE (Glicose 50mM, Tris-Cl 25mM pH 8,0, EDTA 10mM), lisadas em solução de hidróxido de sódio e SDS (NaOH 0.2M, SDS 1% (p/v)) e, posteriormente, neutralizadas em tampão acetato (ácido acético glacial 29,5 mL, pérolas de KOH até pH 4,8, H₂O para 100mL). O material foi desproteínizado com clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha), e precipitado em isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ressuspenso em água. O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

Os clones isolados foram submetidos à rotina de PCR visando à amplificação dos insertos desejados: sequência codificante de *BRCA1*, sequência codificante de *EGFP* e a sequência GAL4:BRCA1, e, subsequentemente, analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), como descrito no item 3.2.1. Para identificação dos clones positivos, foi observada a amplificação de um fragmento com aproximadamente 2000pb (pares de base) para o cassete GAL4:BRCA1, 1450pb para sequência de *BRCA1* e 780pb para a sequência de *EGFP*.

O kit *QIAprep Spin Maxiprep* (QIAGEN, Hiden, Alemanha) foi utilizado para obtenção dos DNAs retrovirais recombinantes (de acordo com as recomendações do fabricante) que atenderiam às rotinas de transdução de células humanas.

3.4 – SEQUENCIAMENTO

Os produtos clonados no vetor pCR®2.1 – TOPO, bem como os produtos da subclonagem no vetor pQCXIH, foram confirmados através de rotina de sequenciamento automático realizada pelo Laboratório SONDA-UFRJ, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ.

3.5 – CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular HeLa (carcinoma de colo de útero humano) foi cultivada em atmosfera úmida, mantida à 37°C e 5% (v/v) de CO₂, utilizando meio de cultura

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO, Carlsbad, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB) e coquetel de antibióticos (penicilina, 100.000U/L e estreptomicina, 100mg/L). O subcultivo foi feito a cada 48 horas, quando as monocamadas se apresentavam entre 90% e 100% de confluência.

3.6 – ENSAIOS DE TOXICIDADE CELULAR

Para determinação das concentrações e tempos de tratamento com os aminoglicosídeos, $2,5 \times 10^3$ células HeLa foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com os aminoglicosídeos G418, gentamicina, higromicina B ou puromicina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) por 24, 48, 72, e 96 horas, em concentrações que variaram entre 0,3 e 1 $\mu\text{g/mL}$ para puromicina e entre 10 e 3000 $\mu\text{g/mL}$ para os demais fármacos.

Os efeitos citotóxicos induzidos por esses aminoglicosídeos foram avaliados por ensaios de redução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenoltetrazolio) (Mosmann, 1983). Resumidamente, trata-se de um ensaio colorimétrico que consiste na redução do MTT em cristais de formazan pela ação de desidrogenases, o que só acontece em células viáveis. O protocolo consistiu em expor a monocamada de células a 0,5mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) em meio sem SFB durante 3 horas em estufa úmida à 37°C. Ao final, a solução foi removida e os cristais formados no interior das células foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemanha). A colorimetria foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular devices, Sunnyvale, EUA) e a absorbância mensurada em comprimento de onda de 538nm.

3.7 – TRANSDUÇÕES

As transduções foram realizadas através de infecção de células HeLa por retrovírus carreando as construções de interesse, seguindo o protocolo descrito nos itens abaixo.

3.7.1 – PREPARAÇÃO DOS RETROVÍRUS

Os retrovírus foram produzidos a partir da co-transfecção de células da linhagem HEK293T com os vetores estruturais pMDM (encerrando os genes *gag* e *pol*) e pVSV-G (encerrando o gene *env*), e com o vetor pQCXIH contendo as construções de interesse. Os genes *gag* e *pol* são responsáveis pela formação do capsídeo viral, que envolverá a construção pQCXIH, enquanto o gene *env* é responsável pela formação do envelope viral e infecção da célula hospedeira.

A transfecção foi conduzida a partir de protocolo adaptado de Ausubel (2002). Resumidamente, 2×10^6 células HEK293T foram semeadas em uma garrafa para cultura de 75cm^2 em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de SFB. O protocolo de co-transfecção consistiu em adicionar os vetores pVSV-G, pMDM e o DNA retroviral recombinante (construção pQCXIH), contendo uma das construções de interesse, à solução cloreto de cálcio nas quantidades descritas no quadro II. Em seguida essa mistura foi adicionada lentamente ao tampão HBS2x (HEPES 50mM; NaCl 280mM; Na_2PO_4 1,5mM; pH: 7,12), em homogeneização constante e, posteriormente, incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Imediatamente após a incubação, a mistura foi adicionada às células em cultivo.

Após 16 horas, o meio de cultura foi trocado. Transcorridas 40 horas da transfecção, o sobrenadante viral foi recolhido e centrifugado para remoção de restos celulares e captação das partículas virais. O sobrenadante coletado foi filtrado (elemento filtrante de poro $0,22\mu\text{m}$), e centrifugado a $21.500 \times g$ durante 60 minutos. O sobrenadante da centrifugação foi descartado e o *pellet*, rico em partículas virais, foi ressuspenso em meio DMEM suplementado com SFB. As alíquotas foram armazenadas à -80°C até o uso na transdução de células.

Quadro II: Reagentes para a transfecção por fosfato de cálcio.

Reagente	Concentração	Massa ou Volume
pMDM	-	10mg
pVSV-G	-	6mg
pQCXIH	-	20mg
CaCL ₂	2,5M	50mL
HBS	2x	500mL
Água qsp	-	1mL

As quantidades são referentes a transfecção de uma garrafa para cultura de 75cm^2 .

3.7.2 – INFECÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

Para cada experimento de infecção, foram utilizadas $3,5 \times 10^3$ células HeLa cultivadas em placa de 24 poços com 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% (v/v) SFB, 100 μ L da suspensão viral contendo os retrovírus e 1 μ L de polibreno (6 μ g/ μ L).

Após 48 horas da infecção, as células foram submetidas a tratamento com higromicina B (200 μ g/mL) para seleção de células com expressão estável das construções de interesse.

3.8 – ENSAIOS DE TRANSLEITURA

Para os ensaios de indução de transleitura, as células foram semeadas de acordo com a área de plaqueamento, para que atingissem cerca de 90% de confluência após 96 horas de cultivo, preservando a viabilidade das células ao longo do experimento.

Em todas as estratégias de análise, 24 horas após o plaqueamento original, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo o fármaco G418 (300 μ g/mL). A indução de transleitura foi avaliada 48 horas após o tratamento com o aminoglicosídeo.

3.8.1 – MICROSCOPIA CONFOCAL

Para os ensaios de microscopia confocal, 5×10^4 células foram semeadas sobre lamínulas de vidro (17mm) em placas de 24 poços e tratadas com 300 μ g/mL de G418 por 48 horas. Ao final do tratamento, as células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e tratadas com solução de fixação (3% (p/v) paraformaldeído; 2% (p/v) de sacarose; em PBS) por 5 minutos à temperatura ambiente, seguido de uma etapa com etanol absoluto gelado por 5 minutos. As lamínulas foram montadas sobre de lâminas de vidro utilizando o meio de montagem contendo DAPI (dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole; *DAPI Prolong Gold Antifade*; Invitrogen, Califórnia, EUA). Os ensaios foram realizados em microscópio confocal

FV10i – O (Olympus, Japão), a captura das imagens foi conduzida utilizando o programa FV10 – SW (Olympus, Japão), e a análise das mesmas utilizando o programa FV10 – ASW (Olympus, Japão).

3.8.2 – CITOMETRIA DE FLUXO

As linhagens celulares foram semeadas em placas de 6 poços e tratadas com 300µg/mL de G418 por 48 horas. Ao final do tratamento, as células foram tripsinizadas e, após quantificação, 10⁶ células foram recolhidas, lavadas três vezes com PBS e ressuspensas em solução de fixação (paraformaldeído 1% (p/v) em PBS). A expressão de EGFP foi analisada no citômetro *BD Accuri™ C6 Flow Cytometer* (BD Biosciences, Califórnia, EUA). Para determinação de células vivas foi usado como critério a relação de tamanho/complexidade. Para cada condição de tratamento, foram analisados 50.000 eventos e a detecção de EGFP foi realizada utilizando o canal de leitura FL₁ (comprimento de onda de 430nm). Os dados foram analisados utilizando o programa *CFlow Plus* (BD Biosciences, Califórnia, EUA).

3.8.3 – AVALIAÇÃO DOS NIVEIS PROTEICOS

3.8.3.1 – EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a extração de proteínas, células HeLa, tratadas ou não tratadas com aminoglicosídeos, foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada (1.500 xg, 10 minutos, temperatura ambiente) e o *pellet* tratado com tampão RIPA (100mM Tris-HCl, pH:7,4; 150mM NaCl; 50mM EDTA; 0,1% (v/v) Triton X-100; 0,1% (p/v) SDS; 0,1% (p/v) desoxicolato de sódio) contendo coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) por 30 minutos em banho de gelo. O extrato foi centrifugado a 21.500 xg por 20 minutos. O sobrenadante foi recuperado, e a quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

3.8.3.2 – WESTERN BLOTTING E IMUNODETECÇÃO

O perfil proteico foi resolvido por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (v/v) (SDS-PAGE;(Ausubel *et al.*, 2002). e transferido para membrana de PVDF (GE

Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), usando o sistema *BioRad Semidry* (BIORAD, Califórnia, EUA), segundo recomendações do fabricante. Em seguida, a membrana foi tratada por 1 hora à temperatura ambiente com tampão TBS-T (50mM Tris-HCl, pH:7,5; 150mM NaCl; 0,01% (v/v) Tween-20) suplementado com 5% (p/v) de leite em pó desnatado comercial.

A membrana foi revelada utilizando como anticorpo primário os anticorpos monoclonais de camundongo anti- β -actina ou anti-EGFP (ambos Santa Cruz, Califórnia, EUA) diluídos em TBS-T suplementado com 0,5% (p/v) de leite por 16 horas à 4°C. Após três lavagens com TBS-T de 10 minutos cada, foi realizado o tratamento com o anticorpo monoclonal de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Santa Cruz, Califórnia, EUA) por 1 hora à temperatura ambiente. A revelação foi conduzida por reação de quimioluminescência utilizando o kit *Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Pharmacia Biotech, Nova Jersey, EUA) e a membrana foi exposta à filme radiográfico *Amersham Hyperfilm ECL* (Amersham Pharmacia Biotech, Nova Jersey, EUA), segundo instruções do fabricante.

3.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando teste T de Student, empregando uma análise pareada e unicaudal. O critério de significância adotado foi de $p < 0,05$ para todas as análises.

4. RESULTADOS

4.1 – GERAÇÃO DOS VARIANTES SEM SENTIDO DE *BRCA1*

Para a condução das análises de indução de transleitura foram identificados variantes sem sentido descritos na população utilizando a base de dados do *Breast Cancer Information Core* – BIC. Foram encontrados cinquenta e um variantes na região de cobertura do modelo (Quadro III), dentre os quais, quatro foram escolhidos para compor o estudo: S1457X, Q1785X, E1836X e Y1853X.

Esses variantes foram selecionados por estarem distribuídos ao longo da região de estudo (éxons 13 ao 24 de *BRCA1*) e as proteínas geradas a partir desses variantes apresentarem os domínios BRCTs corrompidos e, por conseguinte, darem origem a proteínas com atividade biológica limitada (Monteiro; August; Hanafusa, 1996).

Os códons de parada prematura codificados pelos variantes selecionados para o estudo contemplam todos os códons de parada descritos (UAA, UGA, UAG).

A sequência selvagem de *BRCA1* e os variantes foram adequadamente gerados por mutagênese sítio dirigida, como descrito no item 3.2.1. As construções originalmente clonadas no vetor pCR®2.1 – TOPO®, foram subclonadas no vetor retroviral pQCXIH, nos contextos GAL4:BRCA1 e BRCA1:EGFP, e confirmadas por sequenciamento automático.

Quadro III: Variantes naturais selecionados para o estudo.

Éxon	Mutação (Aminoácido)	Códon Selvagem e Nucleotídeo +1	Códon Mutado e Nucleotídeo +1
13	Q1396X	CAG A	TAG A
	Q1408X	CAG C	TAG C
	Q1420X	CAG C	TAG C
	R1443X	CGA A	TGA A
	Q1447X	CAA A	TAA A
14	S1457X	TCA C	TGA C
	Q1458X	CAG A	TAG A
	Y1463X	TAC C	TAA C
	E1494X	GAA A	TAA A
15	S1496X	TCA T	TAA T
	S1496X	TCA T	TGA T
	S1503X	TCA T	TAA T
	W1508X	TGG T	TGA T
	Q1518X	CAG A	TAG A
	E1535X	GAG G	TAG G
	Q1537X	CAA C	TAA T
	Q1538X	CAG C	TAG C
	E1540X	GAA G	TAA G
	E1541X	GAG T	TAG T
16	Y1552X	TAC T	TAG T
	G1560X	GGA A	TGA A
	Y1563X	TAC C	TAG C
	K1601X	AAA G	TAA G
	Q1604X	CAA T	TAA T
17	E1661X	GAA T	TAA T
	K1667X	AAG T	TAG T
18	E1683X	GAG A	TAG A
	E1694X	GAG T	TAG T
	Y1703X	TAT T	TAG T
19	W1712X	TGG G	TGA G
	W1718X	TGG G	TGA G
	W1718X	TGG G	TAG G
	E1725X	GAA A	TAA A
20	K1727X	AAA A	TAA A
	R1737X	AGA G	TGA G
	Q1747X	CAA G	TAA G
	R1751X	CGA G	TGA G
21	E1754X	GAA T	TAA T
	-	-	-
22	W1782X	TGG A	TAG A
	W1782X	TGG A	TGA A
	Q1785X	CAG G	TAG G
	S1796X	TCA T	TAA T
23	W1815X	TGG A	TGA A
	E1817X	GAG G	TAG G
24	R1835X	CGA G	TGA G
	E1836X	GAG T	TAG T
	W1837X	GTG T	TGA T
	W1837X	GTG T	TAG T
	Y1845X	TAC C	TAA C
	Q1846X	CAG T	TAG T
	Y1853X	TAC C	TAA C

Fonte: BIC.

As construções geradas no contexto BRCA1:EGFP foram transfectadas em células HEK 293T, como descrito no item 3.7.1, para geração de partículas virais, a exceção da construção encerrando o variante Y1853X, que por questões técnicas foi suprimida das rotinas subsequentes. As partículas virais foram utilizadas na transdução das células da linhagem HeLa, como descrito no item 3.7.2.

As células transduzidas foram selecionadas com higromicina B (200µg/mL), tomando como referência a viabilidade das células não transduzidas. As linhagens celulares utilizadas nos ensaios foram mantidas sob pressão seletiva e denominadas de acordo com a construção transduzida. As linhagens geradas são: HeLa Vetor (HeLa transduzida com pQCXIH-EGFP), HeLa WT (HeLa transduzida com pQCXIH-BRCA1_{selvagem}:EGFP), HeLa SX (HeLa transduzida com pQCXIH-BRCA1_{S1457X}:EGFP), HeLa QX (HeLa transduzida com pQCXIH-BRCA1_{Q1785X}:EGFP) e HeLa EX (HeLa transduzida com pQCXIH-BRCA1_{E1836X}:EGFP) (Quadro IV). As células não transduzidas utilizadas como controle foram denominadas HeLa NT (Quadro IV).

Quadro IV: Linhagens desenvolvidas para o estudo.

Construção	BRCA1	Linhagem
Não transfectada	-	HeLa NT
pQCXIH-EGFP	-	HeLa Vetor
pQCXIH-BRCA1:EGFP	Selvagem	HeLa WT
pQCXIH-BRCA1:EGFP	S1457X	HeLa SX
pQCXIH-BRCA1:EGFP	Q1785X	HeLa QX
pQCXIH-BRCA1:EGFP	E1836X	HeLa EX

As linhagens celulares geradas apresentam um padrão de síntese proteica, a partir da construção BRCA1:EGFP de acordo com o variante transduzido, como é possível observar na figura 4.1. Permitindo assim, a avaliação da indução de transleitura do códon de parada prematura através da recuperação da emissão de fluorescência de EGFP, bem como de seus níveis proteicos.

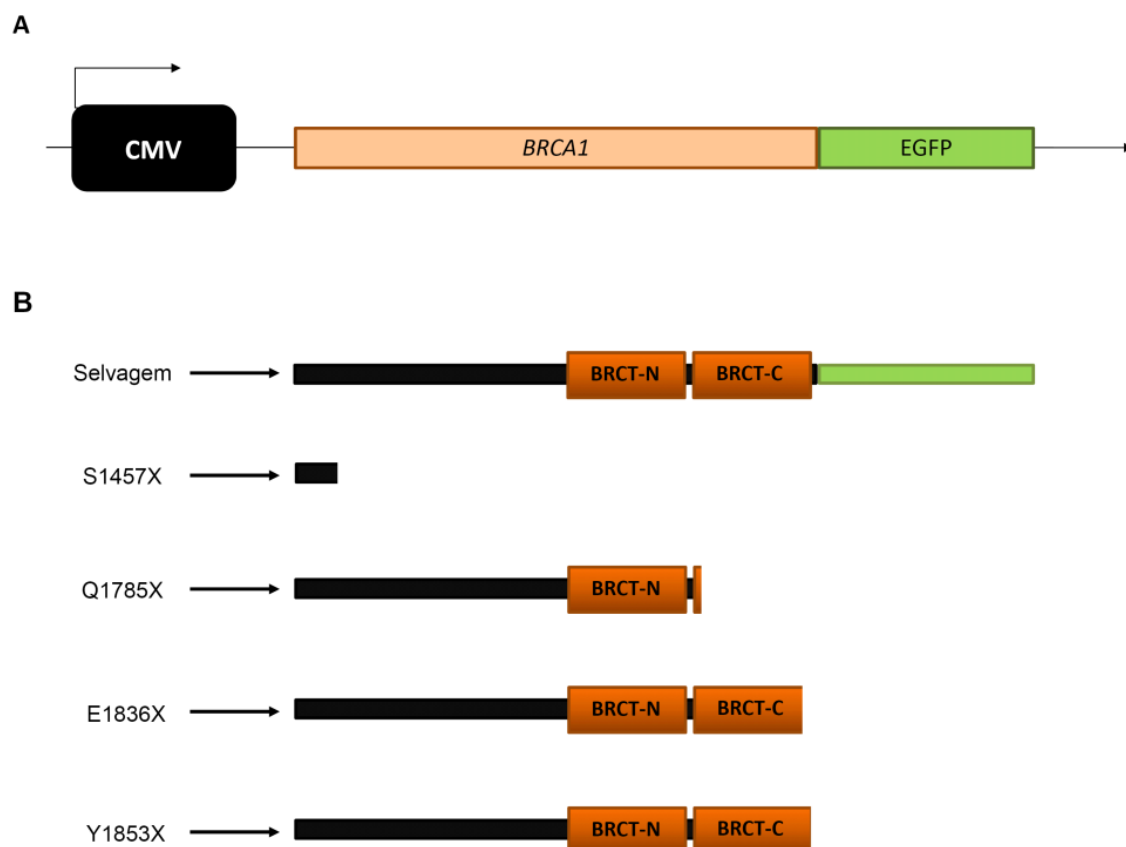


Figura 4.1: Representação esquemática do modelo de expressão BRCA1:EGFP. A, a região promotora (CMV) e os cassetes da sequência de DNA de *BRCA1:EGFP* compõem parte do plasmídeo transduzido nas células HeLa; B, a tradução do transcrito resulta em proteínas de tamanhos variados de acordo com a posição da mutação. As proteínas quiméricas codificadas pelas construções variantes não possuem EGFP.

4.2 – ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios de toxicidade celular foram realizados em células da linhagem HeLa para determinar os limites de toxicidade para o tratamento com os aminoglicosídeos G418, gentamicina, higromicina B e puromicina.

Cada condição de tratamento foi analisada com três experimentos independentes em sextuplicata e os resultados foram representados pela média das leituras da densidade óptica obtidas em cada experimento. As representações gráficas foram feitas em valores percentuais em relação ao controle de células não tratadas.

A figura 4.2 apresenta os efeitos do G418 em diferentes tempos nas células HeLa. Os resultados indicam que apenas as células tratadas com 3000µg/mL de

G418 durante 24 horas apresentam redução significativa de 19% na viabilidade celular ($p<0,005$). O tratamento por 48 horas somente apresenta redução significativa na viabilidade celular nas concentrações de 1000 μ g/mL ($p<0,005$) e 3000 μ g/mL ($p<0,0001$) de 28% e 54% respectivamente, quando comparadas ao controle. Quando tratadas por 72 horas, ocorreram reduções que variaram de 22% até 83% nas concentrações superiores a 300 μ g/mL ($p<0,005$), em relação ao controle. Foram observadas evidentes alterações morfológicas e redução no perfil de adesão nos tratamentos superiores a 30 μ g/mL. No tratamento por 96 horas foi possível observar reduções na viabilidade de até 96% para as concentrações mais elevadas ($p<0,0001$). As concentrações de 30 μ g/mL e 100 μ g/mL apresentaram reduções mais discretas, 10% ($p<0,05$) e 17% ($p<0,005$).

As células tratadas com gentamicina estão representadas na figura 4.3. Os resultados apresentam reduções significativas após 24 horas do início do tratamento de 17% ($p<0,005$) na viabilidade celular para a concentração de 3000 μ g/mL, o que não foi observado para as demais concentrações. Quando tratadas por 48 horas as células apresentam uma redução na viabilidade de 10% ($p<0,005$) a partir do tratamento com 300 μ g/mL. No tratamento durante 72 horas, as concentrações de 30 μ g/mL, 100 μ g/mL, 300 μ g/mL, 1000 μ g/mL e 3000 μ g/mL induziram redução na viabilidade celular de, no mínimo, 12% ($p<0,05$). O tratamento por 96 horas apresentou reduções na viabilidade celular a partir de 23% ($p<0,005$) para as concentrações de 100 μ g/mL 300 μ g/mL, 1000 μ g/mL e 3000 μ g/mL.

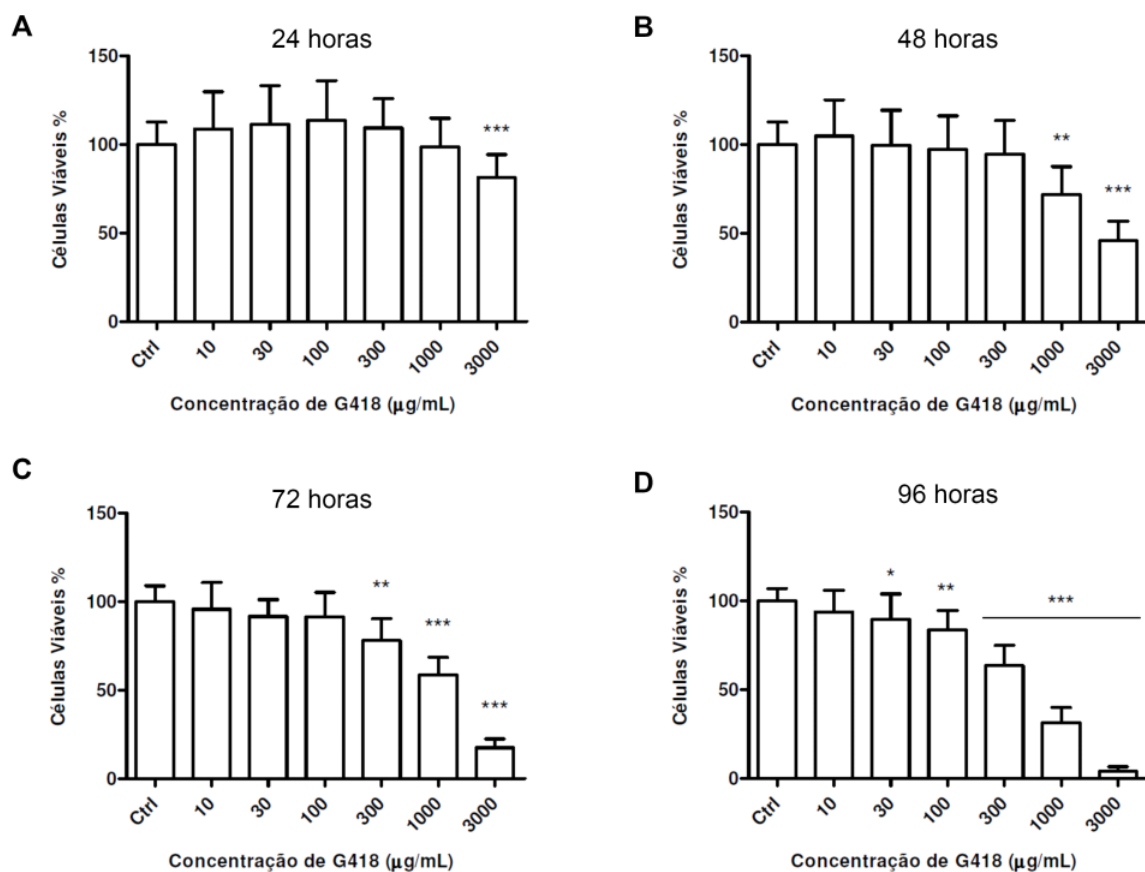


Figura 4.2: Sensibilidade à G418 da linhagem celular HeLa. Os gráficos demonstram o efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de G418 (10 - 3000µg/mL) por: **A**, 24 horas; **B**, 48 horas; **C**, 72 horas; **D**, 96 horas. A viabilidade celular está expressa como percentual do controle não tratado (média $\pm$ DP). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0001$.

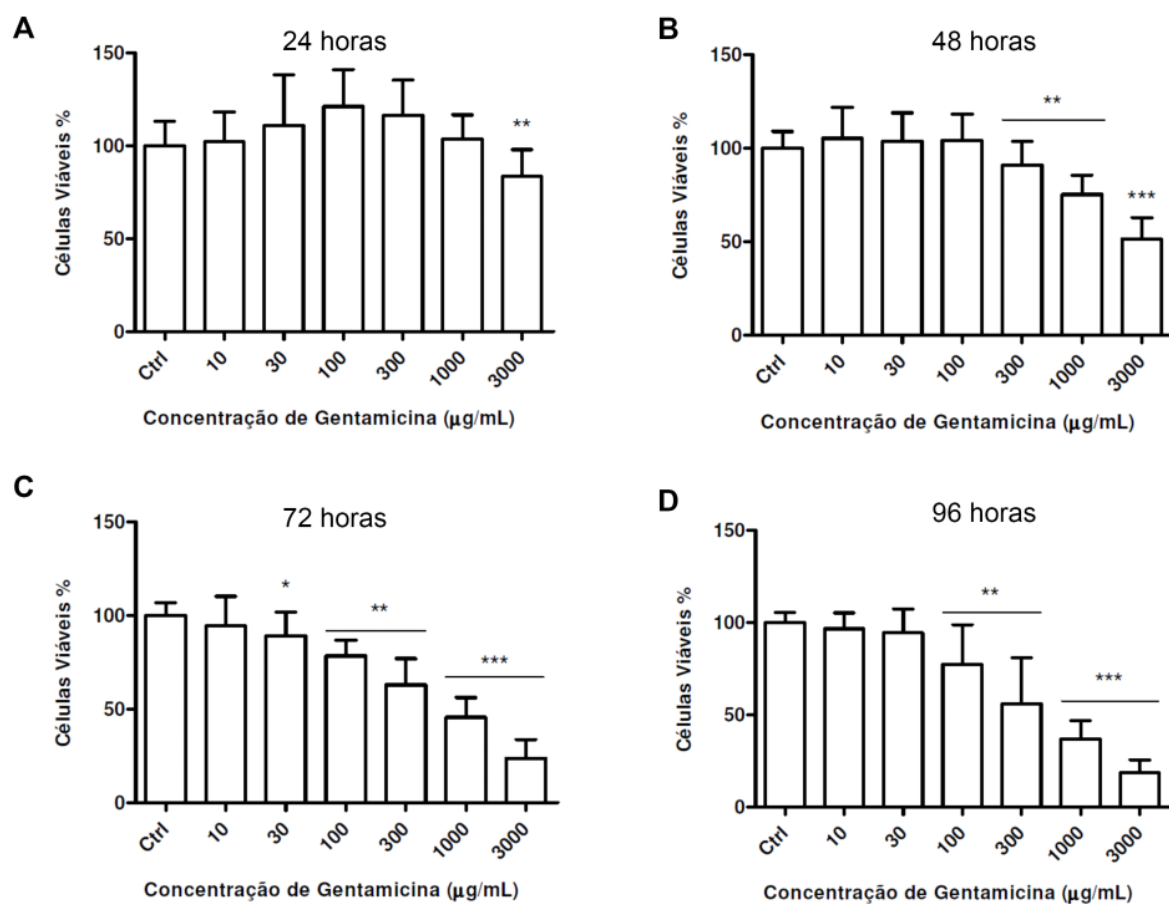


Figura 4.3: Sensibilidade à gentamicina da linhagem celular HeLa. Os gráficos demonstram o efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de gentamicina (10 - 3000µg/mL) por: A, 24 horas; B, 48 horas; C, 72 horas; D, 96 horas. A viabilidade celular está expressa como percentual do controle não tratado (média ± DP). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0001$.

Em relação ao tratamento com higromicina B representado na figura 4.4, foi observado que as células tratadas com 10µg/mL, 30µg/mL, 100µg/mL e 300µg/mL do fármaco, por 24 horas, não apresentaram redução significativa na viabilidade celular. Entretanto, quando submetidas a concentrações de 1000µg/mL e 3000µg/mL, ocorreu redução significativa de 27% ($p<0,005$) e 52% ($p<0,0001$), respectivamente. Quando tratadas por 48 horas, ocorreram reduções maiores que 24% para as concentrações de 300µg/mL, 1000µg/mL e 3000µg/mL. As células tratadas por 72 horas apresentaram redução de, no mínimo, 14% ($p<0,05$) para todas as concentrações aplicadas. O mesmo não ocorre para as células tratadas por 96 horas, que apresentam redução na viabilidade celular de, no mínimo, 48% ($p<0,0001$) para as concentrações de 100µg/mL, 300µg/mL, 1000µg/mL e 3000µg/mL.

A figura 4.5 apresenta os resultados obtidos para o tratamento com puromicina. Nessas células tratadas por 24 horas foi possível observar redução na viabilidade celular de 26% ($p<0,005$) e 70% ($p<0,0001$) apenas para as concentrações de 0,75µg/mL e 1µg/mL, respectivamente. O tratamento de 48 horas apresenta reduções que variam de 20% a 93% de viabilidade para as concentrações 0,25µg/mL, 0,5µg/mL, 0,75µg/mL e 1µg/mL. Quando tratadas por 72 horas, ocorreram reduções superiores 10% na viabilidade celular em relação ao controle em todas as concentrações aplicadas ($p<0,05$). O tratamento por 96 horas apresentou reduções de viabilidade a partir de 14% ($p<0,005$) para as concentrações superiores a 0,1µg/mL.

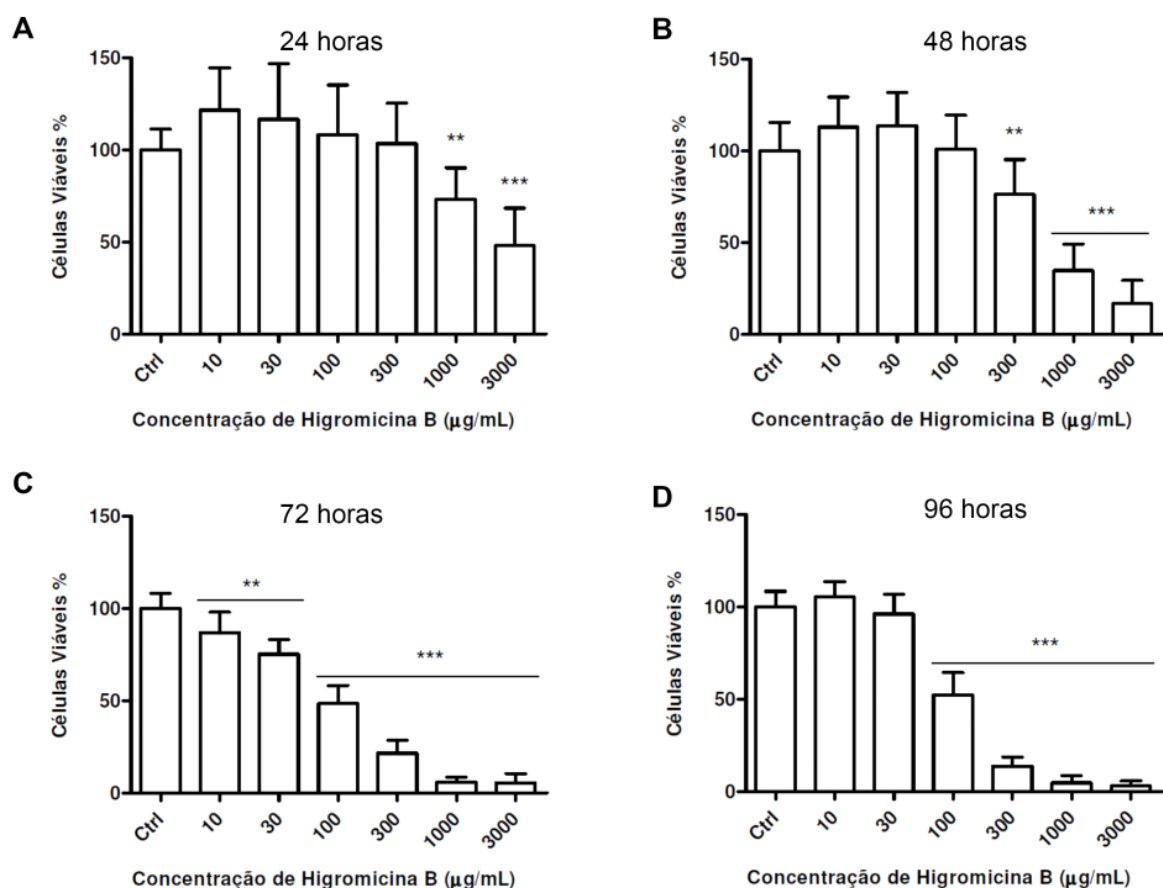


Figura 4.4: Sensibilidade à higromicina B da linhagem celular HeLa. Os gráficos demonstram o efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de higromicina B (10 - 3000µg/mL) por: A, 24 horas; B, 48 horas; C, 72 horas; D, 96 horas. A viabilidade celular está expressa como percentual do controle não tratado (média $\pm$ DP). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0001$.

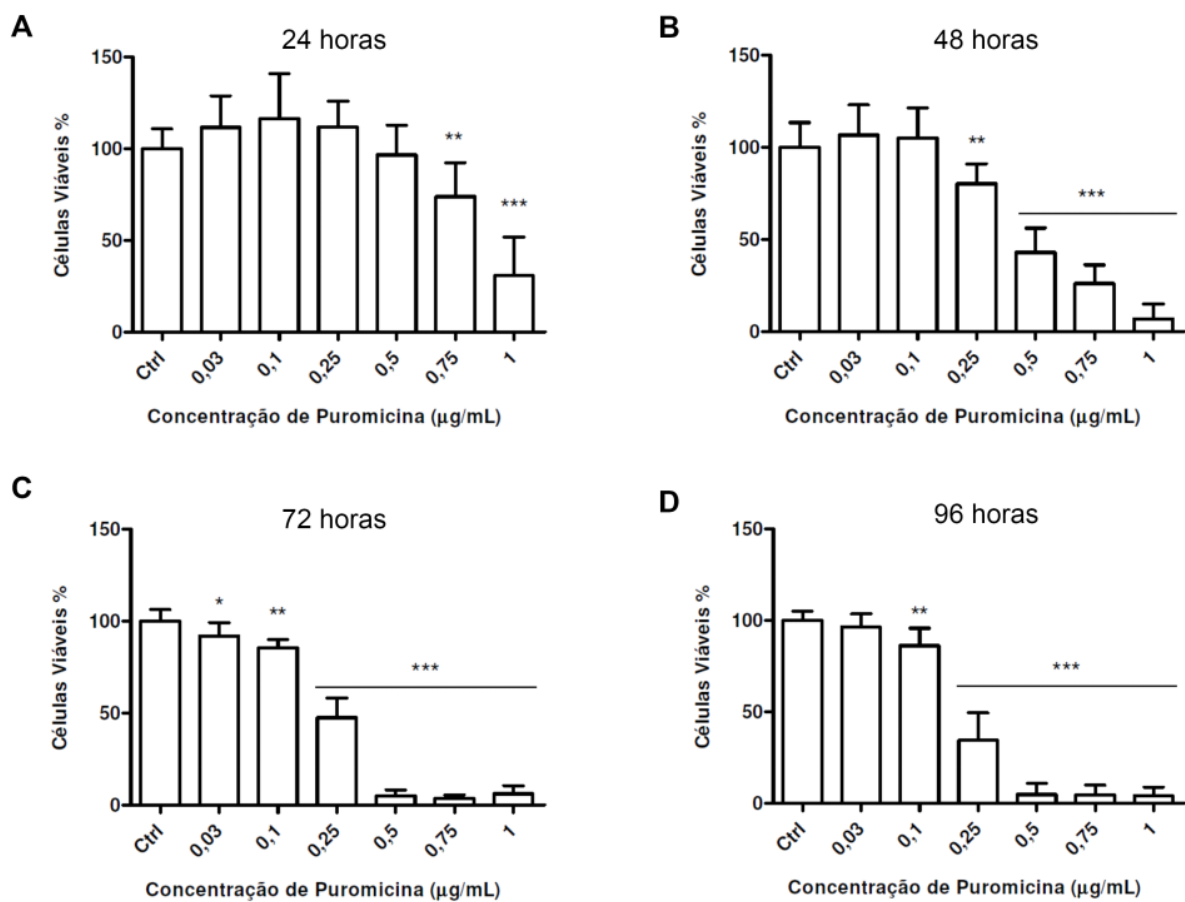


Figura 4.5: Sensibilidade à puromicina da linhagem celular HeLa. Os gráficos demonstram o efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de puromicina (0,03 - 1 µg/mL) por: **A**, 24 horas; **B**, 48 horas; **C**, 72 horas; **D**, 96 horas. A viabilidade celular está expressa como percentual do controle não tratado (média ± DP). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0001$.

4.3 – CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS PROTEICOS

As linhagens geradas para esse estudo foram analisadas quanto à produção da proteína EGFP ou da proteína quimérica BRCA1:EGFP.

A avaliação foi feita através da análise das proteínas presentes no extrato celular total das linhagens desenvolvidas por *western blotting* e imunodeteção para EGFP e β -actina (controle de carregamento).

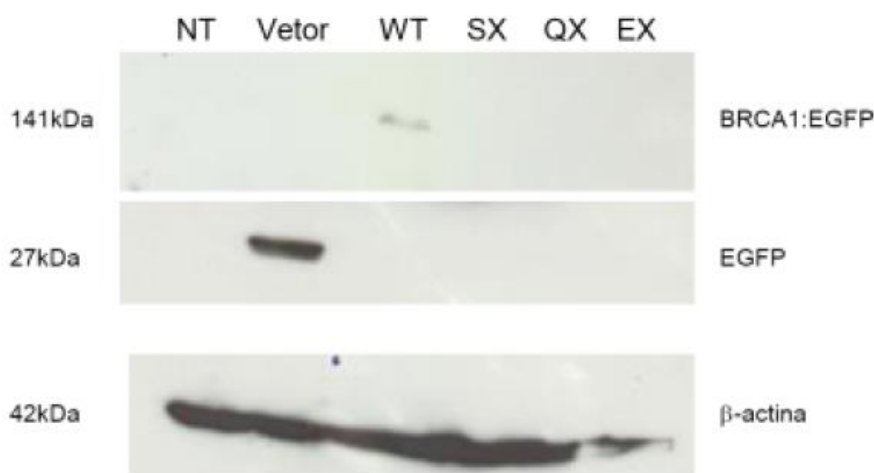


Figura 4.6: Análise dos níveis proteicos por *western blotting* e imunodeteção para observação da proteína de fusão BRCA1:EGFP e EGFP nas linhagens celulares do estudo. O painel acima apresenta os níveis celulares das proteínas BRCA1:EGFP (141kDa), EGFP (27kDa) e, do controle de carregamento, β -actina (42kDa) das linhagens: HeLa NT, HeLa Vetor, HeLa WT, HeLa SX, HeLa QX, ou HeLa EX.

Os resultados apresentados na figura 4.6 revelam a presença de EGFP e BRCA1:EGFP nos extratos celulares das linhagens HeLa Vetor e HeLa WT, respectivamente. Conforme o esperado, a proteína EGFP apresenta peso molecular de cerca de 27kDa, enquanto a proteína quimérica BRCA1:EGFP apresenta peso de cerca de 141kDa. O mesmo não foi observado para as linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX que não apresentam níveis detectáveis de proteína quimérica.

4.4 – ENSAIOS PARA INDUÇÃO DE TRANSLEITURA

Os ensaios de indução de transleitura foram desenvolvidos com base na detecção da proteína de fusão BRCA1:EGFP, utilizando diferentes abordagens. As linhagens celulares carregando ou não o códon de parada prematura, foram expostas

ao tratamento com 300µg/mL de G418 por 48 horas, como determinado pelos ensaios de citotoxicidade. Os níveis de transleitura foram avaliados por detecção da fluorescência emitida por EGFP, utilizando as técnicas de microscopia confocal, citometria de fluxo; análises por *western blotting* e imunodetecção foram usados para determinação dos níveis proteicos, como descrito a seguir.

4.4.1 – MICROSCOPIA CONFOCAL

As imagens capturadas na rotina de microscopia confocal correspondem a células previamente fixadas e marcadas com DAPI, para identificação do núcleo. A aquisição foi conduzida nos mesmos parâmetros para todas as análises.

Os resultados apresentados na ausência de G418 mostraram ausência de fluorescência detectável para a linhagem HeLa NT (Fig. 4.7). Foi possível observar intensa emissão de fluorescência para as linhagens HeLa Vetor e HeLa WT (Fig. 4.7 e 4.8), indicando a presença da proteína EGFP ou a proteína quimérica BRCA1:EGFP. Como esperado, não foi possível detectar emissão de fluorescência para nenhuma das linhagens que continham variantes de *BRCA1* (HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX; Fig. 4.8 e 4.9).

Após o tratamento com G418, não foram observadas alterações nos padrões de fluorescência das linhagens HeLa NT, HeLa Vetor e HeLa WT (Fig. 4.7 e 4.8).

Nas linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX foi possível observar a restauração da emissão de fluorescência (Fig. 4.8 e 4.9). No entanto, existe uma evidente variação da intensidade de fluorescência entre as linhagens. As linhagens HeLa SX e HeLa EX (Fig. 4.8 e 4.9) apresentam intensidades de restauração semelhantes. Entretanto, a linhagem HeLa QX (Fig. 4.9) apresenta uma emissão de fluorescência menor do que as outras linhagens.

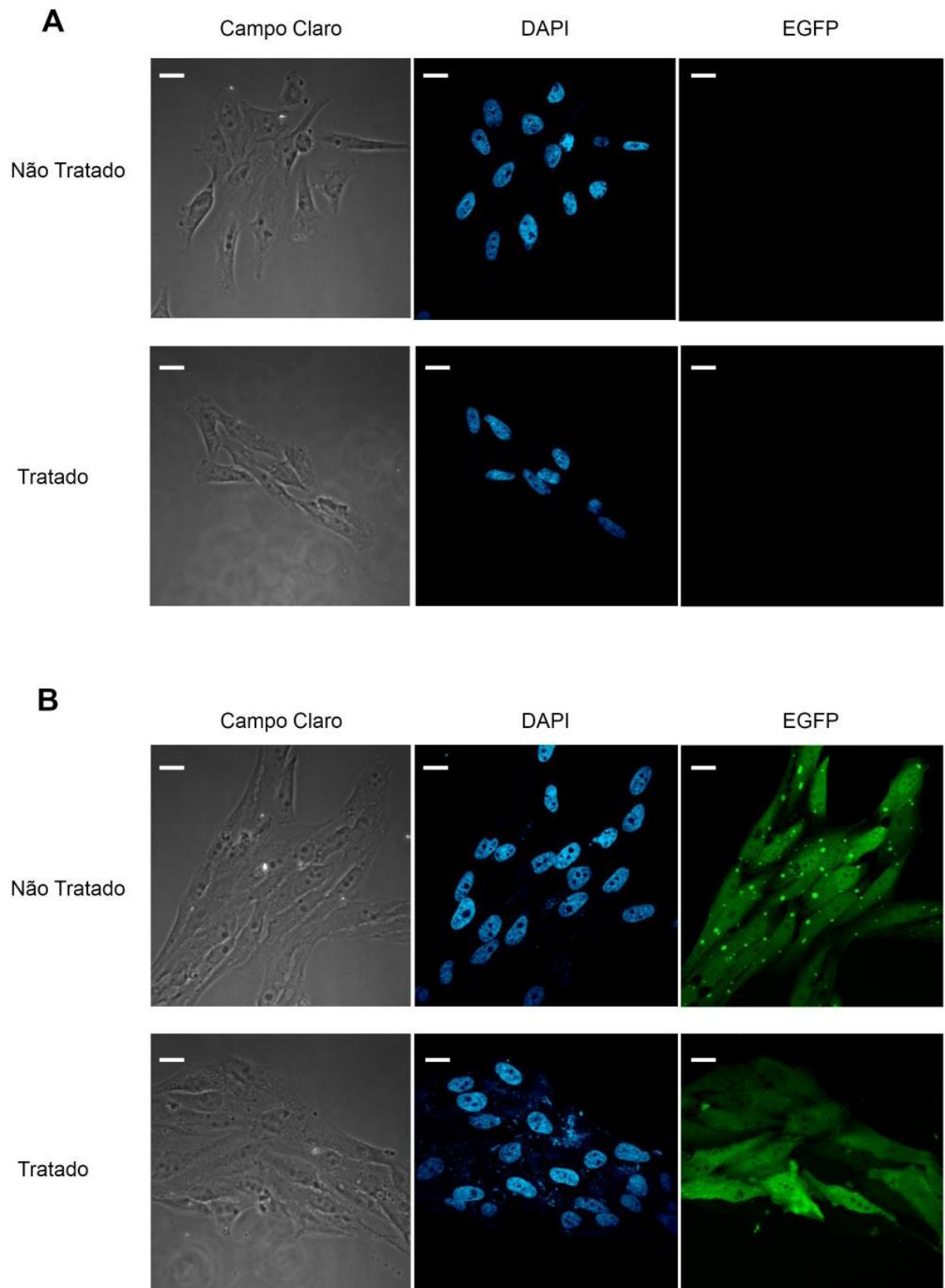


Figura 4.7: Análise de transleitura por microscopia confocal. Avaliação dos níveis proteicos de EGFP (verde) nas linhagens estudadas (A, HeLa NT; B, HeLa Vetor) tratadas ou não com G418. Núcleos marcados com DAPI (Azul). A barra desenhada representa 20 μ m.

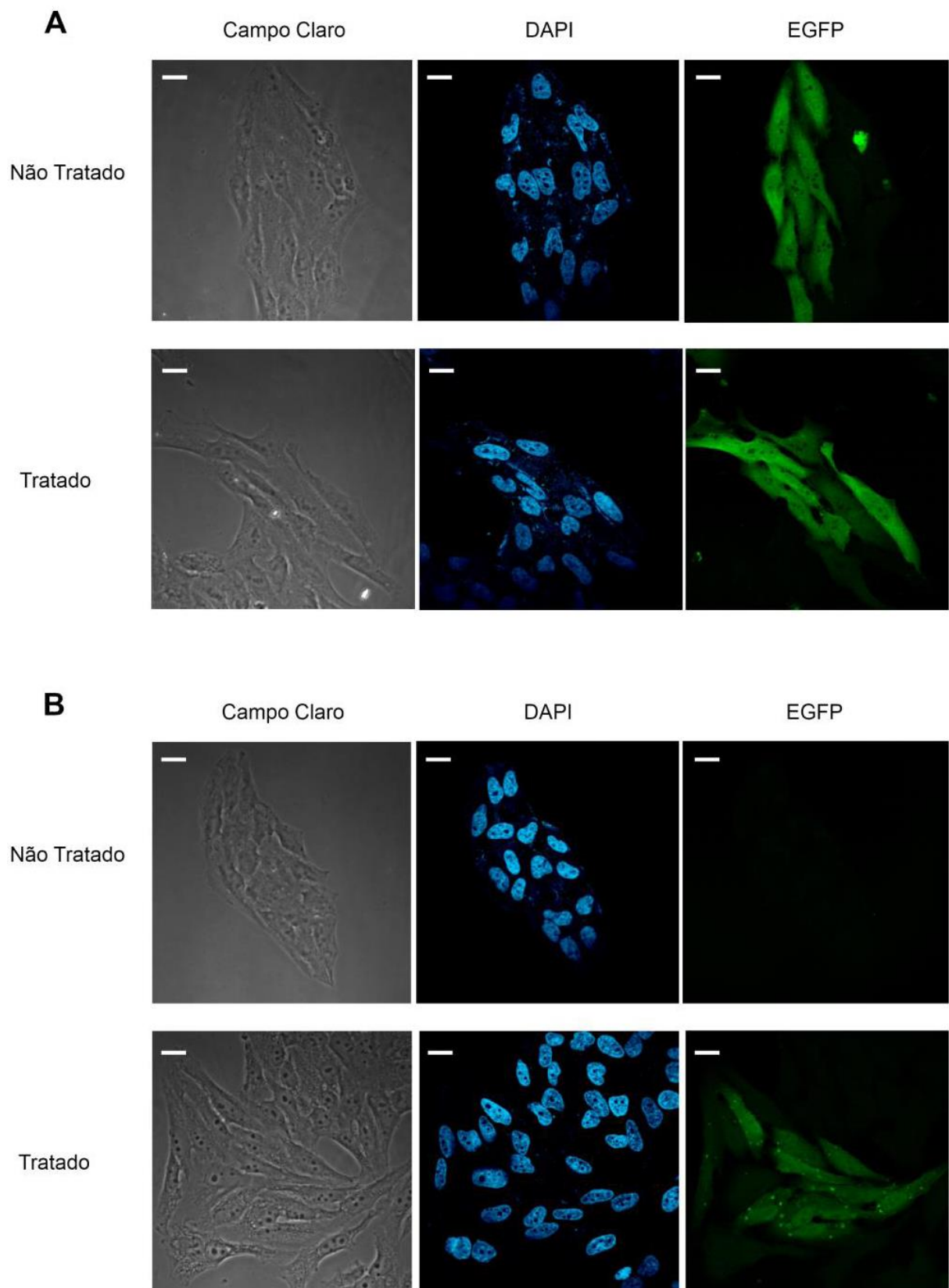


Figura 4.8: Análise de transleitura por microscopia confocal. Avaliação dos níveis proteicos de EGFP (verde) nas linhagens estudadas (A, HeLa WT; B, HeLa SX) tratadas ou não com G418. Núcleos marcados com DAPI (Azul). A barra desenhada representa 20 μ m.

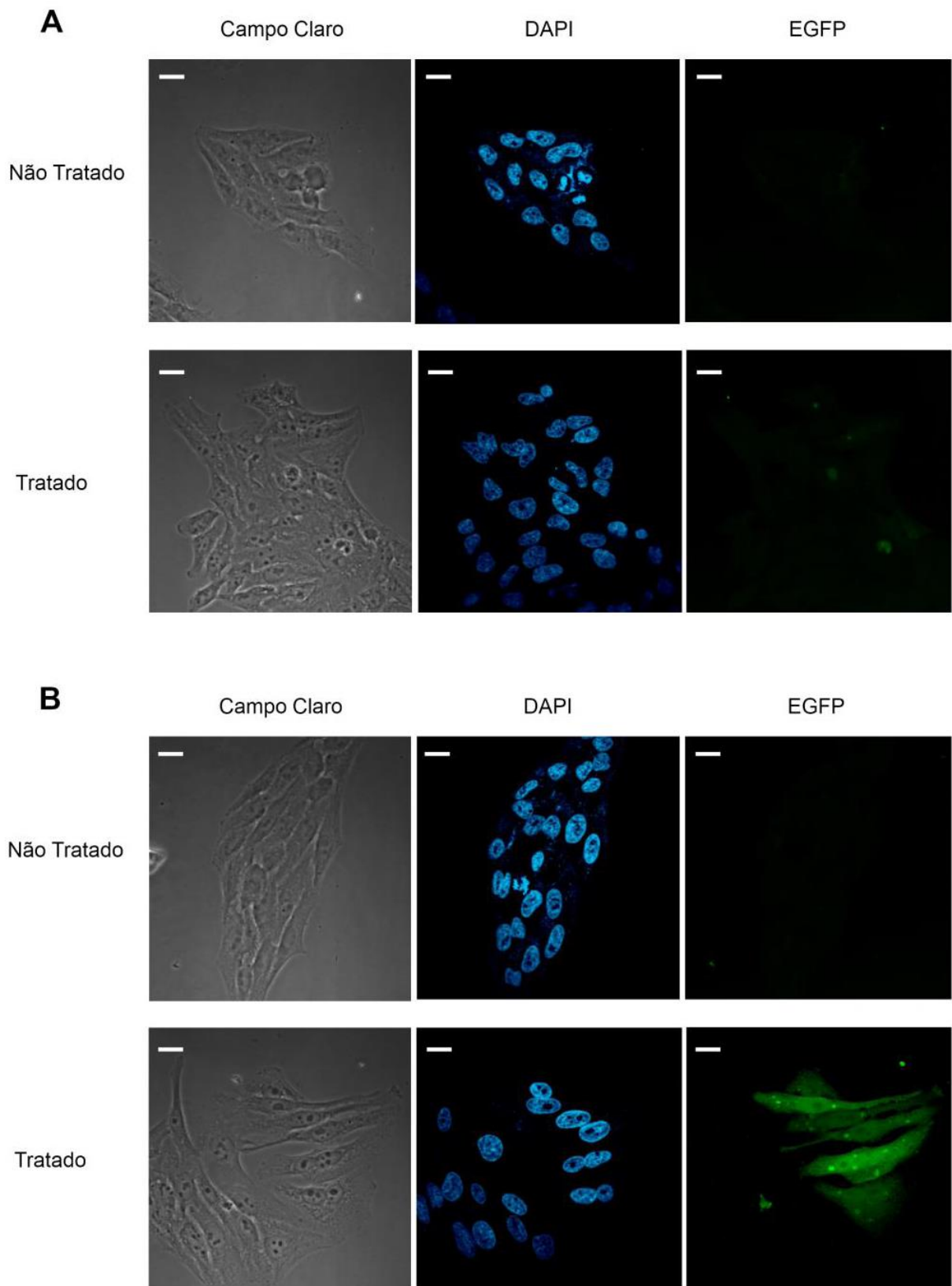


Figura 4.9: Análise de transleitura por microscopia confocal. Avaliação dos níveis proteicos de EGFP (verde) nas linhagens estudadas (A, HeLa QX; B, HeLa EX) tratadas ou não com G418. Núcleos marcados com DAPI (Azul). A barra desenhada representa 20 μ m.

4.3.2 – CITOMETRIA DE FLUXO

As análises feitas por citometria de fluxo avaliam a emissão de fluorescência verde produzida pela proteína EGFP ou pela proteína quimérica BRCA1:EGFP nas linhagens do estudo. A representação gráfica dos resultados (Fig. 4.10 e 4.11) foi dividida em duas regiões, M1 e M2. A região M1 foi definida como aquela que compreende o padrão de fluorescência das células controle (HeLa NT), enquanto a região M2 delimita as populações com uma emissão de fluorescência superior ao controle, correspondente à presença de EGFP ou a quimera BRCA1:EGFP. Os resultados apresentados a seguir são representativos de três experimentos independentes.

Na ausência de tratamento, observa-se que as células da linhagem HeLa NT, utilizada como controle, concentra-se na região M1 (Fig. 4.10). Enquanto que as células das linhagens HeLa Vetor e HeLa WT concentram-se na região M2 e apresentam dois picos distintos (Fig. 4.10).

A figura 4.11 mostra que as células das linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX concentram-se na região M1, sugerindo a não produção da proteína cadeia completa BRCA1:EGFP.

As linhagens foram avaliadas na presença de G418 nas condições previamente estabelecidas. As células das linhagens HeLa NT, HeLa Vetor e HeLa WT apresentam uma variação discreta na distribuição de suas populações entre as regiões M1 e M2.

Por outro lado, com o mesmo tratamento, as linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX apresentaram um aumento na população de células identificadas na região M2. Observou-se uma alteração na distribuição das populações entre as regiões M1 e M2 para as diferentes linhagens estudadas - todas indicando um deslocamento das células para a região M2. A linhagem HeLa EX tratada com G418 mostra o maior deslocamento da população para a região M2(12,2%), seguida pelas linhagens HeLa QX (10,6%) e HeLa SX (9,9%). No entanto, a intensidade da emissão de fluorescência observada na linhagem HeLa SX apresenta um padrão singular quando comparada as linhagens HeLa QX e HeLa EX, que apresentam padrões semelhantes. O padrão exibido pela linhagem HeLa SX é caracterizado pela presença de subpopulações com intensidades de fluorescência superiores as exibidas pelas subpopulações das outras linhagens.

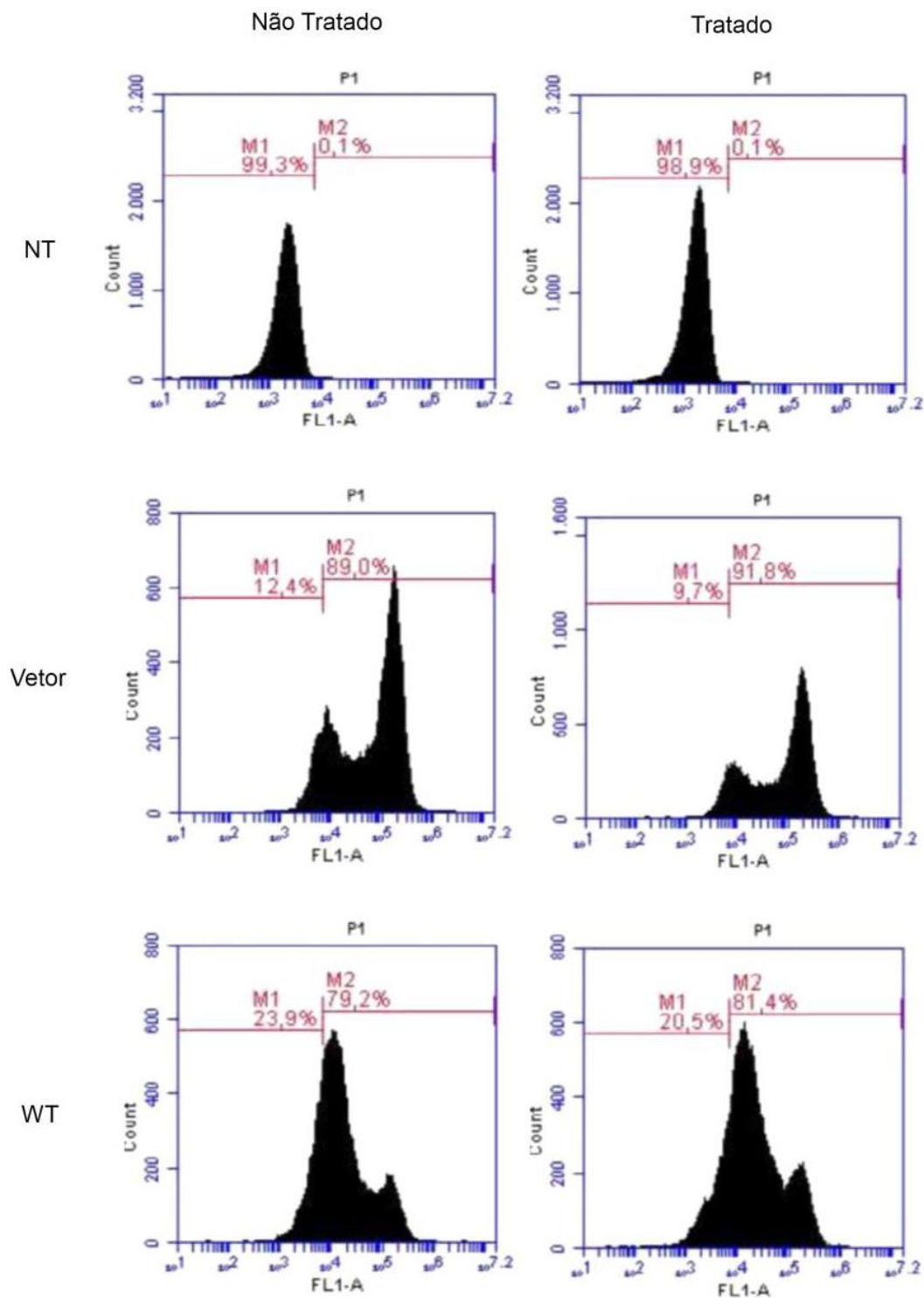


Figura 4.10: Indução de transleitura por G418 em diferentes linhagens. O histograma demonstra a detecção de fluorescência por citometria de fluxo nas linhagens HeLa NT, HeLa Vetor e HeLa WT, tratadas ou não com G418. As regiões M1 e M2 foram selecionadas de acordo com os padrões apresentados pela linhagem controle (linhagem HeLa NT). Considera-se que as células presentes na região M2 emitem fluorescência em intensidade superior a condição controle.

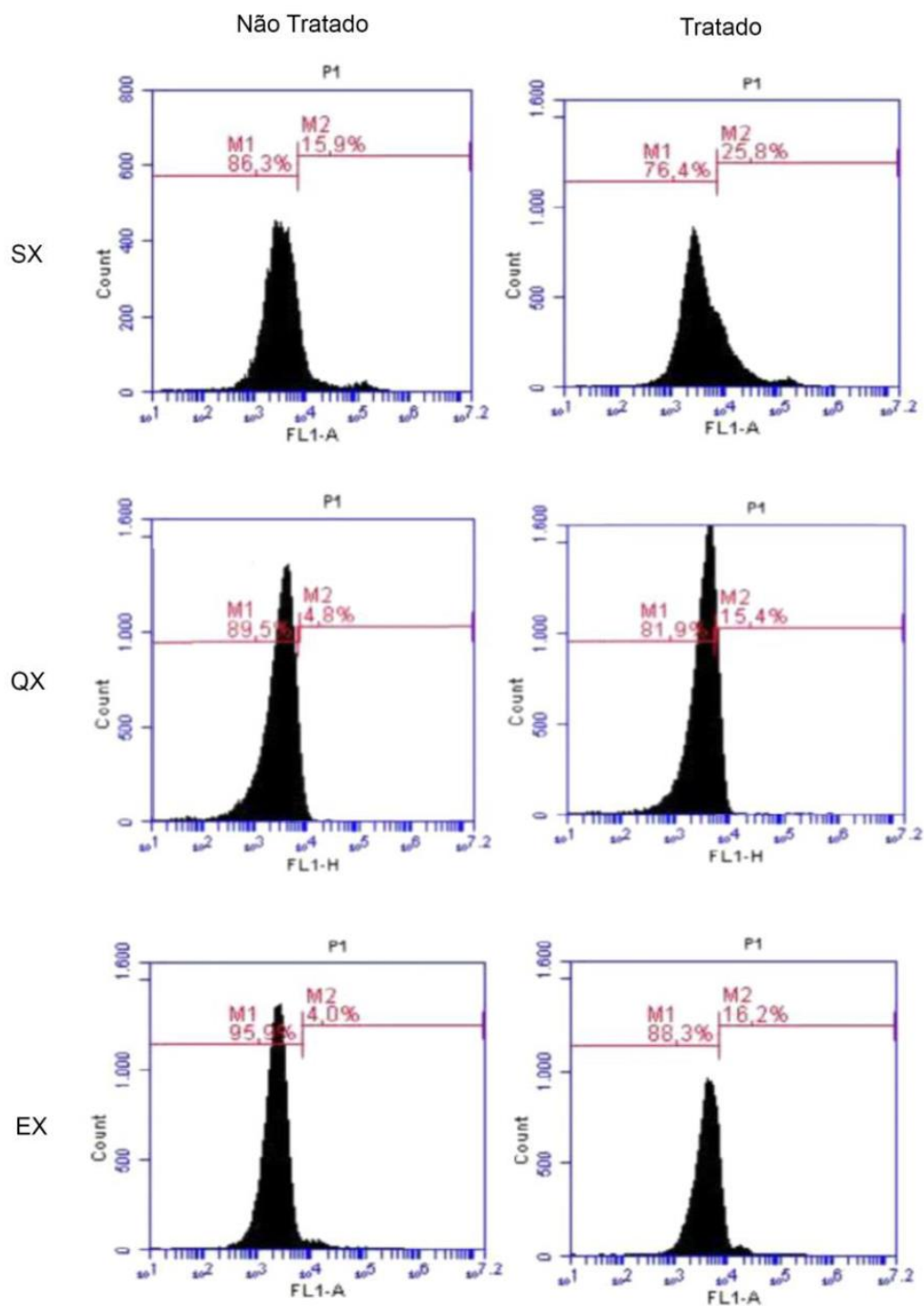


Figura 4.11: Indução de transleitura por G418 em diferentes linhagens. O histograma demonstra a detecção de fluorescência por citometria de fluxo nas linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX, tratadas ou não com G418. As regiões M1 e M2 foram selecionadas de acordo com os padrões apresentados pela linhagem controle (linhagem HeLa NT, Fig. 4.10). Considera-se que as células presentes na região M2 emitem fluorescência em intensidade superior a condição controle.

4.3.3 – WESTERN BLOTTING E IMUNODETECÇÃO

Extratos de proteínas totais provenientes de células, previamente tratadas com G418 nas concentrações e tempos estabelecidos, foram analisados por *Western blotting* e imunodeteção para EGFP e β -actina (controle de carregamento).

Na figura 4.12 observa-se a presença de EGFP e BRCA1:EGFP nas linhagens HeLa Vetor e HeLa WT, respectivamente. No entanto, não foi possível detectar a presença de fragmentos proteicos correspondentes ao peso molecular da proteína de fusão BRCA1:EGFP nas linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX após o tratamento.

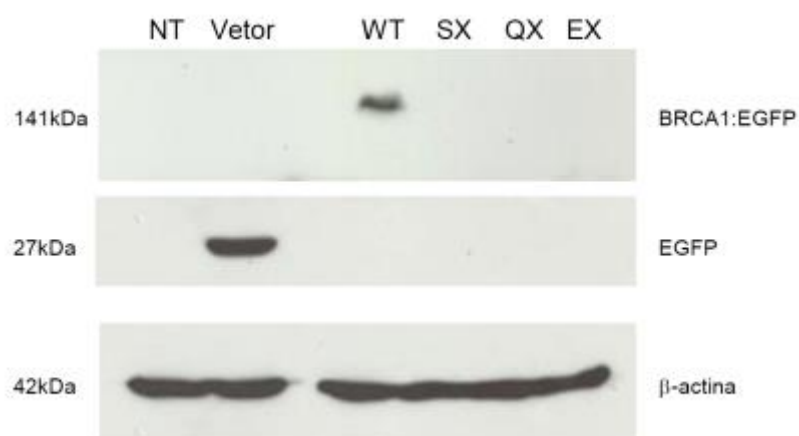


Figura 4.12: Análise da indução de transleitura após tratamento com G418 por *Western blotting* e imunodeteção. O painel acima apresenta os níveis celulares das proteínas BRCA1:EGFP (141kDa), EGFP (27kDa) e, do controle de carregamento, β -actina (42kDa) das linhagens: HeLa NT (NT), HeLa Vetor (Vetor), HeLa WT (WT), HeLa SX (SX), HeLa QX (QX), ou HeLa EX (EX). Todas as linhagens foram tratadas com G418 nas concentrações e tempos previamente estabelecidos.

5 – DISCUSSÃO

Desde 1994, quando da clonagem posicional de *BRCA1* e sua associação à SHCMO, houve um grande empenho para que o gene fosse sequenciado em indivíduos com histórico familiar de câncer de mama e ovário (Lee *et al.*, 2010; Miki *et al.*, 1994). A partir dessa iniciativa foram identificadas diversas mutações fortemente associadas ao câncer, dentre elas as que levam à terminação prematura de *BRCA1* (Dapic; Monteiro, 2006; Lee *et al.*, 2010).

Dos quase 1800 variantes de *BRCA1* descritos na população, cerca de 70% resultam na geração de proteínas truncadas (<http://www.research.nhgri.nih.gov/bic/>). Esses variantes incluem mutações em regiões regulatórias, alterações em sítios de *splicing*, grandes rearranjos, grandes ou pequenas deleções ou inserções, além de mutações sem sentido (Dapic; Monteiro, 2006; Szabo; Worley; Monteiro, 2004).

As mutações sem sentido no gene *BRCA1* são caracterizadas pelo surgimento de um códon de parada prematura, gerado a partir da troca de um nucleotídeo no códon afetado. As proteínas truncadas oriundas desses variantes apresentam grandes limitações em sua atividade biológica por corromperem a estrutura de domínios importantes como, por exemplo, os BRCTs (Monteiro; August; Hanafusa, 1996; Szabo; Worley; Monteiro, 2004).

Para os pacientes carreadores de mutações sem sentido pouco pode ser feito para reduzir o risco de desenvolvimento de câncer de mama e ovário (Dapic; Monteiro, 2006; Sifri; Gangadharappa; Acheson, 2004). Hipoteticamente, restaurar os níveis proteicos de *BRCA1* cadeia completa nesses indivíduos pode representar uma possível estratégia profilática.

Estudos recentes tem apresentado a transleitura como uma alternativa para a síntese de proteínas cadeia completa a partir de variantes sem sentido (Allamand *et al.*, 2008; Bellais *et al.*, 2010; Bidou *et al.*, 2012; Bordeira-Carriço *et al.*, 2012; Diop; Chauvin; Jean-Jean, 2007; Floquet; Rousset; Bidou, 2011; Fuchshuber-Moraes *et al.*, 2011; Heier; DiDonato, 2009; Kellermayer, 2006; Malik *et al.*, 2010; Mankin; Liebman, 1999; Salas-Marco; Bedwell, 2005). Essa abordagem foi aplicada a modelos *in vitro* e *in vivo* de diversas desordens genéticas utilizando indutores de transleitura, como os aminoglicosídeos. Foi demonstrado que essa classe de antibióticos bactericidas é capaz de suprimir códons de parada prematura em diferentes níveis (Bidou *et al.*, 2012; Keeling; Bedwell, 2005; Lee; Dougherty, 2012).

Estudos de transleitura realizados *in vitro* relatam uma restauração nos níveis proteicos e uma recuperação na atividade biológica da proteína alvo, em consonância com os modelos *in vivo*, que descrevem uma melhora nas características fenotípicas do camundongo, fato atribuído à restauração da atividade da proteína estudada (Floquet *et al.*, 2011; Fuchshuber-Moraes *et al.*, 2011; Heier; DiDonato, 2009; Zilberberg; Lahav; Rosin-arbesfeld, 2010).

Os ensaios clínicos conduzidos para distrofia muscular de Duchenne e fibrose cística apresentam melhora do quadro clínico e ganho na qualidade de vida dos portadores de mutações sem sentido. Como esperado, pacientes com outros tipos de mutação não tiveram benefícios do tratamento com aminoglicosídeos, demonstrando que a restauração da função através da transleitura é específica para mutações sem sentido (Bidou *et al.*, 2004, 2012; Lee; Dougherty, 2012).

No panorama oncológico, por ora, dois genes foram avaliados: *TP53* e *APC*. Keeling e Bedwell (2002) mostraram a indução de transleitura em um variante de *TP53*, porém não avaliaram a atividade da proteína restaurada. Floquet e colaboradores (2011) avaliaram onze variantes de *TP53* e observaram intensidades variáveis na indução de transleitura. No entanto, mesmo os variantes com baixos níveis de indução apresentaram restauração da atividade biológica e da função supressora de tumor de p53. Recentemente Zilberberg e colaboradores (2010) mostraram que camundongos carregando uma mutação sem sentido no gene *APC*, quando tratados com aminoglicosídeos, apresentaram melhora no quadro clínico e atraso no processo tumorigênico.

O nosso estudo objetivou avaliar a capacidade do aminoglicosídeo G418 em induzir a transleitura do códon de parada prematura de variantes do gene *BRCA1* em um modelo *in vitro*. O modelo se baseia no uso de construções vetoriais para o desenvolvimento de linhagens que, uma vez caracterizadas, serão utilizadas para a avaliação da indução de transleitura.

A utilização de construções contendo mutações sem sentido para a criação do modelo não é inviabilizada pela existência do sistema de vigilância NMD, pois a ativação dessa via ocorre de maneira dependente da formação das junções éxon-éxon. Esses complexos proteicos são formados durante a ação do mecanismo de *splicing*, processo que não ocorre em sistemas de expressão provenientes de construções vetoriais. Como o sistema NMD não é ativado, o RNAm contendo o variante sem sentido não é degradado, mantendo os níveis celulares estáveis (Fuchshuber-Moraes *et al.*, 2011; Shibuya *et al.*, 2004).

Os variantes do estudo foram selecionados de forma a contemplarem os três códons de parada universais (UGA, UAG, UAA). A literatura descreve que existem variações nas taxas de indução de transleitura de acordo com o códon de parada envolvido. Por essa razão foram selecionados os variantes S1457X (UGA), Q1785X (UAG), E1836X (UAG) e Y1853X (UAA). (Keeling; Bedwell, 2005; Manuvakhova; Keeling; Bedwell, 2000).

A eficiência dos aminoglicosídeos em promover a transleitura de códons de parada prematura em células humanas, está diretamente ligada a características do códon, tais como a sequência do códon e bases vizinhas a ele. Alguns trabalhos demonstraram que os diferentes códons de parada apresentam eficiências distintas para a terminação da tradução, estabelecendo a prevalência: UGA < UAG < UAA. Além disso, o nucleotídeo +1, posicionado imediatamente após o códon de parada (na posição 3'), parece contribuir de maneira importante para a eficiência no processo de parada da tradução e consequentemente nos eventos de transleitura (Manuvakhova; Keeling; Bedwell, 2000; Salas-Marco; Bedwell, 2005).

O contexto apresentado pelo variante S1457X (5' ACU **UGA** CAG 3') encontra-se em consonância com a descrição de Floquet e colaboradores (2012), que descreve uma sequência consenso mínima, 5' NNU **UGA** CNN 3' (onde N é qualquer um dos quatro nucleotídeos possíveis), que resulta na melhor indução de transleitura em células humanas.

Os variantes Q1785X e E1836X possuem o mesmo códon de parada (UAG), que apresenta indução de transleitura intermediária quando comparado aos demais códons (Keeling; Bedwell, 2002; Manuvakhova; Keeling; Bedwell, 2000). No entanto, o nucleotídeo na posição +1 difere entre os variantes, sendo uma guanina para o Q1785X (5' UAG G 3') e uma uracila para o E1836X (5' UAG U 3'). Segundo Manuvakhova, Keeling e Bedwell (2000), o contexto 5' **UAG** U 3' apresenta uma taxa de indução duas vezes maior do que o contexto 5' **UAG** G 3'.

O variante Y1853X apresenta o códon de parada com a menor indução de transleitura descrita na literatura: UAA. Contudo, ele apresenta uma citosina na posição do nucleotídeo +1 (5' UAA C 3'), responsável pela maior indução de transleitura dentre os contextos envolvendo o códon de parada UAA (Keeling; Bedwell, 2002; Manuvakhova; Keeling; Bedwell, 2000).

Segundo as informações da literatura, os variantes selecionados para o presente estudo apresentariam intensidades de indução de transleitura diferentes, de acordo com a seguinte ordem: S1457X > E1836X > Q1785X > Y1853X.

Os variantes do estudo foram gerados e clonados em dois contextos diferentes para a avaliação da indução de transleitura: GAL4:BRCA1 e BRCA1:EGFP.

O contexto GAL4:BRCA1 foi gerado para avaliar a atividade biológica de BRCA1 considerando sua capacidade de ativação transcricional. O ensaio que avalia tal capacidade foi validado por Carvalho e colaboradores (2007) para a região entre os éxons 13 e 24 de *BRCA1*. Essa mensuração funcional de BRCA1 pode ser considerada uma avaliação confiável da integridade da região C-terminal da proteína, região que contém domínios essenciais para função supressora de tumor de BRCA1 (Carvalho; Couch; Monteiro, 2006; Hayes *et al.*, 2000; Monteiro; August; Hanafusa, 1996).

Entre os variantes selecionados para o estudo, somente o variante Y1853X foi previamente avaliado quanto a sua função biológica, descrita como extremamente reduzida no ensaio de ativação transcricional. Por conta dessa atividade limitada, esse variante é largamente utilizado como controle negativo em diferentes ensaios (Carvalho; Couch; Monteiro, 2006; Carvalho *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2010; Mirkovic *et al.*, 2004; Ouchi *et al.*, 1998).

O contexto BRCA1:GFP foi gerado com a finalidade de utilizar a detecção da proteína verde fluorescente EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) como um parâmetro para estimar a transleitura de variantes de BRCA1, gerando a proteína cadeia completa, funcionando como um sistema repórter. A presença de um códon de parada prematura nos variantes de *BRCA1* impede a tradução da sequência de EGFP e, por conseguinte, quando excitado, não há fluorescência. Uma vez que o códon de parada seja translido, a fluorescência emitida por EGFP passa a ser detectada.

Como dito anteriormente, o variante Y1853X apresentou dificuldades na sua rotina de geração e clonagem. Quando os impedimentos técnicos foram transpostos, as demais linhagens já haviam sido geradas e a investigação da transleitura já se encontrava em estágio avançado.

As linhagens celulares desenvolvidas para o estudo, contendo a sequência de EGFP ou o contexto BRCA1:EGFP, foram caracterizadas quanto à produção de EGFP ou da proteína quimérica. Os ensaios de *western blotting* e imunodetecção não identificaram a presença BRCA1:EGFP ou EGFP para as linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX (Fig. 4.6).

Como esperado, a presença do códon de parada prematura nas posições 1457, 1785 ou 1836 de cada um dos variantes acarreta a interrupção da tradução completa do contexto BRCA1:EGFP. Sabendo-se que o anticorpo utilizado para a detecção da proteína de fusão é específico para sua região C-terminal (EGFP), também não foi possível identificar a proteína truncada, como ilustra a figura 4.1.

Em paralelo, foram realizados experimentos para determinação das concentrações e tempos máximos de tratamento com aminoglicosídeos. Foi estabelecido como ponto de corte uma redução média de até 15% da viabilidade celular que não apresentasse diferença estatística quando comparada ao controle, como descrito por Fuchshuber-Moraes e colaboradores (2011).

O perfil de citotoxicidade demonstrado pelas células tratadas com puromicina indica que a linhagem HeLa é sensível ao fármaco mesmo em baixas concentrações (Fig. 4.5). Além disso, segundo dados da literatura, a puromicina induz baixos níveis de transleitura, o que desaconselha sua escolha como agente indutor de transleitura para o estudo (Keeling; Bedwell, 2005).

Outro ponto, diz respeito ao vetor pQCXIH que confere a célula transduzida resistência à higromicina B, sendo esse o fármaco de seleção para geração das linhagens estáveis. Os dados obtidos no ensaio de citotoxicidade serviram como referência para a escolha da concentração que foi utilizada para a seleção das linhagens estáveis. Por esse motivo, o aminoglicosídeo higromicina B foi retirado dos ensaios de indução de transleitura (Fig. 4.4).

As células tratadas com gentamicina apresentam um perfil de sensibilidade dentro dos critérios previamente estabelecidos, sendo possível identificar concentrações e tempos de tratamento adequados para os ensaios de transleitura (Fig. 4.3). Por ser um fármaco aprovado para o uso clínico, diversos estudos avaliaram com sucesso seu potencial de indução de transleitura (Bellais *et al.*, 2010; Bidou *et al.*, 2004; Blau *et al.*, 2003; Floquet *et al.*, 2011, 2012; Fuchshuber-Moraes *et al.*, 2011; Heier; DiDonato, 2009; Malik *et al.*, 2010, 2010).

De acordo com Heier e colaboradores (2009), G418 demonstra um efeito mais potente em relação à gentamicina na indução de transleitura em modelo experimental *in vitro* e *in vivo* de atrofia muscular espinhal. Nesse estudo foi observado *in vivo* que, após o tratamento com 300µg/mL de G418 por 24 horas, um aumento de cerca de três vezes nos níveis de proteína quando comparado com o tratamento com 1000µg/mL de gentamicina, além da melhoria do quadro clínico da cobaia.

De forma semelhante, Sangkuhl e colaboradores em 2004 demonstraram que G418 induziu níveis de transleitura cerca de quatro vezes maior que a gentamicina em um códon de parada prematura no receptor de vasopressina V2. Fuchshuber-Moraes e colaboradores (2011) observaram que os níveis de transleitura induzidos por 30µg/mL G418 eram comparáveis àqueles induzidos por gentamicina em uma concentração 10 vezes maior (300µg/mL).

Por outro lado, Zilberberg e colaboradores (2010) demonstraram em um modelo experimental de câncer colorretal que o tratamento com gentamicina induziu a transleitura de um códon de parada prematura do gene *APC*, enquanto G418 não foi capaz de induzir transleitura. Na mesma direção, Buck e colaboradores (2009) também demonstraram que G418 não induziu transleitura do códon de parada prematura do gene *MCM*, causador da acidúria metilmalônica, enquanto que a gentamicina restaurou níveis proteicos, reconstituindo parcialmente os níveis da proteína alvo.

Para o estudo do modelo de transleitura de *BRCA1*, o fármaco de escolha foi o G418. No entanto, devido à divergência de resultados encontrados na literatura, seria importante considerar o potencial de indução de transleitura da gentamicina em avaliações futuras.

As células tratadas com G418 apresentaram um perfil de sensibilidade que permitiu a seleção de condições adequadas de tratamento (Fig. 4.2). Apesar de estarem dentro da faixa de aceitação estipulada, células tratadas com 30µg/mL ou 100µg/mL por 72 horas apresentaram alterações morfológicas importantes e intensa redução de aderência. Desta forma, essas condições foram excluídas do estudo e foram estabelecidos tratamentos por 48 horas com concentrações máximas de 300µg/mL de G418.

Para avaliação dos ensaios de transleitura foram utilizadas três diferentes abordagens sendo um método quantitativo (citometria de fluxo) e dois métodos qualitativos (microscopia confocal e *western blotting* e imunodetecção).

Na avaliação por microscopia confocal, foi observado que após o tratamento com G418, houve restauração da fluorescência de EGFP nas linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX. Essa observação sugere que ocorreu a transleitura do códon de parada prematura dos variantes expressos pelas linhagens (Fig. 4.8 e 4.9).

No entanto, com o tratamento, é possível notar uma evidente variação na intensidade de fluorescência entre as linhagens. Essa variação pode ser atribuída aos diferentes níveis de indução de transleitura observados em cada uma das

linhagens, e essa diferença é uma consequência da eficiência da indução associada a cada códon de parada e sua circunvizinhança. O variante S1457X apresenta a maior intensidade de fluorescência, seguido por E1836X e Q1785X, em consonância com a literatura (Keeling; Bedwell, 2005; Manuvakhova; Keeling; Bedwell, 2000).

Os dados obtidos por microscopia confocal foram corroborados pelos ensaios quantitativos de citometria de fluxo. A análise dos histogramas mostra um deslocamento das populações tratadas com G418 ao longo do eixo das abcissas, o que representa um aumento na população presente na região M2 e, portanto, um aumento na intensidade de fluorescência das células. Diferente das linhagens HeLa NT, HeLa Vetor e HeLa WT, onde se observa um deslocamento discreto da população para a região M2, as linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX apresentam um deslocamento mais intenso (Fig. 4.10 e 4.11).

A figura 4.10 mostra a existência de duas populações para as linhagens HeLa Vetor e HeLa WT, que expressam constitutivamente *EGFP* e *BRCA1:EGFP*, respectivamente. Essa observação pode ser justificada por uma eventual diferença no número de cópias incorporadas ao DNA genômico das células, gerando duas subpopulações distintas, uma com um número maior e outra com um número menor de cópias. A diferença no número de cópias se reflete na quantidade de RNAm produzido e, consequentemente, na quantidade de proteína sintetizada.

A linhagem HeLa NT se apresenta como uma população homogênea por não codificar *EGFP* ou *BRCA1:EGFP* (Fig. 4.10).

Diferente das linhagens HeLa Vetor e HeLa WT, as linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX tem uma distribuição mais homogênea na ausência de tratamento. Ainda que discreta, observa-se uma pequena população na região M2 das linhagens HeLa SX e HeLa EX, muito provavelmente resultado de processo de transleitura natural.

Em condições normais, o término da tradução é um processo muito eficiente, apresentando uma taxa de erro (transleitura) entre 0,01% a 0,1% em células de mamíferos (Bidou *et al.*, 2012; Floquet *et al.*, 2012). O processo de transleitura natural ocorre obedecendo aos mesmos parâmetros da transleitura induzida, apresentando diferença na eficiência do processo de acordo com o códon de parada envolvido e sua circunvizinhança (Manuvakhova; Keeling; Bedwell, 2000).

O variante Q1785X, diferente dos variantes S1457X e E1836X, apresenta um contexto de códon de parada (5' UGA G 3') menos propenso à transleitura natural, o que justificaria a ausência de qualquer população na região M2 (Fig. 4.11).

Quando do tratamento com G418, as populações transclidas das linhagens HeLa SX, HeLa QX e HeLa EX se distribuem ao longo da abcissa, sugerindo a existência de subpopulações distintas com diferentes números de cópias *BRCA1:EGFP* incorporadas, de forma análoga ao observado para as linhagens HeLa Vetor e HeLa WT.

A comparação quantitativa entre as eficiências de transleitura das diferentes linhagens deve ser conduzida com cautela por se tratarem de populações heterogêneas. Somente com o isolamento de clones e caracterização dos níveis de expressão de *BRCA1:EGFP* essa avaliação poderia ser considerada.

Através das análises por *western blotting* e imunodeteção não foi possível observar a recuperação dos níveis proteicos de *BRCA1:EGFP* após o tratamento com G418 (Fig. 4.12). Considerando as observações dos ensaios de microscopia confocal e citometria de fluxo, é possível que os níveis de proteína quimérica presentes no extrato proteico estejam abaixo dos limites de detecção da técnica, seja por características intrínsecas do método ou do perfil de afinidade exibido pelo anticorpo utilizado (anti-EGFP).

O trabalho com clones previamente selecionados em função da sua alta expressão de *BRCA1:EGFP* contornaria o problema, resultando numa maior produção da proteína quimérica. Por outro lado, isso distancia o modelo da realidade uma vez que só são encontrados dois alelos do gene *BRCA1* por genoma.

Outra alternativa seria a condução de um protocolo de imunoprecipitação da proteína quimérica, visando o enriquecimento da amostra, seguida, da análise da mesma por *western blotting* e imunodeteção.

É importante considerar que, apesar do uso comum de G418 e outros aminoglicosídeos em diversos modelos para análise de transleitura, cada modelo desenvolvido apresenta características próprias, estando sujeitos a variações nas concentrações, tempos e condições de tratamento e, por conseguinte, nos resultados obtidos.

Os resultados do nosso estudo demonstram que os variantes sem sentido de *BRCA1* analisados sofrem transleitura no modelo proposto. No entanto, apenas a identificação dos padrões de síntese de *BRCA1* não é suficiente para assegurar a restauração de sua atividade supressora de tumor. É necessário avaliar a restauração da atividade biológica da proteína transclida.

Apesar da transleitura do códon de parada levar a incorporação de um aminoácido que, eventualmente, pode ser diferente do que o codificado de forma

original, essa incorporação não é aleatória. Nilsson e Rydén-Aulin (2003), utilizando um modelo procarioto (*Escherichia coli*), demonstraram que há uma prevalência para a incorporação do aminoácido em função do códon de parada translido: a glutamina é preferencialmente inserida na transleitura dos códons UAG e UAA, enquanto o códon UGA é preferencialmente translido utilizando o triptofano.

Assim, hipoteticamente, três dos quatro variantes analisados nesse estudo dariam origem a proteínas translidas com variações preferenciais em relação à proteína selvagem, como pode ser observado no quadro V. Apenas o variante Q1785X, quando translido, não apresentaria variação em relação à proteína selvagem (Quadro V).

Quadro V: Variantes de BRCA1 selecionados para o estudo e suas substituições após a transleitura.

Posição	Aminoácido Original	Substituição Preferencial*	Classificação Align GV/GD
1457	Serina	Triptofano	C0
1785	Glutamina	Glutamina	-
1836	Ácido Glutâmico	Glutamina	C0
1853	Tirosina	Glutamina	C65

A classificação dos variantes pelo Align GV/GD está discriminada no quadro.

Fonte: BIC; IARC.

* Segundo Nilsson e Rydén-Aulin (2003)

As mutações *missense* são caracterizadas pela substituição de um único nucleotídeo que resulta na troca de um aminoácido na proteína gerada. No entanto, a caracterização dessas mutações como neutras ou deletérias é mais complexa, pois o significado funcional da substituição não pode ser avaliado diretamente (Szabo; Worley; Monteiro, 2004). Não é surpreendente o fato de que a maioria das mutações *missense* reportadas não possuam uma designação clara: deletérias (associadas ao câncer) ou neutras (benignas) - permanecendo assim como variantes não classificados (Carvalho; Couch; Monteiro, 2006).

De maneira a melhor compreender o comportamento desses variantes e, também, contornar a escassez de informações genéticas, diversos ensaios foram desenvolvidos buscando avaliar funcionalmente a proteína e prever sua relevância clínica (Carvalho; Couch; Monteiro, 2006).

Como alternativa aos ensaios funcionais, ferramentas de predição *in silico* também foram desenvolvidas utilizando, por exemplo, o alinhamento de ortólogos e avaliando a variação entre os aminoácidos substituídos. A ferramenta *Align GV/GD*, disponível na base de dados da *International Agency for Research on Cancer - IARC (BRCA1 Cancer Genes IARC database – BRCA1 database; <http://brca.iarc.fr>)*, utiliza essas variáveis em um algoritmo e gera como resultado uma classificação dentro de uma escala preditiva. As classes preditivas resultantes deste modelo formam um espectro (C0, C15, C25, C35, C45, C55 e C65), sendo classificado como C0 o variante com pouca ou nenhuma probabilidade de interferência na função da proteína (perfil neutro) e C65 o variante com grande probabilidade para tal interferência (perfil deletério).

A classificação feita a partir dos variantes S1457X e E1836X sugere que as proteínas transclidas que carregam essa substituição teriam atividade biológica similar à proteína selvagem. Diferente dos demais o variante Y1853X daria origem a uma proteína transclida potencialmente inativa (Quadro V).

Diversos estudos têm demonstrado que, mesmo níveis discretos de síntese da proteína cadeia completa, restauram significativamente as funções da proteína avaliada (Floquet *et al.*, 2011; Heier; DiDonato, 2009; Wilschanski *et al.*, 2000; Zilberberg; Lahav; Rosin-arbesfeld, 2010).

Após a avaliação bioquímica da transleitura dos variantes selecionados para esse estudo, é essencial analisar funcionalmente o produto da transleitura (proteína sintetizada), considerando a atividade biológica de BRCA1. O contexto GAL4:BRCA1 representa uma estratégia de análise funcional da proteína transclida utilizando o ensaio de ativação transcricional (Carvalho *et al.*, 2007).

Outra possível abordagem funcional da proteína transclida é a avaliação da sua capacidade de interação com reconhecidos parceiros proteicos, conduzida através de ensaios de coimunoprecipitação que permitem a sua identificação em complexos naturalmente formados.

O nosso modelo de estudo de transleitura ainda é um modelo restrito, pois considera apenas a região C-terminal de BRCA1. Se por um lado existem vantagens metodológicas destacadas ao se trabalhar com uma porção da proteína, por outro

lado limita-se o poder de conclusão a partir dos dados obtidos. Uma vez concluída, satisfatoriamente, a análise funcional no modelo atual, é natural pensar em expandir o nosso modelo para uma abordagem que considere toda a região codificante da proteína (modelo expandido).

Em um eventual modelo expandido, a avaliação funcional da proteína translada poderia considerar a reconstituição das vias de reparo de dano ao DNA, em especial a recombinação homóloga.

Por exemplo, ao considerarmos o variante Y1853X, que falha no controle do reparo de dano ao DNA, não formando focos nucleares após insultos, seria legítimo especular que, após o tratamento com agente indutor de transleitura, a função de reparo seria recuperada e observar-se-iam focos nucleares e, por conseguinte, restaurar-se-ia sua função no reparo (Coleman; Greenberg, 2011; Nelson; Holt, 2010).

Apesar do interesse clínico no processo de transleitura, o uso rotineiro de aminoglicosídeos como indutores de transleitura é bastante limitado, principalmente pela sua reconhecida ototoxicidade e nefrotoxicidade em tratamentos de longa duração (Durante-Mangoni *et al.*, 2009). Novos fármacos, como o Ataluren® (PTC-124) e o NB54 (Goldmann *et al.*, 2012; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2010; Welch *et al.*, 2007), vem sendo desenvolvidos com base na estrutura e mecanismos de ação dos aminoglicosídeos, na tentativa de alcançar níveis de transleitura ainda melhores e com toxicidade reduzida, criando uma perspectiva terapêutica para doenças genéticas causadas por códons de parada prematura.

O modelo de estudo aqui apresentado pode ser utilizado para avaliação e validação de novos indutores da transleitura de códons de parada prematura em *BRCA1*. A investigação de novos fármacos, como o PTC-124, pode resultar em resultados ainda mais promissores do que os encontrados até o momento.

A avaliação positiva de fármacos que apresentam efeitos colaterais mais brandos pode trazer perspectivas importantes para a profilaxia e tratamento de pacientes carreadores de mutações sem sentido em *BRCA1*.

6 - CONCLUSÕES

- Todos os variantes selecionados para o estudo foram gerados e clonados em dois contextos diferentes.
- Foram desenvolvidas e caracterizadas diferentes linhagens de células HeLa para a composição de um modelo de avaliação de transleitura baseado na produção da químera *BRCA1:EGFP*.
- Foram avaliados os perfis de citotoxicidade de quatro diferentes aminoglicosídeos (G418, gentamicina, higromicina B e puromicina) na linhagem HeLa.
- Foram avaliados três variantes sem sentido de *BRCA1* quanto ao potencial de transleitura induzida pelo aminoglicosídeo G418.
- O aminoglicosídeo G418 foi capaz de induzir transleitura de todos os códons de parada prematura avaliados.
- As análises de transleitura realizadas indicam a produção da proteína quimérica *BRCA1:EGFP* em níveis detectáveis por microscopia confocal e citometria de fluxo.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAMAND, V. *et al.* Drug-induced readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin $\alpha 2$ chain mRNA in CMD myotubes. **The Journal of Gene Medicine**, v. 10, p. 217-224, 2008.

AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 325-330, 2005.

AMRANI, N. *et al.* Aberrant termination triggers nonsense-mediated mRNA decay. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. Pt 1, p. 39-42, 2006.

ANDERSON, S. F. *et al.* BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. **Nature Genetics**, v. 19, n. 3, p. 254-256, 1998.

AUSUBEL, F. M. *et al.* **Short protocols in molecular biology**. 5^a. ed. [S.l.] Wiley, 2002.

BAER, R.; LUDWIG, T. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. **Current opinion in genetics development**, v. 12, n. 1, p. 86-91, 2002.

BAKER, K. E.; PARKER, R. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. **Current opinion in cell biology**, v. 16, p. 293-299, 2004.

BEDWELL, D. M. *et al.* Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. **Nature medicine**, v. 3, n. 11, p. 1280-1284, 1997.

BELLAIS, S. *et al.* In vitro readthrough of termination codons by gentamycin in the Stüve-Wiedemann Syndrome. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 18, n. 1, p. 130-2, jan. 2010.

BIDOU, L. *et al.* Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. **Gene therapy**, v. 11, n. 7, p. 619-27, abr. 2004.

BIDOU, L. *et al.* Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 11, p. 679-88, nov. 2012.

BLAU, H. *et al.* Gentamicin-Induced Correction of CFTR Function in Patients with Cystic Fibrosis and CFTR Stop Mutations. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 15, p. 1433-1441, 2003.

BOCHAR, D. A *et al.* BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. **Cell**, v. 102, n. 2, p. 257-65, 21 jul. 2000.

BORDEIRA-CARRIÇO, R. *et al.* Cancer syndromes and therapy by stop-codon readthrough. **Trends in molecular medicine**, p. 1-12, 5 out. 2012.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRZOVIC, P. S. *et al.* Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 10, p. 833-837, 2001.

BUCK, N. E. *et al.* Stop codon read-through of a Methylmalonic aciduria mutation. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 97, n. 4, p. 244-249, 2009.

CARVALHO, M. A *et al.* Determination of cancer risk associated with germ line BRCA1 missense variants by functional analysis. **Cancer research**, v. 67, n. 4, p. 1494-501, 15 fev. 2007.

CARVALHO, M. A. *et al.* Determination of cancer risk associated with germ line BRCA1 missense variants by functional analysis. **Cancer research**, v. 67, n. 4, p. 1494-501, 15 fev. 2007.

CARVALHO, M. A.; COUCH, F. J.; MONTEIRO, A. N. A. Functional assays for BRCA1 and BRCA2. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 2, p. 298-310, jan. 2006.

CHANG, Y.; IMAM, J. S.; WILKINSON, M. F. The Nonsense-Mediated Decay RNA Surveillance Pathway. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 51-74, 2007.

COLEMAN, K. A; GREENBERG, R. A. The BRCA1-RAP80 complex regulates DNA repair mechanism utilization by restricting end resection. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13669-80, 15 abr. 2011.

CORTEZ, D. *et al.* Requirement of ATM-Dependent Phosphorylation of Brca1 in the DNA Damage Response to Double-Strand Breaks. **Science**, v. 286, n. 5442, p. 1162-1166, 5 nov. 1999.

DAPIC, V.; CARVALHO, M. A.; MONTEIRO, A. N. A. Breast Cancer Susceptibility and the DNA Damage Response. **Cancer Control**, v. 12, n. 2, p. 127-136, 2005.

DAPIC, V.; MONTEIRO, A. N. A. Functional implications of BRCA1 for early detection, prevention, and treatment of breast cancer. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 16, n. 3, p. 233-252, 2006.

DIOP, D.; CHAUVIN, C.; JEAN-JEAN, O. Aminoglycosides and other factors promoting stop codon readthrough in human cells. **Comptes rendus biologies**, v. 330, n. 1, p. 71-9, jan. 2007.

DROST, R. *et al.* BRCA1 RING Function Is Essential for Tumor Suppression but Dispensable for Therapy Resistance. **Cancer Cell**, v. 20, n. 6, p. 797-809, 2011.

DURANTE-MANGONI, E. *et al.* Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 3, p. 201-205, 2009.

EASTON, D. F. *et al.* Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. **The American Journal of Human Genetics**, v. 52, n. 4, p. 678-701, 1993.

FAN, S. *et al.* BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1354-1356, 1999.

FEARON, K. *et al.* Premature Translation Termination Mutations Are Efficiently Suppressed in a Highly Conserved Region of Yeast SteGp , a Member of the ATP-binding Cassette (ABC) Transporter Family *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 27, p. 17802-17808, 1994.

FLOQUET, C. *et al.* Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 8, p. 3350-62, abr. 2011.

FLOQUET, C. *et al.* Statistical analysis of readthrough levels for nonsense mutations in mammalian cells reveals a major determinant of response to gentamicin. **PLoS genetics**, v. 8, n. 3, p. 1-12, 2012.

FLOQUET, C.; ROUSSET, J.-P.; BIDOU, L. Readthrough of premature termination codons in the adenomatous polyposis coli gene restores its biological activity in human cancer cells. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e24125, jan. 2011.

FORD, D. *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. **The American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 3, p. 676-689, 1998.

FRIEDMAN, L. S. *et al.* Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. **Nature Genetics**, v. 8, p. 399 - 404, 1994.

FUCHSHUBER-MORAES, M. *et al.* Aminoglycoside-induced suppression of CYP2C19*3 premature stop codon. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 21, n. 11, p. 694-700, nov. 2011.

GATEI, M. *et al.* Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Kinase and ATM and Rad3 Related Kinase Mediate Phosphorylation of Brca1 at Distinct and. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 20, p. 17276-17280, 2001.

GAYTHER, S. A. *et al.* Rapid detection of regionally clustered germ-line BRCA1 mutations by multiplex heteroduplex analysis. UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group. **The American Journal of Human Genetics**, v. 58, n. 3, p. 451-456, 1996.

GOLDMANN, T. *et al.* A comparative evaluation of NB30, NB54 and PTC124 in translational read-through efficacy for treatment of an USH1C nonsense mutation. **EMBO molecular medicine**, v. 4, n. 11, p. 1186-99, nov. 2012.

GOMES, R.; SKABA, M. M. V. F.; VIEIRA, R. J. DA S. Reinventando a vida : proposta para uma abordagem sócio-antropológica do câncer de mama feminina. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 1, p. 197-204, 2002.

GROEP, P. VAN DER; WALL, E. VAN DER; DIEST, P. J. VAN. Pathology of hereditary breast cancer. **Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc**, v. 34, n. 2, p. 71-88, 2011.

HALL, J. M. *et al.* **Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.Science**AAAS, , 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2270482>>

HAYES, F. *et al.* Functional assay for BRCA1: mutagenesis of the COOH-terminal region reveals critical residues for transcription activation. **Cancer Research**, v. 60, n. 9, p. 2411-2418, 2000.

HEIER, C. R.; DIDONATO, C. J. Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo. **Human molecular genetics**, v. 18, n. 7, p. 1310-22, 1 abr. 2009.

HEIER, C. R.; DIDONATO, C. J. Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo. **Human molecular genetics**, v. 18, n. 7, p. 1310-1322, 1 abr. 2009.

HO, S. N. *et al.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, v. 77, n. 1, p. 51-59, 1989.

HOWARD, M.; FRIZZELL, R. A.; BEDWELL, D. M. Aminoglycoside antibiotics resotre CFTR function by overcoming premature stop mutations. **Nature medicine**, v. 2, n. 4, p. 467-469, 1996.

[HTTP://WWW.CANCER.ORG/](http://www.cancer.org/). **American Cancer Society**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>.

[HTTP://WWW.HGMD.ORG](http://www.hgmd.org). **Human Genome Mutation Database**. Disponível em: <<http://www.hgmd.org>>.

[HTTP://WWW.INCA.GOV.BR/](http://www.inca.gov.br/). **Instituto Nacional de Câncer - INCA**.

[HTTP://WWW.RESEARCH.NHGRI.NIH.GOV/BIC/](http://www.research.nhgri.nih.gov/bic/). **Breast Cancer Information Core**. Disponível em: <<http://www.research.nhgri.nih.gov/bic/>>.

HU, Y.-F. *et al.* Characterization of a novel trans-activation domain of BRCA1 that functions in concert with the BRCA1 C-terminal (BRCT) domain. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 52, p. 40910-5, 29 dez. 2000.

HU, Y.-F.; LI, R. JunB potentiates function of BRCA1 activation domain 1 (AD1) through a coiled-coil-mediated interaction. **Genes & development**, v. 16, n. 12, p. 1509-17, 15 jun. 2002.

HUEN, M. S. Y.; SY, S. M. H.; CHEN, J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 2, p. 138-48, fev. 2010.

HÅKANSSON, S. *et al.* Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer. **The American Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 5, p. 1068-1078, 1997.

IARC. **World Cancer Report 2008**, 2008.

INCA. **Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil**. [S.l: s.n.]. p. 98

INCA. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. [S.l: s.n.]. p. 118

ISKEN, O.; MAQUAT, L. E. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. **Genes & development**, v. 21, n. 15, p. 1833-56, 1 ago. 2007.

KEELING, K. M.; BEDWELL, D. M. Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. **Journal of molecular medicine Berlin Germany**, v. 80, n. 6, p. 367-376, 2002.

KEELING, K. M.; BEDWELL, D. M. Pharmacological Suppression of Premature Stop Mutations that Cause Genetic Diseases. **Current Pharmacogenomics**, v. 3, p. 1-11, 2005.

KELLERMAYER, R. Translational readthrough induction of pathogenic nonsense mutations. **European journal of medical genetics**, v. 49, n. 6, p. 445-50, 2006.

KEREM, E. *et al.* Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. **Lancet**, v. 372, n. 9640, p. 719-27, 30 ago. 2008.

KERVESTIN, S.; JACOBSON, A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 11, p. 700-712, 2012.

KHAJAVI, M.; INOUE, K.; LUPSKI, J. R. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 14, n. 10, p. 1074-81, out. 2006.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 4, p. 820-823, 1971.

KOONIN, E. V; ALTSCHUL, S. F.; BORK, P. ...Functional Motifs... **Nature Genetics**, v. 13, p. 266 - 268, 1996.

KULYTÉ, A. *et al.* Gene selective suppression of nonsense termination using antisense agents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1730, p. 165-172, 2005.

LAI, C. *et al.* Correction of ATM gene function by aminoglycoside-induced read-through of premature termination codons. **PNAS**, v. 101, n. Track II, p. 15676-15681, 2004.

LEE, H.-L. R. *et al.* Post-transcriptionally regulated expression system in human xenogeneic transplantation models. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 19, n. 9, p. 1645-55, set. 2011.

LEE, H.-L. R.; DOUGHERTY, J. P. Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases. **Pharmacology & therapeutics**, v. 136, n. 2, p. 227-66, nov. 2012.

LEE, M. S. *et al.* Comprehensive analysis of missense variations in the BRCT domain of BRCA1 by structural and functional assays. **Cancer research**, v. 70, n. 12, p. 4880-90, 15 jun. 2010.

MALIK, V. *et al.* Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. **Therapeutic Advancer in Neurological Disorders**, v. 3, n. 6, p. 379-389, 2010.

MALIK, V. *et al.* Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. **Annals of neurology**, v. 67, n. 6, p. 771-80, jun. 2010.

MANKIN, A. S.; LIEBMAN, S. W. Baby , don ' t stop ! **Nature**, v. 23, p. 8-10, 1999.

MANUVAKHOVA, M.; KEELING, K. M.; BEDWELL, D. M. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system . Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. **RNA society**, v. 6, p. 1044-1055, 2000.

MCGOWAN, C. H. Checking in on Cds1 (Chk2): A checkpoint kinase and tumor suppressor. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 24, n. 6, p. 502-11, jun. 2002.

MESQUITA, R. D. *et al.* Tandem BRCT Domains: DNA's Praetorian Guard. **Genes cancer**, v. 1, n. 11, p. 1140-6, 2010.

MIKI, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v. 266, n. 5182, p. 66-71, 1994.

MILLER, E. M.; NICKOLOFF, J. A. Escherichia coli electrotransformation. *In*: **Methods in Molecular Biology**. [S.I.] Humana Press, 1995. .

MIRKOVIC, N. *et al.* Structure-based assessment of missense mutations in human BRCA1: implications for breast and ovarian cancer predisposition. **Cancer research**, v. 64, n. 11, p. 3790-7, 1 jun. 2004.

MONTEIRO, A. N. A. BRCA1 : exploring the links to transcription. **TIBS** 25, v. 0004, n. October, p. 469-474, 2000.

MONTEIRO, A. N. A.; AUGUST, A.; HANAFUSA, H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13595-13599, 1996.

MORRIS, J. R. *et al.* Genetic analysis of BRCA1 ubiquitin ligase activity and its relationship to breast cancer susceptibility. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 4, p. 599-606, 2006.

MORT, M. *et al.* A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. **Human mutation**, v. 29, n. 8, p. 1037-47, ago. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAGAI, J.; TAKANO, M. Molecular Aspects of Renal Handling of Aminoglycosides and Strategies for Preventing the Nephrotoxicity. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 19, n. 3, p. 159-170, 2004.

NAMY, O.; HATIN, I.; ROUSSET, J. Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination. **EMBO**, v. 2, n. 9, p. 787-793, 2001.

NAROD, S. A; FOULKES, W. D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 9, p. 665-76, set. 2004.

NELSON, A. C.; HOLT, J. T. Impact of RING and BRCT domain mutations on BRCA1 protein stability, localization and recruitment to DNA damage. **Radiation research**, v. 174, n. 1, p. 1-13, jul. 2010.

NEUMANN, E. *et al.* Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. **the The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 1, n. 7, p. 841-845, 1982.

NILSSON, M.; RYDÉN-AULIN, M. Glutamine is incorporated at the nonsense codons UAG and UAA in a suppressor-free *Escherichia coli* strain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1627, n. 1, p. 1-6, 2003.

NUDELMAN, I. *et al.* Development of Novel Aminoglycoside (NB54) with Reduced Toxicity and Enhanced Suppression of Disease-Causing Premature Stop Mutations. **Journal of Medical Chemistry**, v. 52, p. 2836-2845, 2009.

ORR, N. *et al.* Genome-wide association study identifies a common variant in RAD51B associated with male breast cancer risk. **Nature genetics**, v. 44, n. 11, p. 1182-4, nov. 2012.

OUCHI, M. *et al.* BRCA1 Phosphorylation by Aurora-A in the Regulation of G 2 to M Transition *. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19643-19648, 7 maio. 2004.

OUCHI, T. *et al.* BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. **PNAS**, v. 95, p. 2302-2306, 1998.

OUCHI, T. BRCA1 phosphorylation: biological consequences. **Cancer biology and therapy**, v. 5, n. 5, p. 470-475, 2006.

PAO, G. M. *et al.* CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1. **PNAS**, v. 97, n. 3, p. 1020-5, 1 fev. 2000.

PAULL, T. T. *et al.* Direct DNA binding by Brca1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 11, p. 6086-6091, 2001.

PEER, Y. VAN DE *et al.* Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 1, p. 111-116, 1994.

PINOTTI, M. *et al.* Intracellular readthrough of nonsense mutations by aminoglycosides in coagulation factor VII. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, p. 1308-1314, 2006.

RAHMAN, N. *et al.* PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. **Nature Genetics**, v. 39, n. 2, p. 165-167, 2007.

ROWE, S. M. *et al.* Suppression of CFTR premature termination codons and rescue of CFTR protein and function by the synthetic aminoglycoside NB54. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 89, n. 11, p. 1149-61, nov. 2011.

ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68-78, jan. 2012.

RUFFNER, H. *et al.* BRCA1 Is Phosphorylated at Serine 1497 In Vivo at a Cyclin-Dependent Kinase 2 Phosphorylation Site. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 7, p. 4843-4854, 1999.

RUFFNER, H. *et al.* Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 9, p. 5134-5139, 2001.

SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SALAS-MARCO, J.; BEDWELL, D. M. Discrimination between defects in elongation fidelity and termination efficiency provides mechanistic insights into translational readthrough. **Journal of molecular biology**, v. 348, n. 4, p. 801-15, 13 maio. 2005.

SANGKUHL, K. *et al.* Aminoglycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo. **Human molecular genetics**, v. 13, n. 9, p. 893-903, 2004.

SCHMITZ, C. *et al.* Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 1, p. 618-22, 4 jan. 2002.

SCULLY, R. *et al.* BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. **PNAS**, v. 94, p. 5605-5610, 1997.

SERMET-GAUDELUS, I. *et al.* Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 10, p. 1262-1272, 2010.

SEROVA, O. *et al.* A high incidence of BRCA1 mutations in 20 breast-ovarian cancer families. **The American Journal of Human Genetics**, v. 58, n. 1, p. 42-51, 1996.

SHAKYA, R. *et al.* BRCA1 Tumor Suppression Depends on BRCT Phosphoprotein Binding, But Not Its E3 Ligase Activity. **Science**, v. 334, n. 6055, p. 525-528, 2011.

SHARAN, S. K. *et al.* Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 804-810, 1997.

SHIBUYA, T. *et al.* eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, n. 4, p. 346-51, 2004.

SIDDIQ, A. *et al.* A meta-analysis of genome-wide association studies of breast cancer identifies two novel susceptibility loci at 6q14 and 20q11. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 24, p. 5373-84, 15 dez. 2012.

SIFRI, R.; GANGADHARAPPA, S.; ACHESON, L. S. Identifying and testing for hereditary susceptibility to common cancers. **CA a cancer journal for clinicians**, v. 54, n. 6, p. 309-326, 2004.

SMITH, T. M. *et al.* Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. **Genome Research**, v. 6, n. 11, p. 1029-1049, 1996.

SUN, J. *et al.* Relationships among stop codon usage bias, its context, isochores, and gene expression level in various eukaryotes. **Journal of molecular evolution**, v. 61, n. 4, p. 437-44, out. 2005.

SY, S. M. H.; HUEN, M. S. Y.; CHEN, J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. **PNAS**, v. 106, n. 17, p. 7155-7160, 2009.

SZABO, C. I.; WORLEY, T.; MONTEIRO, A. N. A. Understanding germ-line mutations in BRCA1. **Cancer biology therapy**, v. 3, n. 6, p. 515-520, 2004.

THAKUR, S. *et al.* Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 1, p. 3977-3986, 1997.

TIBBETTS, R. S. *et al.* Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. **Genes & development**, v. 14, p. 2989-3002, 2000.

TISCHKOWITZ, M. *et al.* Pathogenicity of the BRCA1 missense variant M1775K is determined by the disruption of the BRCT phosphopeptide-binding pocket: a multi-modal approach. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 16, n. 7, p. 820-32, jul. 2008.

VICENS, Q.; WESTHOF, E. Crystal Structure of Paromomycin Docked into the Eubacterial Ribosomal Decoding A Site Mode. **Structure**, v. 9, n. 01, p. 647-658, 2001.

VIDARSSON, H. *et al.* BRCA1 and BRCA2 bind Stat5a and suppress its transcriptional activity. **FEBS Letters**, v. 532, n. 1-2, p. 247-252, 2002.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Has the Breast Cancer Gene Been Found ? Minireview. **Cell**, v. 79, p. 1-3, 1994.

WANG, Q. *et al.* BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. **Oncogene**, v. 17, p. 1939-1948, 1998.

WANG, X.; TAKENAKA, K.; TAKEDA, S. PTIP promotes DNA double-strand break repair through homologous recombination. **Genes to cells**, p. 1-12, 19 jan. 2010.

WARCHOL, M. E. Cellular mechanisms of aminoglycoside ototoxicity. **Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery**, v. 18, n. 5, p. 454-8, out. 2010.

WELCH, E. M. *et al.* PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. **Nature**, v. 447, n. 7140, p. 87-91, 3 maio. 2007.

WELCSH, P. L. *et al.* BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 11, p. 7560-7565, 2002.

WILLIAMS, R. S.; GREEN, R.; GLOVER, J. N. M. Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 10, p. 838-842, 2001.

WILSCHANSKI, M. *et al.* A Pilot Study of the Effect of Gentamicin on Nasal Potential Difference Measurements in Cystic Fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 10, p. 860-865, 2000.

WOOSTER, R. *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2088-2090, 1994.

WU, J.; LU, L.-Y.; YU, X. The role of BRCA1 in DNA damage. **Protein Cell**, v. 1, n. 2, p. 117-123, 2011.

WU, L. C. *et al.* Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. **Nature Genetics**, v. 14, p. 430 - 440, 1996.

WU-BAER, F. *et al.* The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 34743-34746, 2003.

XU, B. *et al.* Phosphorylation of Serine 1387 in Brca1 Is Specifically Required for the Atm-mediated S-Phase Checkpoint after Ionizing Irradiation **Advances in Brief. Cancer research**, v. 62, p. 4588-4591, 2002.

YARDEN, R. I.; BRODY, L. C. BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. **PNAS**, v. 96, n. 9, p. 4983-8, 27 abr. 1999.

YU, X.; BAER, R. Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18541-18549, 2000.

ZHANG, J. *et al.* Chk2 Phosphorylation of BRCA1 Regulates DNA Double-Strand Break Repair Chk2 Phosphorylation of BRCA1 Regulates DNA Double-Strand Break Repair. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 2, p. 708-718, 2004.

ZILBERBERG, A.; LAHAV, L.; ROSIN-ARBESFELD, R. Restoration of APC gene function in colorectal cancer cells by aminoglycoside- and macrolide-induced read-through of premature termination codons. **Gut**, v. 59, n. 4, p. 496-507, abr. 2010.

ZINGMAN, L. V *et al.* Aminoglycoside-induced translational read-through in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, n. 1, p. 99-103, 2007.