

CÁTIA VALDERÊS DOS SANTOS FARIA LUSTOSA

Interferência de RNA para silenciamento gênico da
enzima NO sintase neuronal (nNOS) no modelo
in vitro de neurodegeneração por interferon gama

Brasília, 2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CÁTIA VALDERÊS DOS SANTOS FARIA LUSTOSA

Interferência de RNA para silenciamento gênico da
enzima NO sintase neuronal (nNOS) no modelo
in vitro de neurodegeneração por interferon gama

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida
Co-Orientadora: Dra. Simoneide Souza Silva

Brasília, 2013

CÁTIA VALDERÊS DOS SANTOS FARIA LUSTOSA

Interferência de RNA para silenciamento gênico da
enzima NO sintase neuronal (nNOS) no modelo
in vitro de neurodegeneração por interferon gama

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Aprovada em 23 de maio de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida
Universidade de Brasília

Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca
Universidade de Brasília

Prof. Dra. Ana Carolina Mortari
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por dar-me saúde, disposição, coragem, inspiração e persistência para concluir mais uma etapa na minha formação acadêmica.

Aos meus pais (*in memoriam*) Beatriz e Mengotti que depositaram em mim a confiança que só aqueles que amam de verdade podem depositar.

Ao meu orientador, Prof. Ricardo Titze, pela disponibilidade, compreensão, muita paciência e por ser um exemplo em determinação e dedicação.

À minha co-orientadora, Simoneide Silva, por todo carinho, ajuda, incentivo e principalmente pelos ensinamentos em pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica, André Leonardo, Fernando Resende, Juliana Sarquis, Lucas Carvalho, Ludmylla Cunha, Thaís Torquato e Wesley Rocha, pelo apoio, amizade e por me ajudarem sempre que foi preciso.

À minha linda filhota Giovana, pela compreensão da ausência da mamãe e por servir de inspiração em momentos de decisão.

Ao meu marido Marcos, por todo o amor, carinho e por sempre ter acreditado em mim.

Aos meus irmãos, Cláudia e Júnior, pelo incentivo ao longo de todos os desafios para que eu chegasse até aqui.

Às minhas grandes amigas do Mundo Mágico, Cíntia, Jackeline, Janilde, Janine, Marcinha, Michele e Nícia, pelos momentos de alegria, prazer e descontração. Que nossa amizade esteja somente no começo e que a gente ainda passe por muitas coisas juntas, rindo ou chorando.

À todos aqueles que, de alguma forma, estiveram presentes durante a realização deste trabalho e puderam contribuir para o meu sucesso.

Obrigada de coração!

“Aprendemos quando compartilhamos experiências”

(John Dewey)

RESUMO

A vulnerabilidade de neurônios dopaminérgicos a insultos químicos continua sendo uma questão relevante na neuropatologia. Estudos anteriores revelam aumento dos níveis de interferon gama (IFN- γ) e da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) durante a injúria de células neuronais. Entretanto, até o momento, nenhum trabalho avaliou se a nNOS afeta a viabilidade de neurônios dopaminérgicos expostos ao IFN- γ . Para avaliar o papel da nNOS nas respostas celulares ao IFN- γ , o presente estudo realizou silenciamento gênico da enzima nNOS via interferência de RNA (RNAi) no modelo de neurodegeneração de células SH-SY5Y. Primeiro, analisou-se o conteúdo de RNAm de nNOS através de PCR em tempo real. Três RNAs interferentes sintéticos curtos foram testados nos tempos de 8h e 24h, em doses de 18,75nM e 37,5nM. Testou-se também um vetor de expressão de grampos curtos de RNA, denominado pnNOS_hum_4400 para o silenciamento da enzima. Os efeitos do silenciamento de nNOS sobre a viabilidade das células SH-SY5Y lesadas foram medidas via ensaio de 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-y1)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). O melhor efeito de silenciamento de nNOS ocorreu no tempo de 24h pós-transfecção para siRNA nNOS hum_3987 e siRNA nNOS hum_4400, com diminuição de 0,46 e 0,66 vezes. SiRNA nNOS hum_4400 e o vetor pnNOS_hum_4400 aumentaram a viabilidade das células lesadas por IFN- γ em 5,0% e 15,8%, respectivamente. Conclui-se que a enzima nNOS participa de eventos celulares ligados à injúria de células SH-SY5Y causada pelo IFN- γ .

Palavras-chave: nNOS, doenças neurodegenerativas, interferon gama, IFN- γ , RNA interferente, RNAi.

ABSTRACT

The vulnerability of dopaminergic neurons to chemical insults remains a relevant issue in neuropathology. Previous studies found increased levels of interferon gamma (IFN- γ) and the neuronal nitric oxide synthase enzyme (nNOS) during neuronal injury. No previous work, however, has evaluated whether nNOS affects the viability of dopaminergic neurons exposed to IFN- γ . To gain more insight into the role of nNOS in cell responses to IFN- γ , the present study carried out the enzyme gene silencing by RNA interference (RNAi) in the neuron-like SH-SY5Y model of neurodegeneration. We first analyzed the nNOS mRNA knocking down by using a reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Three small interfering RNAs were tested at 8h and 24h in doses of 18.75nM and 37.5nM. We also tested a short-hairpin RNA expression vector named pnNOS_hum_4400 to improve enzyme knocking-down. nNOS silencing effects on the viability of injured SH-SY5Y cells were measured by the 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-y1)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The highest knocking down in nNOS mRNA content occurred at 24h post-transfection for siRNANOShum_3987 and siRNANOShum_4400, with 0.46 and 0.66 fold decrease. SiRNANOShum_4400 and the vector pnNOS_hum_4400 ameliorate the viability of cells injured by IFN- γ in 5.0% and 15.8%, respectively. We concluded that nNOS enzyme plays at least a partial role in SH-SY5Y cell degeneration caused by IFN- γ .

Key-words: nNOS, neurodegenerative diseases, interferon gamma, IFN- γ , RNA interference, RNAi.

LISTA DE FIGURAS

1	Variantes de <i>splicing</i> da enzima nNOS (nNOS α , nNOS β e nNOS γ).....	17
2	Morfologia das células SH-SY5Y	19
3	Mecanismo de interferência de RNA.....	21
4	Silenciamento de nNOS na linhagem de células SH-SY5Y mediante tratamentos com siRNAs.....	28
5	Efeitos do siRNAnNOShum_4400 sobre a viabilidade de células SH-SY5Y lesadas por IFN- γ	29
6	Efeitos do vetor pnNOShum_4400 sobre a viabilidade de células SH-SY5Y lesadas por IFN- γ	31

LISTA DE TABELAS

1 Exemplos de proteínas que participam da via extrínseca de apoptose....	15
2 Exemplos de proteínas que participam da via intrínseca de apoptose.....	15
3 Nomenclatura dos siRNAs e sequência alvo de RNAi	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 6-OHDA – 6-hidroxi-dopamina
- 7-NI – 7-nitroindazole
- cDNA – DNA complementar
- DA – Dopamina
- DADS – Dissulfeto Dialil
- DAT – Transportador de Dopamina
- DMEM – *Dulbecco's Modified Medium*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DPBS – *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
- GAS – *Gama Activating Sequence*
- GPBP1 – *GC-rich promoter binding protein 1*
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- IFNGR1 – Receptor 1 do Interferon Gama
- IFN- γ – Interferon Gama
- IL-1 β – Interleucina 1Beta
- iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida
- IRF-1 – Fator de Regulação 1 do Interferon
- JAK – Janus Cinases
- MPP – 1-metil-4-fenilpiridina
- MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
- MTT – *3-(4,5)-dimethylthiazol-2-y1)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
- NMDA – N-metil D-aspartato
- nNOS – Óxido Nítrico Sintase Neuronal
- NO – Óxido Nítrico
- NOS – Óxido Nítrico Sintase
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- PDZ – *Postsynaptic density protein-95/Drosophila disc large/tumor suppressor-zonula occludens-1 protein*
- RISC – *RNA Induced Silencing Complex*
- RNA – Ácido Ribonucleico
- RNAi – Interferência de RNA

RNA_m – RNA mensageiro

RT-PCR – Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase

shRNA – *short hairpin RNA*

siRNA – *short interfering RNA*

SPSS – *Statistical Package for Social Sciences*

STAT1 – Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1

TFN- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TH – Tirosina Hidroxilase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O problema biológico em estudo	13
1.2 Abordagem do problema biológico – a célula SH-SY5Y como modelo <i>in vitro</i> para o estudo do Parkinson	18
1.2.1 A linhagem celular SH-SY5Y – fenótipos e uso experimental .	18
1.2.2 Agente apoptótico para o estudo da degeneração celular	19
1.3 A metodologia de interferência de RNA para silenciar nNOS	20

2 OBJETIVOS

2.1 Geral	22
2.2 Específicos.....	22

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 siRNAs sintéticos e vetores de expressão de grampos curtos de RNA interferente	23
3.2 Cultura de células	24
3.3 Transfecção de células	24
3.4 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real	25
3.5 Determinação da viabilidade das células SH-SY5Y	26
3.6 Análise estatística	27

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos de siRNAs sobre o conteúdo de nNOS em céls SH-SY5Y ...	27
4.2 Efeitos neuroprotetores do siRNAnNOShum_4400 em céls SH-SY5Y lesadas por IFN- γ	29
4.3 Efeitos neuroprotetores do vetor de expressão de grampos curtos de RNA para nNOS nas células SH-SY5Y lesadas por IFN- γ	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXO A – Resumos no Congresso ASGCT	48
ANEXO B – Capítulos do Manual de Consulta – Biotecnologia Aplicada à Farmacologia.....	53

1 INTRODUÇÃO

A presente dissertação de Mestrado avaliou a participação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na injúria de células SH-SY5Y causada por interferon gama (IFN- γ).

A introdução apresentada a seguir foi estruturada em três blocos temáticos. Inicia-se com a descrição de aspectos relacionados com a morte de neurônios dopaminérgicos em doenças neurodegenerativas. Esta primeira etapa aborda a apoptose celular, os papéis do IFN- γ , do óxido nítrico (NO) e da enzima nNOS, no contexto da neurodegeneração. O modelo experimental do presente estudo é tratado no segundo bloco. Descreve-se de um lado a linhagem SH-SY5Y, e de outro o agente apoptótico IFN- γ . Finalmente, são abordados conteúdos sobre interferência de RNA (RNAi), o processo biológico e seu uso experimental para silenciamento gênico.

1.1 O PROBLEMA BIOLÓGICO EM ESTUDO

O presente trabalho utilizou um modelo celular de neurônio dopaminérgico para estudo da participação da enzima nNOS na injúria causada pela citocina IFN- γ . A morte de células neuronais é uma alteração comumente observada em doenças degenerativas do sistema nervoso (1), como o Parkinson, por exemplo. Trata-se de desordem crônica, progressiva e neurodegenerativa, que afeta de 0,1 a 0,3% da população mundial (2,3). Muitos dos sinais clínicos só se desenvolvem quando há perda de 50-60% de neurônios dopaminérgicos em regiões cerebrais específicas, levando os pacientes a um declínio acentuado na capacidade de executar tarefas motoras simples (4).

Assim, os pacientes com a doença de Parkinson apresentam perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, que pode ocorrer por morte celular programada – apoptose (5).

A apoptose pode ser determinada por alterações morfológicas distintas e mecanismos bioquímicos dependentes de energia. É considerada como um componente essencial de vários processos, incluindo a rotatividade de células normais, o bom desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico, bem como o desenvolvimento embrionário. Este evento celular também ocorre como um mecanismo de defesa em reações imunológicas ou quando as células são danificadas por agentes nocivos (6). Entretanto, a apoptose inadequada é elemento presente na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas do sistema nervoso central (7).

Neurônios podem entrar em apoptose em consequência de informações recebidas a partir de seu ambiente interno ou externo. Informações internas dependem do tipo celular, da história do desenvolvimento e do estado de diferenciação e maturação. Já os sinais do ambiente externo incluem hormônios, fatores de crescimento e citocinas, a exemplo do IFN- γ utilizado no presente estudo (8). Ou seja, a ativação bioquímica da apoptose ocorre através de duas vias principais, as vias extrínsecas e intrínsecas, que contam com a ativação de proteínas denominadas de caspases. Estas enzimas são proteases específicas que clivam especificamente resíduos de ácido aspártico (9). Uma vez ativadas as caspases, a célula estará comprometida de maneira irreversível com a morte celular. Há evidências de interconexões entre as vias intrínseca e extrínseca, com influências recíprocas entre as moléculas sinalizadoras (10).

A seguir serão feitas breves considerações sobre as vias de apoptose. A via extrínseca origina-se através da ativação de receptores de morte da superfície celular, incluindo a proteína Fas, e resulta na ativação de caspases. Tais enzimas são amplamente expressas numa forma inativa na maioria das células e, uma vez ativadas podem ativar outras caspases. Desta forma, tem início uma cascata de ativação de proteases que amplifica a via de sinalização apoptótica. As proteínas mais estudadas com papel na ativação desta via extrínseca são citadas na tabela 1. A sequência de eventos que define esta via tem sido melhor caracterizada nos modelos de TNF- α /Fas, que se ligam a receptores específicos, desencadeando uma cascata que culmina na ativação da caspase-8 (11).

Tabela 1 - Exemplos de proteínas que participam da via extrínseca de apoptose

Abreviatura	Nome da Proteína
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TNFR1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
FasL	<i>Fatty acid synthetase ligand</i>
FasR	<i>Fatty acid synthetase receptor</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
Caspase-8	<i>Cysteinylyl aspartic acid-protease 8</i>

Tabela adaptada de Susan Elmore, 2007 (7)

Na via intrínseca, a apoptose envolve um conjunto diversificado de estímulos que têm início na mitocôndria, envolvendo alterações em sua membrana. Há liberação do citocromo c e ativação associada de caspases, como também eventos de estresse oxidativo e alterações em proteínas relacionadas com a apoptose (9).

O controle e a regulação destes eventos apoptóticos mitocondriais ocorre principalmente por membros da família de proteínas Bcl-2, que têm um papel fundamental na sinalização apoptótica intracelular (12). Outras proteínas importantes na via intrínseca estão descritas na tabela 2, apresentada a seguir.

Tabela 2 – Exemplos de proteínas que participam da via intrínseca de apoptose

Abreviatura	Nome da Proteína
Caspase-9	<i>Cysteinylyl aspartic acid-protease 9</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
Bcl-10	<i>B-cell lymphoma protein 10</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BAD	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>

Tabela adaptada de Susan Elmore, 2007 (7)

No sentido geral, estudos anteriores sugerem que o estresse oxidativo, mecanismos de excitotoxicidade e alteração do catabolismo de proteínas participam da cascata de eventos que levam à degeneração neuronal na doença de Parkinson (13,14). A apoptose citada acima tem participação na perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal no Parkinson (15,16). Neste sentido, achados *post mortem* mostram que há aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , no cérebro de pacientes com esta doença, sugerindo que a neuroinflamação contribui para a apoptose neuronal (17).

Citocinas pró-inflamatórias podem ser liberadas por células da micróglia (18) e tem como principal função a defesa imune do sistema nervoso central, em geral são recrutadas após infecções do sistema nervoso. Quando ativada no sítio da lesão, a micróglia sofre mudanças morfológicas, tornando-se capaz de proliferar intensamente e realizar fagocitose. Além da defesa imune, a ativação dessas células tem importantes consequências fisiopatológicas em doenças neurodegenerativas (19) Neste sentido, estudos anteriores relataram maior densidade de células microgliais que expressam IFN- γ na substância negra de pacientes com Parkinson, fator que pode contribuir para a morte de neurônios dopaminérgicos (18).

O papel deletério do IFN- γ sobre neurônios da via nigroestriatal pode ser desencadeado por dois mecanismos. No primeiro deles, o IFN- γ pode causar injúria sobre os neurônios dopaminérgicos na substância negra, pela ativação de receptores específicos que contém domínios de morte intracitoplasmáticos, conforme descrito posteriormente (20). No segundo mecanismo, o IFN- γ pode induzir a produção de óxido nítrico (NO) em células gliais (21).

O óxido nítrico, por sua vez, pode se difundir para os neurônios dopaminérgicos, desempenhando um papel deletério através da indução de peroxidação lipídica e quebras do DNA, bem como a inibição da respiração mitocondrial e metabolismo da energia (20). O NO é molécula gasosa que participa de diferentes eventos celulares e dependendo da concentração pode apresentar efeitos benéficos ou tóxicos à célula (22). É formado como subproduto da oxidação da L-arginina em L-citrulina, reação química catalisada por enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (23).

Estudos anteriores mostram que o bloqueio farmacológico de NOS reverte os efeitos da injúria por 6-OHDA (6-hidroxidopamina) em modelos de Parkinson, o que revela que esta enzima tem papel importante no desenvolvimento da

neurodegeneração (24). Três isoformas das enzimas NOS foram descritas: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS) (25).

A enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), objeto do atual estudo, apresenta variantes genéticas formados por *splicing* alternativo, havendo três principais produtos funcionais: nNOS- α , nNOS- β e nNOS- γ (26,27).

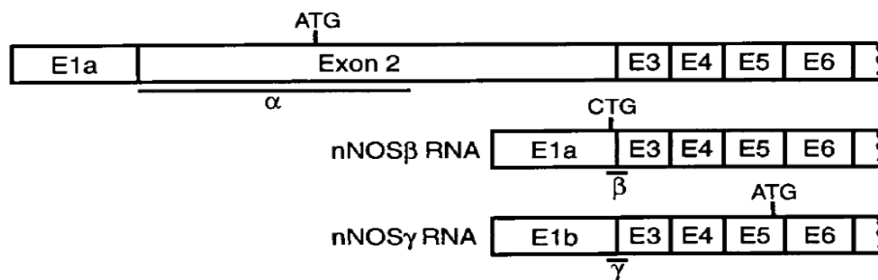


Figura 1 Variantes de *splicing* da enzima nNOS (nNOS α , nNOS β e nNOS γ), obtido de Eliasson et al. (28).

O produto de tamanho completo do gene nNOS é denominado de variante de *splicing* nNOS- α . Possui 29 exons que, com exceção do exon 1, são todos transcritos para gerar uma proteína de 1434 aminoácidos com cerca de 160 Kda. A transcrição inicia-se no códon ATG situado no exon 2 (Figura 1). Os variantes de *splicing* nNOS- β e nNOS- γ não apresentam esse exon 2. No caso do variante nNOS- β , a tradução inicia-se a partir do códon de iniciação CTG situado no exon 1a, gerando uma proteína de 136 Kda. O códon de iniciação da nNOS- γ (ATG) situa-se no exon 5, gerando uma proteína truncada de 125 Kda. Os variantes nNOS- β e nNOS- γ não apresentam o domínio PDZ [*Postsynaptic density protein-95 (PSD-95)/Drosophila disc large/tumor suppressor-zonula occludens-1 protein (ZO-1)*]. Assim, esses variantes nNOS- β e nNOS- γ permanecem dispersos no citoplasma. O variante nNOS- α , ao contrário, possui este domínio PDZ, que media a sua associação com a proteína PSD95, e permanece portanto ancorado à membrana plasmática neuronal próximo ao receptor de NMDA (N-metil D-aspartato). Desta forma, a ativação desta isoforma está relacionada ao influxo de cálcio por esse receptor (27).

Considerando que o IFN- γ induz a produção de NO com participação de nNOS, o silenciamento desta enzima via interferência de RNA, por exemplo, poderia reduzir a produção de NO, com melhora da viabilidade celular.

1.2 ABORDAGEM DO PROBLEMA BIOLÓGICO – A CÉLULA SH-SY5Y COMO MODELO CELULAR PARA O ESTUDO DA DEGENERAÇÃO DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS

1.2.1 A Linhagem Celular SH-SY5Y – Fenótipos e Uso Experimental

A linhagem de células SH-SY5Y utilizada no presente estudo possui muitas das características bioquímicas e funcionais de neurônios dopaminérgicos humanos (29). Possuem a capacidade de sintetizar a dopamina (DA) porque expressam a enzima tirosina hidroxilase (TH) (30). Também contém o transportador de dopamina (DAT), uma proteína expressa apenas em neurônios dopaminérgicos dentro do sistema nervoso central (31).

A linhagem SH-SY5Y é um subclone da linhagem SK-N-SH, originalmente estabelecido a partir de uma biópsia da medula óssea de um paciente com neuroblastoma no início dos anos 70 (32). Segundo especificações da American Type Culture Collection – ATCC, o tempo de duplicação das células é de 48h. (informação disponível no endereço <http://www.atcc.org/Products/All/CRL-2266.aspx#A7931A04156C4C7FA40828AEF707302F>).

As células SH-SY5Y (Figura 2) têm sido amplamente utilizadas como modelo de neurônios dopaminérgicos para estudos neurológicos experimentais. Na pesquisa de Lopes et al (33), por exemplo, as células SH-SY5Y foram utilizadas para avaliar respostas de toxicidade da 6-OHDA, enquanto que no estudo de Giordano et al (34), as células permitiram testes dos efeitos da rotenona, MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina), MPP+ (1-metil-4-fenilpiridina) e 6-OHDA na indução de morte celular. As células SH-SY5Y também são muito utilizadas para o estudo da expressão constitutiva e induzida de nNOS frente a diferentes toxinas como MPP+ (35) e dissulfeto dialil (DADS), um dos principais componentes de extratos solúveis em óleo de alho (36).

Em síntese, a linhagem celular SH-SY5Y pode ser considerada um modelo *in vitro* para estudo da degeneração nervosa dopaminérgica (37), permitindo pesquisas sobre o papel de mediadores celulares como a nNOS, objeto da atual dissertação.

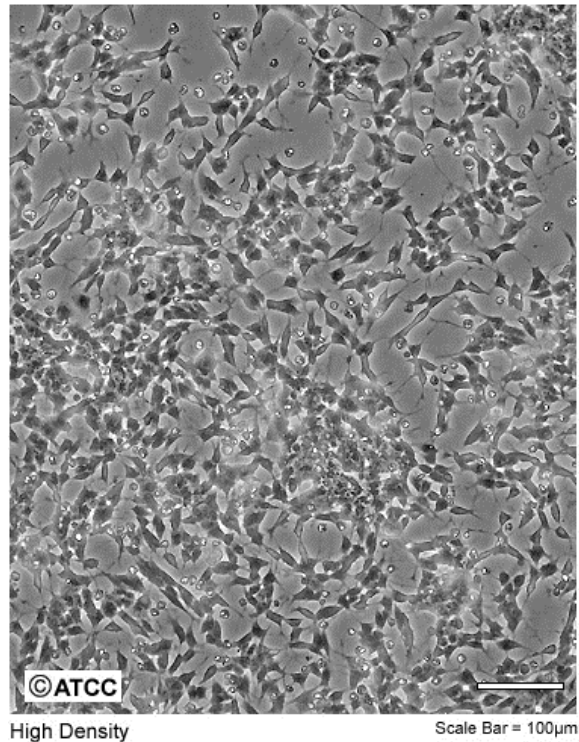


Figura 2 – Morfologia das células SH-SY5Y
(American Type Culture Collection – ATCC)

1.2.2 Agente Apoptótico para o Estudo da Degeneração Neuronal - IFN- γ

O Interferon Gama é citocina solúvel, dimerizada, sendo o único membro do grupo dos interferons do tipo II (38). Está entre os vários agentes químicos que induzem a síntese de NO, com papel na apoptose neuronal dopaminérgica (39,40). A citocina provoca uma formação massiva de NO pela enzima iNOS, cuja transcrição é regulada pelo fator IRF-1 ou por STAT1 (41,42,43,44). Assim, o IFN- γ exerce a sua ação desencadeando uma cascata de transdução de sinal específica da via JAK-STAT, responsável pela regulação de diversos genes, tais como IRF-1, nNOS, iNOS, entre outros (45,46). Resumidamente, o IFN- γ liga-se a receptores específicos que ativam cinases Janus (Jaks). Um resíduo da subunidade de receptor IFNGR1 é depois fosforilado para formar o STAT1 - transdutor de sinal e ativador de transcrição 1. STAT1 liga-se a sítios regulatórios denominados GAS (*Gamma Activating Sequence*), induzindo a expressão de genes alvos (47).

1.3 A METODOLOGIA DE INTERFERÊNCIA DE RNA (RNAi) PARA SILENCIAR A ENZIMA nNOS

A interferência de RNA é um processo conservado na evolução das espécies, no qual a expressão de genes é primariamente controlada em nível pós-transcricional, ou seja, a molécula alvo desta regulação é o RNAm (48). Comumente observa-se silenciamento do gene alvo, e isto é de particular importância quando a hiperexpressão gênica participa da fisiopatologia da doença em estudo (49).

O mecanismo biológico que ocorre naturalmente nas células inicia-se com a expressão de RNA interferente em fita dupla, que é clivado no citoplasma em fragmentos de 21-23 nucleotídeos pela enzima *Dicer*. Tais fragmentos são conhecidos como *short interfering RNA* (siRNA), também constituídos de duas fitas. A primeira fita (*sense*) contém sequência de nucleotídeos similar à sequência alvo do RNAm, enquanto a segunda fita (*antisense*) possui sequência nucleotídica parcialmente complementar a esta mesma sequência alvo. Estes siRNAs associam-se a proteínas citoplasmáticas, formando um complexo denominado *RNA Induced Silencing Complex* ou RISC. Uma enzima presente no complexo protéico RISC abre a fita dupla do siRNA, libera a fita *sense* e acopla-se apenas à fita *antisense*, cujo o papel é guiar todo o complexo até o RNAm. A fita *antisense* anela-se à sequência alvo complementar no RNAm e o mecanismo de degradação é ativado, ocorrendo, assim, o silenciamento pós-transcricional da expressão gênica (50,51).

Experimentalmente, pode-se mimetizar o processo biológico de RNAi mediante o uso de moléculas curtas de RNA fita dupla, conhecidas como siRNAs sintéticos (50,51,52). Nestas estruturas sintéticas, a fita *antisense* possui sequência nucleotídica totalmente complementar à sequência alvo do RNAm. A indução do mecanismo de RNAi mediado por siRNAs sintéticos é ilustrado na Figura 3a. Assim, o uso de siRNAs sintéticos – que agem como silenciadores gênicos – tem se destacado em estudos científicos sobre papéis de genes na biologia celular e no processo saúde-doença, bem como na busca de potenciais alvos terapêuticos (53, 54).

Outra forma de induzir o mecanismo de RNAi, é introduzir na célula vetores de expressão, sejam eles vírus ou DNA plasmidial. Uma vez no núcleo das células, a sequência de interesse codificada pelo vetor será transcrita naturalmente pela

maquinaria celular. Os transcritos são sequências de RNA fita dupla na forma de grampos curtos, daí a denominação de *short hairpin* RNA (shRNA). O shRNA é levado ao citoplasma, onde sofre um processo de clivagem pela enzima *Dicer*, gerando fragmentos curtos de RNA fita dupla. Estes fragmentos curtos de RNA são também siRNAs, formados por duas fitas de nucleotídeos complementares (fitas *sense* e *antisense*). Os siRNAs associam-se ao mesmo grupo de proteínas citoplasmáticas para formar o complexo RISC, que será guiado até o RNAm pela fita *antisense*, induzindo o processo de degradação do mesmo (Figura 3b) (51,55).

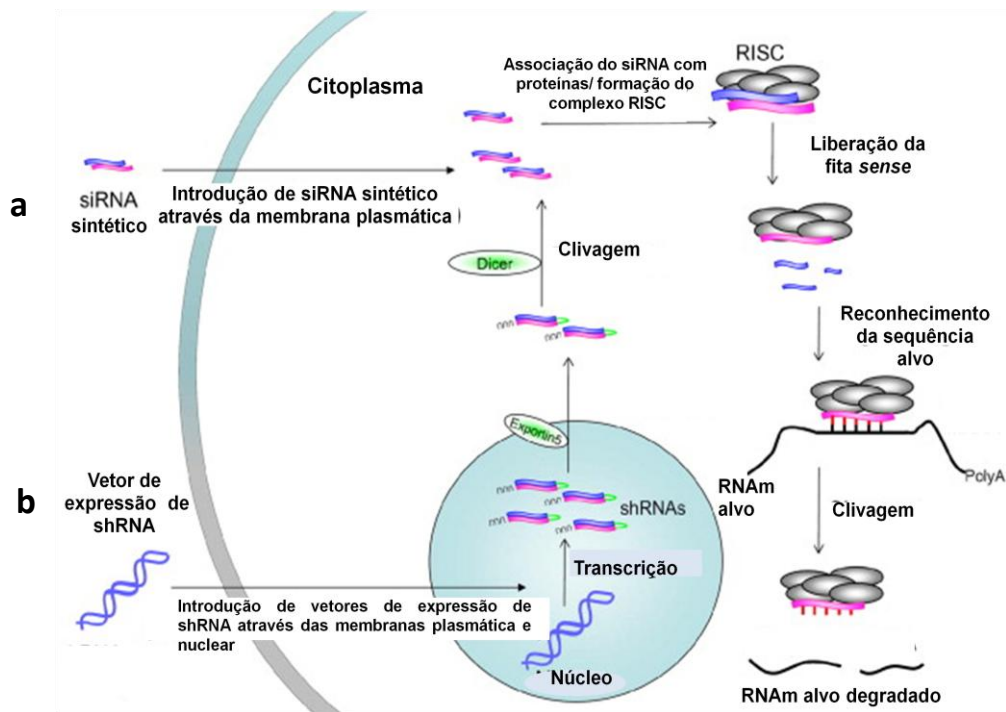


Figura 3 Mecanismo de interferência de RNA. a) Ilustração do mecanismo de interferência de RNA (RNAi) mediada por *short interfering* RNA (siRNA). Moléculas curtas de RNA fita dupla, também denominados siRNAs sintéticos, são transfectados na célula. Uma vez no citoplasma, os siRNAs sintéticos associam-se a proteínas celulares, formando o complexo RISC. O complexo RISC separa as duas fitas, acoplado-se apenas à fita *antisense* que reconhece a sequência alvo no RNAm. O RNAm é então degradado, finalizando o mecanismo de interferência. b) RNAi mediada por vetores de expressão de grampos curtos de RNA, *short hairpin* (shRNA). Vetores de expressão são transfectados na célula. Uma vez no núcleo, os shRNAs são transcritos e exportados para o citoplasma, onde sofrem clivagem pela enzima *Dicer*. Os fragmentos gerados na clivagem, os siRNAs, associam-se ao mesmo complexo RISC, o qual irá degradar o RNAm alvo. Figura adaptada de Takahashi et al (51).

A interferência de RNA revelou-se uma técnica útil na pesquisa biomédica em estudos de genômica funcional. No sentido biotecnológico, siRNAs sintéticos são agentes para descoberta de potenciais alvos terapêuticos em diferentes doenças, como imunodeficiência adquirida/HIV, hepatite viral, doenças metabólicas, neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (55,56). A versatilidade da técnica se deve à possibilidade de definir diferentes objetivos de silenciamento, em termos de linhagem celular e do gene alvo que se pretende regular (49).

No que se refere ao presente estudo, trabalhos anteriores mostram que a inibição farmacológica da enzima nNOS é capaz de reverter eventos neurodegenerativos em modelos animais, mostrando que a via nitrérgica contém potenciais alvos terapêuticos (57). Assim, a enzima nNOS pode ser potencialmente silenciada mediante RNAi para fins de neuroproteção, aspecto aqui investigado.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a participação da enzima NO sintase neuronal (nNOS) na injúria de células SH-SY5Y causada por IFN- γ .

2.2 ESPECÍFICOS

a) Determinar o nível de silenciamento gênico de nNOS, obtido com as estruturas sintéticas siRNAnNOShum_2063, siRNAnNOShum_3987 e siRNAnNOShum_4400, na linhagem celular SH-SY5Y;

b) Avaliar se a estrutura sintética com melhor nível de silenciamento tem capacidade de aumentar a viabilidade das células SH-SY5Y lesadas por IFN- γ ;

c) Avaliar se vetores de expressão de grampos curtos de RNA interferente para nNOS têm capacidade de aumentar a viabilidade das células SH-SY5Y lesadas por IFN- γ .

3 MATERIAL E MÉTODOS

O atual estudo foi organizado em duas principais etapas experimentais. A primeira delas trata de ensaios ligados ao silenciamento de nNOS. Inicia-se com o cultivo de neuroblastomas e transfecção das células com siRNA sintéticos estruturados em lipossomas catiônicos (3.1 a 3.3). A redução do conteúdo de RNAm de nNOS foi então determinada mediante extração de RNA, transcrição reversa e análise da expressão gênica por PCR em tempo real (3.4). A segunda etapa do presente estudo verificou o efeito das estruturas de silenciamento de nNOS sobre a viabilidade de células SH-SY5Y lesadas com IFN- γ . Foram realizados testes de viabilidade celular por ensaios de MTT (3.5), seguindo-se à análise estatística dos dados obtidos em ambas as etapas (3.6).

3.1 SIRNAS SINTÉTICOS E VETORES DE EXPRESSÃO DE GRAMPOS CURTOS DE RNA INTERFERENTE

O algoritmo Biopredsi foi anteriormente utilizado para identificação de alvos de RNAi na região codante do RNAm de nNOS (NM_000620.2) (58). As três sequências alvo de RNAi selecionadas para silenciamento gênico de nNOS estão descritas na tabela 1.

Com base nestes alvos, foram sintetizados siRNAs – sequências sintéticas de RNA em dupla fita com 21 nucleotídeos (Qiagen). O siRNA controle negativo corresponde a uma sequência de nucleotídeos sem homologia com qualquer gene descrito em mamíferos, denominado All Star[®] (Qiagen, Valencia, Califórnia, EUA).

Tabela 3 - Nomenclatura dos siRNAs e sequências alvo de RNAi

Sigla	Sequência alvo de RNAi no cDNA de nNOS	Exon codante	Posição no cDNA de nNOS
siRNAnNOShum_2063	5'-CACCGAGTCCTTCATTAAGCA-3'	12	2663-2683
siRNAnNOShum_3987	5'-CAGCGGCAATTTGATATCCAA-3'	25	4485-4505
siRNAnNOShum_4400	5'-GCGAACGTACGAAGTGACCAA-3'	28	4898-4918

O atual estudo também testou uma estratégia adicional para silenciar nNOS, um vetor que expressa grampos curtos de RNA (*short-hairpins*) para a mesma sequência alvo da estrutura siRNAnNOShum_4400 descrita na tabela acima. A expressão do grampo de RNA está sob controle do promotor H1 humano (vetor pSilencer 3.1-H1 neo, Applied Biosystems, Carlsbad, California, EUA), sendo o vetor denominado de pnNOShum_4400. O vetor controle foi preparado para expressar um grampo curto de RNA sem homologia com qualquer sequência conhecida do genoma humano, e denominado pscramble. Os construtos genéticos foram previamente testados por digestão enzimática e sequenciamento, para avaliação do processo de clonagem.

3.2 CULTURA DE CÉLULAS

O presente estudo utilizou a cultura de células da linhagem SH-SY5Y (ATCC[®] CRL-2266[™]) como modelo *in vitro* de neurônio dopaminérgico. As células foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Medium + F12* (DMEM/F12 Gibco[™], Cat. N° 12400-024) adicionando-se 10% de soro fetal bovino (FBS Gibco[™], Cat. N° 12657-029), 1% de Glutamax[™] I (Gibco[™], Cat. N° 35050-061) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (Sigma-Aldrich[®], Cat. N° A5955), contendo 10000 UI de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL. As células foram semeadas em frascos com capacidade de 60 mL e mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ e 95% de umidade.

3.3 TRANSFECCÃO CELULAR

As transfecções na linhagem SH-SY5Y com siRNAs e vetores de expressão foram realizadas com o agente lipídico Lipofectamina (*Lipofectamine Transfection Reagent 2000*, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), utilizando-se o meio de cultura Opti-Men I (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de cada estrutura genética testada, bem como os pontos temporais avaliados, estão descritos nas legendas das figuras apresentadas em resultados.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA, TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR EM TEMPO REAL

As amostras de RNA total das células em cultura foram extraídas utilizando-se kit comercial (RNeasy[®] Plus Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha), e quantificadas por fluorometria (Qubit[®], Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). A pureza da extração foi considerada aceitável para relações de RNA/proteína acima de 1,8. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

A seguir, realizou-se a transcrição reversa para obtenção do cDNA a partir de 500ng de RNA total, utilizando-se primers randômicos (*SuperScript First-Strand Synthesis System* para RT-PCR, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA).

Finalmente, procedeu-se a reação de PCR em tempo real no termociclador *7500 Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os primers *sense* e *antisense* para amplificação de nNOS foram 5'-GGTGGAGATCAATATCGCGGTT-3' e 5'-CCGGCAGCGGTACTCATTCT-3' (59). O gene controle endógeno (*housekeeping*) utilizado foi o GPBP1 (GC-rich promoter binding protein 1), amplificado pelos primers 5'-TCACTTGAGGCAGAACACAGA-3' e 5'-AGCACATGTTTTTCATCATTTTCAC-3' (60). Os produtos de amplificação foram detectados por meio de intercalação do corante fluorescente *SYBR Green*. A mistura de amplificação foi composta de 5,0 µL de *SYBR Green* (Applied Biosystem, Carlsbad, Califórnia, EUA), 2,0 µL de cDNA diluído 1:10, 0,4 µL de cada primer (10 pmol/µL), e água milli-Q q.s.p. 10,0 µL. O programa de PCR incluiu desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 40 ciclos de amplificação (95 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min). Cada ensaio foi realizado em triplicata. Para determinar o nível de silenciamento gênico foi utilizado o método de quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), que representa a redução no conteúdo do RNAm alvo no grupo silenciado de nNOS em relação ao grupo controle (61).

3.5 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS SH-SY5Y

A viabilidade celular foi avaliada quantitativamente pelo ensaio colorimétrico do MTT (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), que se fundamenta na avaliação da atividade mitocondrial. Nesse método, a metabolização do MTT por enzimas desidrogenases resulta em produto de coloração roxa denominado formazan, sendo que a intensidade dessa coloração indica o grau de viabilidade celular (62). O método tem sensibilidade para detectar alterações na viabilidade das células SH-SY5Y expostas as neurotoxinas comumente utilizadas nos modelos de Parkinson, como a 6-OHDA (63).

A análise dos efeitos do silenciamento de nNOS sobre a viabilidade da células lesadas por IFN- γ foi determinada como se segue. Para os testes de siRNAs, as células SH-SY5Y foram semeadas a uma densidade de 5×10^4 células em placas de 96 poços e incubadas durante 24 horas, seguindo-se a injúria com o agente IFN- γ (37,5 ng/mL). Após, as células foram transfectadas com siRNA nNOS_{Shum_4400} ou scramble (18,75 nM), estruturados em Lipofectamina. Foi realizada incubação por 8h ou 24h, e a viabilidade celular foi determinada por MTT. Resumidamente, 150 μ L do meio contendo o reagente MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço e a placa foi mantida a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5% e umidade a 95%, por período adicional de 3 horas. Em seguida, removeu-se o meio contendo MTT e adicionou-se 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan produzidos pela célula. Os resultados foram mensurados por verificação da densidade óptica (OD) a 595 nm. As células do grupo controle, sem tratamento, foram arbitrariamente consideradas como 100% de viabilidade. Cada tratamento foi realizado em triplicata e os ensaios foram repetidos três vezes.

Para análise dos efeitos dos vetores de expressão de grampos curtos de RNA, a viabilidade das células foi também determinada por MTT. Para isso, as células SH-SY5Y foram inicialmente lesadas por 24 horas com o agente IFN- γ (37,5 ng/mL), em placas de 96 poços. Os efeitos sobre a viabilidade celular foram determinados em duas doses do vetor pnNOS_{Shum_4400} (0,2 μ g ou 0,4 μ g) e, também, em três pontos temporais (8h, 24h ou 48h).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do presente estudo foram submetidos à análise estatística mediante o uso do programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Utilizou-se análise de variância one-way (ANOVA) seguido do teste de Tukey para testar as diferenças entre múltiplos grupos. Diferenças entre pares de grupos foram analisadas pelo teste t de Student. O nível de significância estatística adotado neste estudo foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DE siRNAS SOBRE O CONTEÚDO DE nNOS EM CÉLULAS SH-SY5Y

O presente estudo avaliou estruturas genéticas para silenciamento pós-transcricional de nNOS mediante RNAi. As estruturas sintéticas curtas de RNAs, siRNAnNOShum_2063, siRNAnNOShum_3987 e siRNAnNOShum_4400, nas duas concentrações testadas (18,75 nM e 37,5 nM), reduziram o conteúdo do RNAm de nNOS no tempo de 8h após a transfecção, conforme resultado de PCR em tempo real (Figura 4a). Os maiores efeitos de silenciamento de nNOS ocorreram para a estrutura siRNAnNOShum_2063 (0,64 vezes), seguido de siRNAnNOShum_3987 (0,67 vezes), a 18,75 nM.

A concentração do siRNA também afetou o nível de silenciamento de cada estrutura. Para o siRNAnNOShum_2063, a menor concentração causou maior efeito silenciador (Fig. 4a, $p < 0,05$). Em contraste, a concentração mais elevada do siRNAnNOShum_4400 trouxe o melhor resultado (0,59 *versus* 0,79 vezes).

Examinou-se também se os efeitos de silenciamento de nNOS obtidos no tempo de 8h pós-transfecção iriam se manter até o tempo de 24h (Fig. 4b). Ambas as estruturas siRNAnNOShum_3987 e siRNAnNOShum_4400 silenciaram nNOS no ponto temporal de 24h. O siRNAnNOShum_3987 mostrou maior atividade silenciadora em relação ao siRNAnNOShum_4400 (0,46 vezes *versus* 0,66 vezes, $p < 0,05$). No entanto, o silenciamento causado pelo siRNAnNOShum_4400 foi dose-dependente e mais estável, em ambos os pontos temporais testados, 8h e 24h. O

siRNAnNOShum_2063, no ponto temporal de 24 horas, causou aumento no conteúdo de RNAm de nNOS. Este resultado contrasta com àqueles observados para demais estruturas, e poderá se melhor investigado em estudos posteriores.

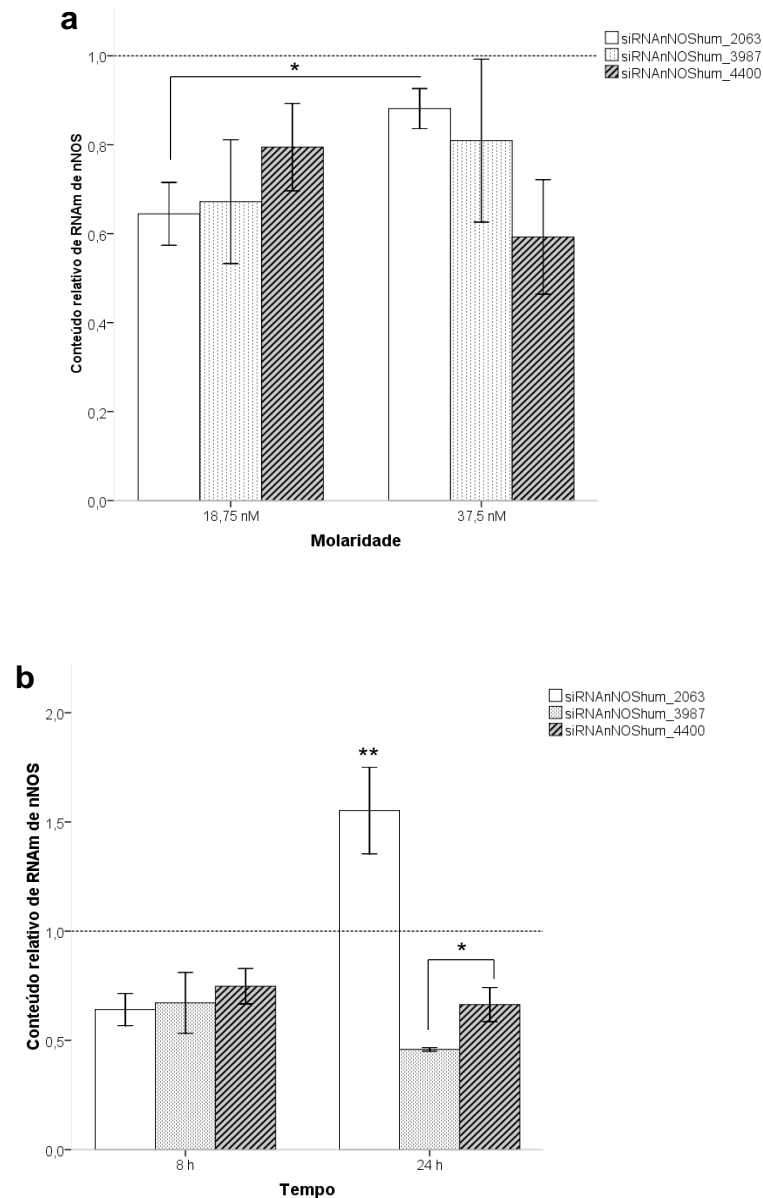


Figura 4 Silenciamento de nNOS na linhagem de células SH-SY5Y mediante tratamentos com siRNAs. (a) Variação do silenciamento de nNOS das estruturas siRNAnNOShum_2063, siRNAnNOShum_3987 e siRNAnNOShum_4400. As barras representam a redução do conteúdo relativo do RNAm de nNOS no tempo de 8h em duas concentrações diferentes (18,75 nM ou 37,5nM, n = 3); (b) efeitos temporais de siRNAs sobre o conteúdo de RNAm de nNOS. As barras representam a redução do conteúdo de RNAm de nNOS nos tempos de 8h e 24h (18,75 nM, n=3). Os resultados de PCR em tempo real foram normalizados para gene controle endógeno e comparado com grupo scramble, arbitrariamente definido com o valor 1 (linha tracejada). O valor relativo de RNAm de nNOS foi determinado pelo método de $(2^{-\Delta\Delta Ct})$. * - $p < 0,05$, teste t de Student; ** - $p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.2 EFEITOS DO siRNA_nNOSHUM_4400 SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y LESADAS POR IFN- γ

Nesta etapa do presente trabalho, foi examinado se o silenciamento da enzima nNOS por siRNAs causaria melhora na viabilidade das células SH-SY5Y submetidas à injúria por IFN- γ .

As células SH-SY5Y foram expostas à citocina (37,5 ng/mL) por 24h, e em seguida tratadas durante 8h ou 24h com siRNA_nNOShum_4400 (18,75 nM). O tratamento de 24h com siRNA_nNOShum_4400 causou um aumento significativo na viabilidade das células, conforme determinado pelo ensaio de MTT (Fig. 5a). O siRNA_nNOShum_4400 causou aumento de 5,0% na viabilidade das células, em comparação com o grupo controle não tratado (mock). Observou-se também um efeito inespecífico neste tempo de 24h, no grupo tratado com o siRNA controle negativo (scramble).

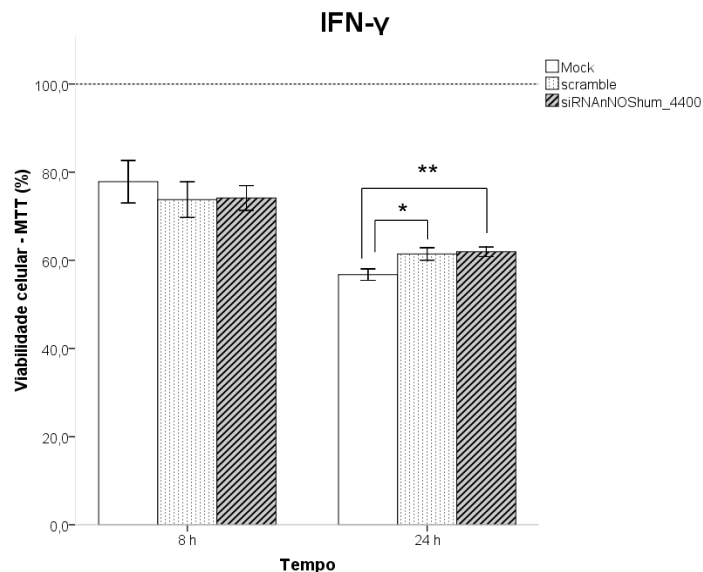


Figura 5 Efeitos do siRNA_nNOShum_4400 sobre a viabilidade das células SH-SY5Y lesadas por IFN- γ . As células foram expostas ao IFN- γ (37,5 ng/mL) durante 24 horas e depois transfectadas com siRNA_nNOShum_4400 (18,75 nM) ou scramble, ambos estruturados em Lipofectamina. A viabilidade celular foi determinada por MTT nos tempos de 8h ou 24h após a transfecção, em sete ensaios independentes. As barras representam os valores de absorvância que foram encontrados em grupos tratados normalizados para o grupo controle não-lesionado (linha tracejada). * - $p < 0,05$, Mock *versus* scramble, 24h (ANOVA one-way, seguido pelo teste de Tukey); ** - $p < 0,05$, Mock *versus* siRNA_nNOShum_4400, 24h (ANOVA one-way, seguido pelo teste de Tukey).

4.3 EFEITOS DO VETOR DE EXPRESSÃO DE GRAMPOS CURTOS DE RNA PARA nNOS SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y LESADAS POR IFN- γ

Inicialmente, foi escolhida a sequência alvo de nNOS a ser utilizada para a clonagem no vetor, examinando-se os efeitos de cada siRNA sobre a expressão do gene e sobre a viabilidade celular após injúria. Os resultados revelaram dois alvos potenciais de RNAi, situados no exon 25, 5'-CAGCGGCAATTTGATATCCAA-3' (siRNAnNOShum_3987) e no exon 28, 5'-GCGAACGTACGAAGTGACCAA-3' (siRNAnNOShum_4400). Optou-se pela sequência codificada pelo exon 28 devido às seguintes características desejadas: (i) efeito de silenciamento dose-dependente – o conteúdo de RNAm de nNOS diminuiu de 0,79 para 0,59 quando as concentrações de siRNA foram aumentadas de 18,75 para 37,5 nM (Fig. 4a) (ii) estabilidade de silenciamento gênico de nNOS nos tempos de 8h e 24h, havendo inclusive aumento da eficácia do silenciamento no tempo de 24h após a transfecção (Fig. 4b); (iii) eficácia na melhora de viabilidade celular após injúria por IFN- γ (Fig. 5). Assim, o vetor de expressão de shRNA direcionado à sequência de nNOS codificada pelo exon 28 foi designado pnNOShum_4400.

A capacidade do vetor pnNOShum_4400 de melhorar a viabilidade celular após lesão por IFN- γ foi examinada pelo ensaio de MTT. Em 8h após a transfecção, o vetor (0,2 μ g) aumentou em 9,7% a viabilidade das células lesadas (90,2% *versus* 99,9%, $p < 0,05$, Fig. 6a). O aumento na quantidade de vetor (0,4 μ g) melhorou a viabilidade das células no tempo de 24h pós-transfecção. Também, a viabilidade das células SH-SY5Y lesadas mostrou melhora de 15,8% no grupo tratado com pnNOShum_4400 (0,2 μ g) em comparação com o grupo scramble (99,0% *versus* 83,2%, respectivamente. $p < 0,05$, Figura 6a), o que mostra efeitos dependentes da sequência gênica. No tempo de 48h após a transfecção, o vetor pnNOShum_4400 não manteve os efeitos positivos observados nos tempos de 8h (0,2 μ g) e 24h (0,4 μ g).

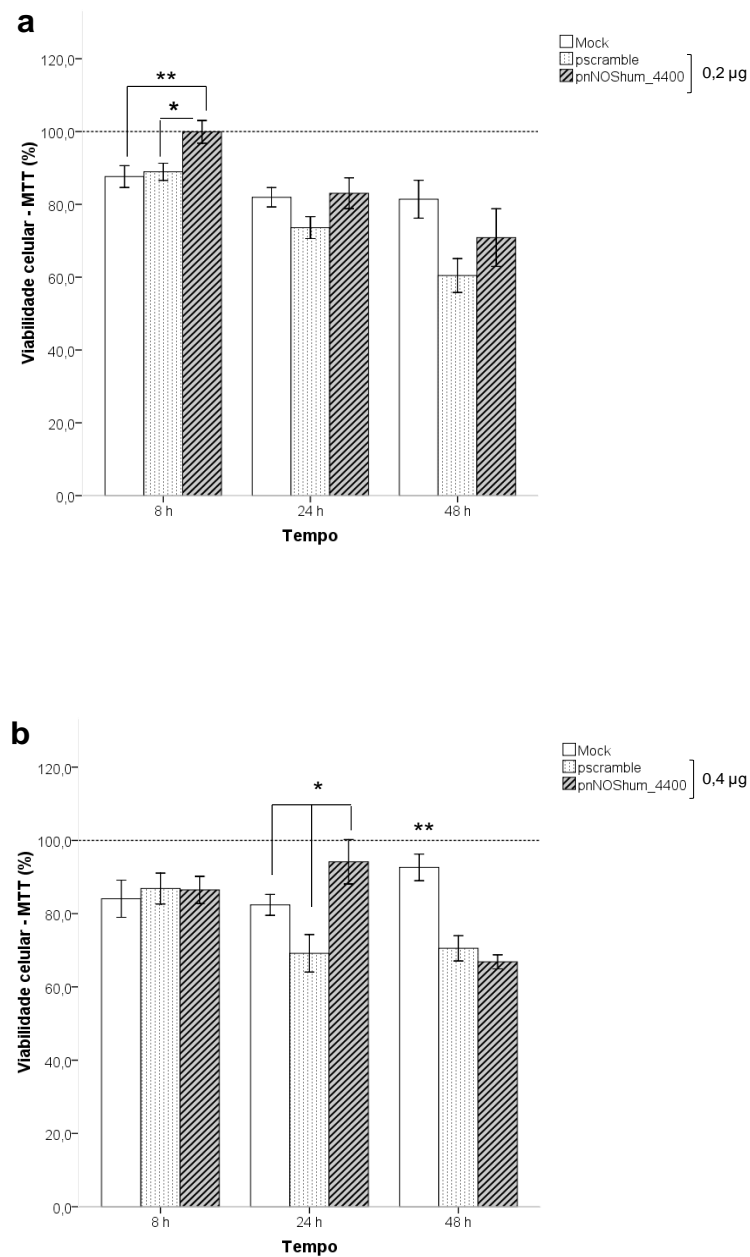


Figura 6 Efeitos do vetor pnNOShum_4400 sobre a viabilidade de células SH-SY5Y lesadas por IFN- γ . Células SH-SY5Y foram expostas ao IFN- γ (37,5 ng/mL) por 24 horas e depois transfectadas com pnNOShum_4400 ou pscramble (0,2 μ g ou 0,4 μ g), ambos estruturados em Lipofectamina. A viabilidade celular foi determinada por MTT nos tempos de 8h, 24h e 48h após a transfecção, em sete ensaios independentes. As barras representam os valores de absorbância encontrados nos grupos tratados em relação ao grupo controle não lesionado (linha tracejada). (a) * - $p < 0,05$, pscramble *versus* pnNOShum_4400, 8h; ** - $p < 0,05$, Mock *versus* pnNOShum_4400, 8h (ANOVA one-way, seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). (b) * - $p < 0,05$, Mock *versus* pscramble, ou Mock *versus* pnNOShum_4400, ou pscramble *versus* pnNOShum_4400 (ANOVA one-way, seguido pelo teste de Tukey); ** - $p < 0,05$, Mock *versus* pscramble e pnNOShum_4400 (ANOVA one-way, seguido pelo teste de Tukey).

5 DISCUSSÃO

A vulnerabilidade de neurônios dopaminérgicos é assunto relevante no campo de estudo da neuropatologia. Evidências anteriores têm associado citocinas pró-inflamatórias à perda de células dopaminérgicas em doenças neurodegenerativas como o Parkinson (18,64). No presente trabalho, examinamos se o silenciamento da enzima nNOS via RNAi iria reduzir os efeitos da injúria por IFN- γ em células imortalizadas com fenótipo dopaminérgico.

O atual estudo utilizou a linhagem SH-SY5Y, que é uma célula neuronal dopaminérgica amplamente utilizada como modelo celular de neurônios dopaminérgicos (37,65). Estudos com células SH-SY5Y têm revelado novos aspectos de neurodegeneração a partir do bloqueio farmacológico de enzimas ou do silenciamento gênico mediante RNAi (37,66,67,68). O bloqueador de nNOS 7-nitroindazole (7-NI) protegeu as células SH-SY5Y contra a toxicidade do paraquat relacionada com a formação de NO (69). Este fármaco também preveniu a lesão por MPP⁺ na condição em que a nNOS foi expressa (35). Os dados do atual estudo estão de acordo com estas publicações anteriores, que encontraram benefícios celulares de bloqueio da enzima nNOS. Ao silenciar nNOS com siRNA_{nNOS}shum_4400, houve aumento na viabilidade das células SH-SY5Y previamente lesadas por IFN- γ .

Neuroproteção por bloqueio de enzimas de síntese de NO encontrada em células SH-SY5Y foi também observada em vários modelos animais de Parkinson (24,70,71,72,73). Camundongos *knockout* de nNOS apresentaram menos dano neuronal por MPP⁺/MPTP do que os selvagens (74). Com relação ao RNAi, o silenciamento de iNOS por vetores expressando shRNAs mostrou efeito protetor em áreas do cérebro de camundongos contra a neurotoxicidade por 6-OHDA (75). Futuras investigações poderão avaliar se as estruturas de RNAi para nNOS aqui propostas, irão melhorar a viabilidade de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, neste caso em modelos animais da doença de Parkinson.

Apesar de vários estudos mostrarem que o bloqueio farmacológico de nNOS previne a degeneração dos neurônios, nenhuma pesquisa anterior avaliou se o silenciamento gênico desta enzima produziria o mesmo efeito em modelos de Parkinson. Duas investigações anteriores com RNAi sobre nNOS abordaram outros

objetivos experimentais, sendo que ambas utilizaram lentivírus para expressar RNAs curtos. Um deles desenvolveu um “cassete” de expressão de grampos curtos de RNA contendo sequência do microRNA 30. A mudança melhorou o efeito do silenciamento de nNOS, tanto *in vitro* como *in vivo* (76). No outro estudo de lentivírus, foi feita transfecção em neurônios corticais em cultura e, também, injeção no córtex do rato (77). Os lentivírus expressaram grampos de RNA para sequências do RNAm alvo codificados pelo exon 10. No presente estudo, os siRNAs foram direcionados a sequências codificadas pelos exons 12, 25 e 28.

A análise do conteúdo do RNAm de nNOS revelou que todos os siRNAs (siRNAnNOShum_2063, siRNAnNOShum_3987 e siRNAnNOShum_4400) foram efetivos em silenciar nNOS, ou seja, os alvos foram sensíveis a RNAi. No entanto, os efeitos de *knocking-down* variaram de intensidade de acordo com o alvo, a concentração de siRNA e tempo. O melhor resultado foi alcançado por siRNAnNOShum_3987 em 24 horas pós-transfecção, na concentração de 18,75nM. O siRNAnNOShum_4400 mostrou uma maior estabilidade nos tempos de 8h e 24h e revelou um efeito silenciador de nNOS dose-dependente. Variações no grau de silenciamento gênico em função da concentração de siRNA ou do tempo têm sido descritas para outros alvos genéticos (78,79).

Estudos anteriores mostram que pacientes com doença de Parkinson apresentam níveis mais altos de citocinas no cérebro e no fluido cérebro-espinhal. Além disso, achados em autópsia de indivíduos com esta doença mostram aumento da densidade de células da glia e de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-1 β) na substância negra (18,80). Estudos em modelos animais de Parkinson utilizando camundongos com deficiência de IFN- γ confirmam o papel do IFN- γ na perda de neurônios dopaminérgicos (81). Finalmente, a expressão aumentada do IFN- γ em camundongos mediante injeção nos ventrículos cerebrais de adenovírus capazes de expressar IFN- γ foi capaz de causar calcificação dos gânglios da base e degeneração nigroestriatal. Estes resultados indicam que o IFN- γ pode causar degeneração nigroestriatal dependente da idade, mesmo na ausência de outros fatores exógenos, fato que reforça a importância desta citocina (82).

Segundo Montaldo et al (39) e Tekautz et al (40), a atividade pró-apoptótica de IFN- γ envolve NO. A citocina provoca uma formação massiva de NO por iNOS, mediante o aumento da expressão de IRF-1 (41,42,43,44). Estudos posteriores poderão avaliar o papel da iNOS nas células SH-SY5Y lesadas com IFN- γ , nas condições experimentais do presente estudo.

Até o momento, nenhum trabalho foi realizado abordando o papel da enzima nNOS em danos neuronais causadas por IFN- γ . O atual estudo mostrou, pela primeira vez, que a estrutura siRNAnNOShum_4400 silenciou a enzima nNOS em 24h pós-transfecção. Neste mesmo tempo, ambos o siRNAnNOShum_4400 e o vetor pnNOShum_4400 aumentaram a viabilidade das células SH-SY5Y lesadas por IFN- γ , em valores de 5,0% e 15,8%, respectivamente. Tomados em conjunto, os resultados revelaram que o silenciamento de nNOS pode proteger as células SH-SY5Y contra a injúria causada pelo agente pró-inflamatório IFN- γ .

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram a viabilidade de silenciamento gênico de nNOS na linhagem celular SH-SY5Y, mediante o uso da interferência de RNA. Os dados aqui apresentados sugerem que a enzima nNOS participa de eventos ligados à injúria por IFN- γ , uma vez que a transfecção de células SH-SY5Y com siRNAs e vetores de expressão de shRNA para nNOS causou melhora em sua viabilidade neste modelo de lesão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wirdefeldt K, Adami H-O, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European journal of epidemiology* [Internet]. 2011 Jun [cited 2013 Mar 2];26 Suppl 1:S1–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626386>
2. Baumann CR. Epidemiology, diagnosis and differential diagnosis in Parkinson's disease tremor. *Parkinsonism & related disorders* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Jan [cited 2013 Mar 2];18 Suppl 1:S90–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22166466>
3. Langston JW. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Annals of neurology* [Internet]. 2006 Apr [cited 2013 Mar 9];59(4):591–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566021>
4. Eriksen JL, Petrucelli L. Parkinson's disease – molecular mechanisms of disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* [Internet]. 2004 Dec [cited 2013 Apr 19];1(4):399–405. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740676504000690>
5. Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* [Internet]. 2005 Jun [cited 2013 Jun 6];11 Suppl 1:S3–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15885625>
6. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology* [Internet]. 2001 Jan [cited 2013 Jun 6];41:367–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264462>
7. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* [Internet]. 2007 Jun [cited 2013 May 22];35(4):495–516. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2117903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

8. Singh S, Dikshit M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain research reviews* [Internet]. 2007 Jun [cited 2013 Jun 6];54(2):233–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408564>
9. Bredesen DE, Rao R V, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature* [Internet]. 2006 Oct 19 [cited 2013 Jun 6];443(7113):796–802. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051206>
10. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews. Cancer* [Internet]. 2002 Apr [cited 2013 Jun 6];2(4):277–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12001989>
11. Mogi M, Harada M, Kondo T, Mizuno Y, Narabayashi H, Riederer P, et al. The soluble form of Fas molecule is elevated in parkinsonian brain tissues. *Neuroscience letters* [Internet]. 1996 Dec 20 [cited 2013 Jun 6];220(3):195–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994226>
12. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer* [Internet]. 2002 Sep [cited 2013 Jun 6];2(9):647–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209154>
13. Jenner P, Olanow CW. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Annals of neurology* [Internet]. 1998 Sep [cited 2013 Mar 19];44(3 Suppl 1):S72–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9749577>
14. Hirsch EC, Faucheux B, Damier P, Mouatt-Prigent A, Agid Y. Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum* [Internet]. 1997 Jan [cited 2013 Apr 19];50:79–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9120427>
15. Op de Beeck K, Schacht J, Van Camp G. Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell. *Hearing research* [Internet]. 2011 Nov [cited 2013 Apr 19];281(1-2):18–27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3341727&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

16. Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* [Internet]. 2011 May [cited 2013 Mar 3];26(6):1049–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626550>
17. Nagatsu T, Sawada M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Current pharmaceutical design* [Internet]. 2005 Jan [cited 2013 Apr 19];11(8):999–1016. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777250>
18. Hirsch EC, Breidert T, Rousset E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* [Internet]. 2003 Jun [cited 2013 Apr 19];991:214–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12846989>
19. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews* [Internet]. 2011 Apr [cited 2013 Jun 6];91(2):461–553. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527731>
20. Vila M, Jackson-Lewis V, Guégan C, Wu DC, Teismann P, Choi DK, et al. The role of glial cells in Parkinson's disease. *Current opinion in neurology* [Internet]. 2001 Aug [cited 2013 Apr 19];14(4):483–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470965>
21. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debré P, et al. FcεpsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-α in glial cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* [Internet]. 1999 May 1 [cited 2013 Apr 19];19(9):3440–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212304>
22. Domenico R. Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Current pharmaceutical design* [Internet]. 2004 Jan [cited 2013 Jun 6];10(14):1667–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134564>

23. Filho RF, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. Revista da Associação Médica Brasileira [Internet]. 2000 [cited 2013 Apr 19];46(3):265–71. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42302000000300012&script=sci_arttext
24. Gomes MZ, Raisman-Vozari R, Del Bel E a. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. *Brain research* [Internet]. 2008 Apr 8 [cited 2013 Apr 13];1203:160–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18313645>
25. Dusse LPS, Vieira LM CM. Revisão obre Óxido Nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2003;39(4):343–50.
26. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal* [Internet]. 2001 Aug 1;357(Pt 3):593–615. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1221991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
27. Kavya R, Saluja R, Singh S, Dikshit M. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. *Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* [Internet]. 2006 Dec [cited 2013 Mar 21];15(4):280–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934505>
28. Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1997 Apr 1;94(7):3396–401. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Joshi S, Guleria R, Pan J, DiPette D, Singh US. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration

- and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene* [Internet]. 2006 Jan 12 [cited 2013 Apr 19];25(2):240–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158052>
30. Oyarce a M, Fleming PJ. Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics* [Internet]. 1991 Nov 1;290(2):503–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1929417>
 31. Takahashi T, Deng Y, Maruyama W, Dostert P, Kawai M, Naoi M. Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *Journal of neural transmission. General section* [Internet]. 1994 Jan [cited 2013 Apr 19];98(2):107–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7734108>
 32. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* [Internet]. 1973 Nov [cited 2013 Apr 16];33(11):2643–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4748425>
 33. Lopes FM, Schröder R, Da Frota MLC, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010 Jun 14 [cited 2013 Mar 6];1337:85–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380819>
 34. Giordano S, Lee J, Darley-USmar VM, Zhang J. Distinct effects of rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on cellular bioenergetics and cell death. *PloS one* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Mar 19];7(9):e44610. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3435291&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 35. Brzozowski MJ, Alcantara SL, Iravani MM, Rose S, Jenner P. The effect of nNOS inhibitors on toxin-induced cell death in dopaminergic cell lines depends

- on the extent of enzyme expression. *Brain research* [Internet]. 2011 Aug 2 [cited 2013 Apr 19];1404:21–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737065>
36. Aquilano K, Filomeni G, Baldelli S, Piccirillo S, De Martino A, Rotilio G, et al. Neuronal nitric oxide synthase protects neuroblastoma cells from oxidative stress mediated by garlic derivatives. *Journal of neurochemistry* [Internet]. 2007 Jun [cited 2013 Mar 19];101(5):1327–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17298386>
37. Xie H, Hu L, Li G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical journal* [Internet]. 2010 Apr 20 [cited 2013 Mar 1];123(8):1086–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497720>
38. Gray PW, Goeddel D V. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* [Internet]. 1982 Aug 26 [cited 2013 Apr 19];298(5877):859–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6180322>
39. Montaldo PG, Chiesa V, Bado M, Raffaghello L, Rozzo C, Ponzoni M. Induction of differentiation and apoptosis by interferon-gamma in human neuroblastoma cells in vitro as a dual and alternative early biological response. *Cell death and differentiation* [Internet]. 1997 Feb;4(2):150–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16465221>
40. Tekautz TM, Zhu K, Grenet J, Kaushal D, Kidd VJ, Lahti JM. Evaluation of IFN-gamma effects on apoptosis and gene expression in neuroblastoma--preclinical studies. *Biochimica et biophysica acta* [Internet]. 2006 Oct [cited 2013 Apr 19];1763(10):1000–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16979248>
41. Greenway HT. Interferon. *The Western journal of medicine* [Internet]. 1994 Apr [cited 2013 Apr 19];160(4):363. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1022432&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

42. Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, et al. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science (New York, N.Y.)* [Internet]. 1994 Mar 18 [cited 2013 Apr 19];263(5153):1612–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7510419>
43. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology* [Internet]. 1997 Jan;15:749–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143706>
44. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry* [Internet]. 1998 Jan [cited 2013 Mar 5];67:227–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759489>
45. Plataniotis LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews. Immunology* [Internet]. 2005 May [cited 2013 Mar 1];5(5):375–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15864272>
46. Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine* [Internet]. 2010 Apr [cited 2013 Mar 5];50(1):1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036577>
47. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & growth factor reviews* [Internet]. 2002 Apr;13(2):95–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900986>
48. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* [Internet]. 2009 Feb 20 [cited 2013 Mar 5];136(4):642–55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2675692&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

49. Davidson BL, McCray PB. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature reviews. Genetics* [Internet]. 2011 May [cited 2013 Apr 19];12(5):329–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499294>
50. Sashital DG, Doudna J a. Structural insights into RNA interference. *Current opinion in structural biology* [Internet]. 2010 Feb;20(1):90–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2855239&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
51. Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Advanced drug delivery reviews* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009 Jul 25 [cited 2013 Mar 20];61(9):760–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19386274>
52. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* [Internet]. 2004 Sep 16;431(7006):343–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372041>
53. Frederico C, Menck M. Manipulando genes em busca de cura : o futuro da terapia gênica. *Revista USP*. 2007;75:50–61.
54. Pastuszka MK, Mackay JA. Biomolecular engineering of intracellular switches in eukaryotes. *Journal of drug delivery science and technology* [Internet]. 2010 May [cited 2013 Apr 19];20(3):163–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3013508&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
55. Sliva K, Schnierle BS. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology journal* [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 Apr 22];7:248. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2949849&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

56. Angaji SA, Hedayati SS, Poor RH, Madani S, Poor SS, Panahi S. Application of RNA interference in treating human diseases. *Journal of genetics* [Internet]. 2010 Dec;89(4):527–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21273705>
57. Lossi L, Cantile C, Tamagno I, Merighi a. Apoptosis in the mammalian CNS: Lessons from animal models. *Veterinary journal* (London, England : 1997) [Internet]. 2005 Jul [cited 2013 Apr 19];170(1):52–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993789>
58. Huesken D, Lange J, Mickanin C, Weiler J, Asselbergs F, Warner J, et al. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nature biotechnology* [Internet]. 2005 Aug [cited 2013 Mar 21];23(8):995–1001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16025102>
59. Dötsch J, Harmjanz A, Christiansen H, Hänze J, Lampert F, Rascher W. Gene expression of neuronal nitric oxide synthase and adrenomedullin in human neuroblastoma using real-time PCR. *International journal of cancer. Journal international du cancer* [Internet]. 2000 Oct 15 [cited 2013 Apr 23];88(2):172–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11004664>
60. Kwon MJ, Oh E, Lee S, Roh MR, Kim SE, Lee Y, et al. Identification of novel reference genes using multiplatform expression data and their validation for quantitative gene expression analysis. *PloS one* [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 Mar 7];4(7):e6162. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2703796&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego, Calif.) [Internet]. 2001 Dec [cited 2013 Feb 27];25(4):402–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
62. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer research* [Internet]. 1991 May 15 [cited

- 2013 Apr 19];51(10):2515–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2021931>
63. Wei L, Sun C, Lei M, Li G, Yi L, Luo F, et al. Activation of Wnt/ β -catenin pathway by exogenous Wnt1 protects SH-SY5Y cells against 6-hydroxydopamine toxicity. *Journal of molecular neuroscience: MN* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Jun 6];49(1):105–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065334>
64. Calabrese V, Cornelius C, Rizzarelli E, Owen JB, Dinkova-Kostova AT, Butterfield DA. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. *Antioxidants & redox signaling* [Internet]. 2009 Nov;11(11):2717–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558211>
65. Alberio T, Lopiano L, Fasano M. Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *The FEBS journal* [Internet]. 2012 Apr [cited 2013 Mar 18];279(7):1146–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22314200>
66. Sapru MK, Yates JW, Hogan S, Jiang L, Halter J, Bohn MC. Silencing of human alpha-synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi. *Experimental neurology* [Internet]. 2006 Apr [cited 2013 Apr 19];198(2):382–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455076>
67. Zhu Y, Hoell P, Ahlemeyer B, Sure U, Bertalanffy H, Krieglstein J. Implication of PTEN in production of reactive oxygen species and neuronal death in in vitro models of stroke and Parkinson's disease. *Neurochemistry international* [Internet]. 2007 Feb [cited 2013 Apr 19];50(3):507–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169462>
68. Zhang QL, Niu Q, Shi YT, Niu PY, Liu CY, Zhang L, et al. Therapeutic potential of BAK gene silencing in aluminum induced neural cell degeneration. *Journal of inorganic biochemistry* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009 Nov [cited 2013 Apr 19];103(11):1514–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19740541>

69. Ortiz-Ortiz M a, Morán JM, González-Polo R a, Niso-Santano M, Soler G, Bravo-San Pedro JM, et al. Nitric oxide-mediated toxicity in paraquat-exposed SH-SY5Y cells: a protective role of 7-nitroindazole. *Neurotoxicity research* [Internet]. 2009 Aug [cited 2013 Apr 19];16(2):160–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19526292>
70. Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, Ferrante RJ, Siwek D, Henshaw DR, et al. Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* [Internet]. 1995 Dec [cited 2013 Apr 19];15(12):8419–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8613773>
71. Watanabe Y, Kato H, Araki T. Protective action of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Metabolic brain disease* [Internet]. 2008 Mar [cited 2013 Apr 19];23(1):51–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18030609>
72. Chalimoniuk M, Lukacova N, Marsala J, Langfort J. Alterations of the expression and activity of midbrain nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice. *Neuroscience* [Internet]. 2006 Aug 25 [cited 2013 Apr 19];141(2):1033–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716528>
73. Chalimoniuk M, Langfort J. The effect of subchronic, intermittent L-DOPA treatment on neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase expression and activity in the striatum and midbrain of normal and MPTP-treated mice. *Neurochemistry international* [Internet]. 2007 May [cited 2013 Apr 19];50(6):821–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379358>
74. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet].

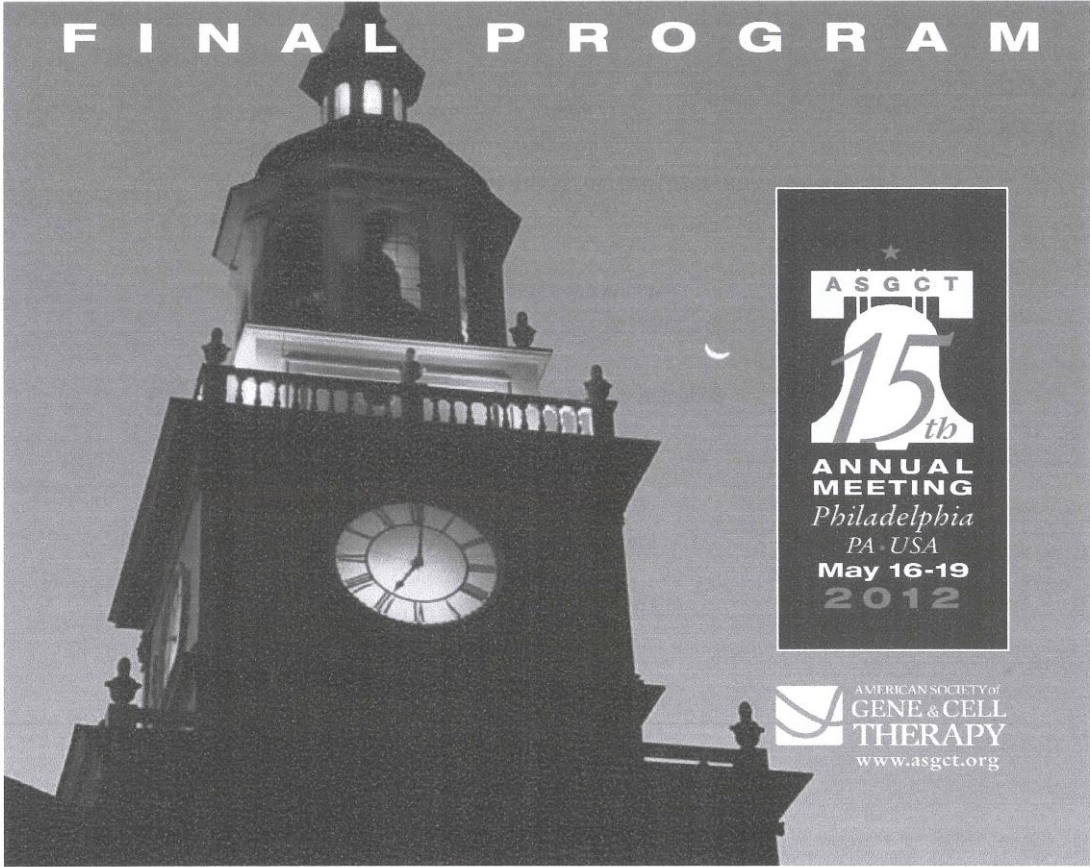
- 1996 May 14 [cited 2013 Mar 4];93(10):4565–71. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39317&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
75. Li M, Dai F, Du X, Yang Q, Chen Y. Neuroprotection by silencing iNOS expression in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Journal of molecular neuroscience: MN* [Internet]. 2012 Sep [cited 2013 Apr 11];48(1):225–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22638860>
76. Liu B, Xu H, Paton JFR, Kasparov S. Cell- and region-specific miR30-based gene knock-down with temporal control in the rat brain. *BMC molecular biology* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2010 Jan [cited 2013 Mar 20];11(1):93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3047298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
77. Mahairaki V, Xu L, Farah MH, Hatfield G, Kizana E, Marbán E, et al. Targeted knock-down of neuronal nitric oxide synthase expression in basal forebrain with RNA interference. *Journal of neuroscience methods* [Internet]. 2009 May 15 [cited 2013 Apr 19];179(2):292–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2701643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
78. Weber C, Mello de Queiroz F, Downie BR, Suckow A, Stühmer W, Pardo L a. Silencing the activity and proliferative properties of the human Eagl Potassium Channel by RNA Interference. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 2006 May 12 [cited 2013 Apr 19];281(19):13030–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537547>
79. Cunha LC, Del Bel E, Pardo L, Stühmer W, Titze-DE-Almeida R. RNA Interference with EAG1 Enhances Interferon Gamma Injury to Glioma Cells In Vitro. *Anticancer research* [Internet]. 2013 Mar;33(3):865–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23482755>
80. Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Molecular neurodegeneration*

- [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 Mar 4];4:47. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2784760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
81. Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, et al. Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* [Internet]. 2007 Mar 21 [cited 2013 Apr 19];27(12):3328–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376993>
82. Chakrabarty P, Ceballos-Diaz C, Lin W-L, Beccard A, Jansen-West K, McFarland NR, et al. Interferon- γ induces progressive nigrostriatal degeneration and basal ganglia calcification. *Nature neuroscience* [Internet]. 2011 Jun [cited 2013 Apr 19];14(6):694–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572432>

ANEXO A – RESUMOS EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS

AMERICAN SOCIETY OF GENE & CELL THERAPY

F I N A L P R O G R A M



271. Analysis of Growth and Invasion of Human Glioma Cell Lines after Gene Silencing of *IL-13Ra2* *In Vitro*

Bharat H. Joshi,¹ Pamela Leland,¹ Raj K. Puri.¹

¹Tumor Vaccines and Biotechnology Branch, Division of Cellular and Gene Therapies, Office of Cellular and Gene Therapy, Center for Biologics Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, Bethesda, MD.

Previously, we have demonstrated that human brain tumor specimens and cell lines overexpress *IL-13Ra2*, a high affinity receptor for *IL-13*. We have also shown that this receptor chain can serve as a target for receptor directed cancer immunotherapy. In this study, we have examined the function of receptor by *IL-13Ra2* gene silencing using 21-mer synthetic siRNA in human glioma cell lines. siRNA oligonucleotides were transfected in two receptor positive glioma cell lines (U251 and A172) and one receptor negative glioma cell line (T98G) and tumor biology was examined to delineate the role of receptor in tumor growth and invasion. We were able to achieve siRNA transfection efficiency to >90% and the expression was stable for at least two weeks after transfection. In addition, the degree of *IL-13Ra2* silencing in these cell lines was >80% at mRNA and protein levels in U251 and A172 cell lines compared to mock transfected control cells ($p=0.001$). As a control, when T98G cells were transfected with oligonucleotides, no change in *IL-13Ra2* expression was observed as these cells did not express *IL-13Ra2*. In radio-labeled *IL-13* binding assays, U251 and A172 cells showed specific binding and this binding was decreased by >70% compared to mock transfected cells. Consistent with the lack of expression of *IL-13Ra2*, T98G failed to show *IL-13* binding. U251 and A172 cell lines are highly sensitive to the cytotoxic effect of an immunotoxin comprised of *IL-13* and a mutated form of *Pseudomonas* exotoxin (*IL-13-PE*), however, when these cells were gene silenced, their sensitivity to *IL-13PE* was significantly reduced ($p=0.006$ compared to control) as determined by protein synthesis inhibition assays. We also observed that cell viability of gene silenced U251 and A172 cell lines was significantly reduced compared to mock transfected control cell lines ($p=0.001$), while there was no change in T98G cells, which suggests that overexpression of *IL-13Ra2* gene is critical for their growth. Clonogenic assays confirmed cell viability results and showed that *IL-13Ra2* silenced U251 and A172 glioma cell lines formed 25 times fewer colonies ($p=0.0012$) compared to mock transfected controls. In matrigel cell invasion assays, similar numbers of invading cells were observed in mock and *IL-13Ra2*-silenced U251 and A172 cell lines. However, when these cells were stimulated with *IL-13* (10, 25 or 50 ng/ml), cell invasion significantly increased in mock transfected cells in a dose dependent manner compared to *IL-13* treated gene silenced U251 and A172 cells ($p<0.001$). T98G tumor cells did not show such changes in this assay. Based on these results, it is concluded that *IL-13Ra2* expression seems to be important in tumor cell growth and invasion of human glioma cell lines that naturally express *IL-13Ra2*. The role of *IL-13Ra2* *in vivo* in cancer invasion and metastasis is being investigated.

272. Synthetic Double-Stranded siRNA-Based Therapeutics Targeting nNOS for Prevention of 6-OHDA Neurotoxicity in Neuroblastoma Cells

Nadia R. Ferreira,¹ Simoneide S. Silva,² Walter Stümer,³ Lúcia H. Faccioli,⁴ Ricardo Titzze-de-Almeida,² Elaine Del Bel.¹

¹Lab. Neurofisiologia e Biologia Molecular, FORP, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ²Lab. Tecnologias para Terapia Gênica, FAV, University of Brasília - UnB, Brasília, DF, Brazil; ³Molecular Biology of Neuronal Signals, Max-Planck-Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany; ⁴Lab. de Inflamação e Imunologia das Parasitoses, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

The nNOS enzyme is expressed in brain areas submitted to injury, and its pharmacological blocking can decrease the neurotoxic effects of 6-OHDA on dopaminergic neurons. This study was aimed to test an RNAi-based strategy targeting nNOS to prevent neurotoxic effects induced by 6-OHDA. Firstly, neuroblastoma cells (ATCC® CRL-2266™ - SH-SY5Y) were plated in 96-well plates (5×10^4 cells/well) and transfected with 150 pmol of siRNA *e2_hmNOS*, *e25_hmNOS*, and *e28_hmNOS* mixed with Lipofectamine (Invitrogen). The negative control sequence was the commercial scramble All-Star® (Qiagen). The cell culture media used in this study were Optimen® and DMEM® (Gibco), for the first 6h and for the remaining 24h of incubation, respectively. After transfection, cells were incubated for 24 hours with the neurotoxin 6-OHDA® (15 μ M, Sigma). Finally, the cell viability was determined by using the colorimetric MTT® (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. For that, 10 μ L of the MTT-labeling reagent (0.5 mg/mL, Invitrogen) was added to each well and the plate was maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air for an additional 3h-period. The insoluble formazan was dissolved with dimethylsulfoxide and the determination of MTT reduction was measured at 595 nm. Control cells without treatment were taken as 100% viability. Each treatment was performed in triplicate and the absorbance values were averaged. The assays were repeated three times. All siRNA sequences targeting hnNOS increased the viability of neuroblastoma cells injured by 6-OHDA compared to control, and the *e28_hmNOS* was the most effective promoting an increase of 8% in cell viability. In conclusion, our study revealed the potential use of siRNAs to improve the viability of neuronal cells injured by 6-OHDA *in vitro*, which hold promise for treatment of neurodegenerative diseases.

273. Synthetic Double-Stranded siRNAs Can Silence the Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase Enzyme (nNOS) from Neuroblastoma Cells in a Temporal and Dose Dependent Manner

Simoneide S. Silva, Cátia F. Lustosa, Nádia R. Ferreira, Elaine Del-Bel, Ricardo Titzze-de-Almeida.

Lab. Tecnologias para Terapia Gênica, University of Brasília - UnB, Brasília, DF, Brazil; Lab. Neurofisiologia e Biologia Molecular, FORP, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil; Molecular Biology of Neuronal Signals, Max-Planck-Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany.

Neuronal nitric oxide synthase enzyme (nNOS) plays a role in 6-OHDA induced dopaminergic neuron degeneration. The enzyme has three main splicing variants isoforms - α , β , and γ . In our study, we set up an RNAi protocol to silence the expression of all nNOS isoforms in neuroblastoma cells in culture. We tested three double-stranded small-interfering RNAs (siRNAs) - *e12_hmNOS*, *e25_hmNOS*, and *e28_hmNOS*, targeted to sequences common to α -, β -, and γ -isoforms. The potential targets for RNAi were identified by artificial neural network algorithms. The 21nt small interfering RNAs (siRNAs) targeting nNOS mRNA were synthesized by Qiagen. To

transfect neuroblastoma cells (ATCC® CRL-2266™ - SH-SY5Y), we mixed the testing siRNAs with Lipofectamine® (Invitrogen). The negative control sequence was the commercial scramble All-Star® (Qiagen). First of all, we determined the siRNA dose-response effects on nNOS mRNA content. For that, cells received each of the nNOS targeting siRNAs (*e12_hnNOS*, *e25_hnNOS*, *e28_hnNOS*) or scramble at 18.75 nM or 37.5 nM and were examined at 8h post-transfection. Secondly, we evaluated the temporal effects on nNOS mRNA content. The cells were examined at three time-points: 4h, 8h, and 24h after siRNAs transfection (37.5 nM). We used commercial kits for RNA extraction (RNeasy Plus MiniKit®, Qiagen) and reverse transcription (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen). The relative expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$) of nNOS was determined by quantitative real-time PCR with SYBR Green® (Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System). The nNOS primers were: nNOS_fw 5'-GAACTGGGAGACTGAGGTGGTTC-3' and nNOS_rev 5'-CTCAGTGCATCCCGTTTCCA-3'. The endogenous housekeeping gene Cullin 1 primers were cull1_fw 5'-GCGAGGTCCTCACTCAGC-3' and cull1_rev 5'-TTCTTTCTCAATTAGAATGTCAATGC-3'. The PCR mixture contained the following reagents: SYBR Green mix 5.0 µL, cDNA 500 ng, 0.8 µL of each primer 10 µM/µL, MilliQ water up to 10 µL. The qPCR conditions were: initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of amplification (95°C for 1 min, 60°C for 1 min). Each sample run in triplicate wells in the same plate. The siRNAs induced a temporal- and dose-dependent reduction of nNOS mRNA content in SH-SY5Y cells *in vitro*. The highest nNOS knocking-down occurred at 24 h post-transfection for *e25_hnNOS* (20%) and *e28_hnNOS* (40%). In conclusion, the siRNAs tested in our study showed a time- and dose-dependent silencing effect on nNOS expression. The synthetic siRNAs promoted a marked enzyme mRNA knocking-down, which would be useful in studies regard the role of nNOS in brain degeneration.

274. *Eag1* Gene Silencing by Non-Viral Expression Vector Reduces the Viability of Neuroblastoma Cells in Culture

Juliana G. Sarquis,¹ Simoneide S. Silva,¹ Luis Pardo,³ Walter Stühmer,³ Elaine Del-Bel,² Ricardo Titz-de-Almeida,¹ ¹Lab. Tecnologias para Terapia Gênica, FAV, University of Brasília - UnB, Brasília, DF, Brazil; ²Lab. Neurofisiologia e Biologia Molecular, FORP, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ³Molecular Biology of Neuronal Signals, Max-Planck-Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany.

Eag1 is a potassium channel with four α -subunits, each one containing six transmembrane α -helical segments, arranged around a central pore. Potassium channels play a role in cell cycle regulation and are involved in tumor development as well. Indeed, *Eag1* silencing by RNAi may reduce cell proliferation of various tumor cell lines. This study was aimed to investigate the effects of a shRNA expression vector targeting *Eag1* on the viability of neuroblastoma cells in culture. Firstly, neuroblastoma cells (ATCC® CRL-2266™ - SH-SY5Y) were plated in 96-well plates and incubated for 24 hours with the injuring agent neomycin® (300 µg/ml, Sigma). After that, cells received 0.2 µg of plasmid vectors mixed with Lipofectamine® (Invitrogen) and were incubated for 48h. Each of the non-viral vectors used in this study contained the shRNA *Kv10.1-3* sequence (*pKv10.1-3*) or a scrambled negative control sequence (*pScramble*) cloned into *pSilencer™* 3.1-H1 (Applied Biosystems, Ambion®). The plasmid effects on cell viability was determined by using the colorimetric MTT (3-(4, 5)-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay. For that, 15 µL of the MTT-labeling reagent (0.5 mg/mL) in 135 µL of the culture media was added to each well and the plate was maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air for an additional 3 h-period. The insoluble formazan

was dissolved with dimethylsulfoxide and the determination of MTT reduction was measured at 595 nm. Control cells without treatment were taken as 100% viability. Each treatment was performed in triplicate and the absorbance values were averaged. The preliminary results from our expression vector *pKv10.1-3* indicated reduction in viability of neuroblastoma cells injured by neomycin up to 80%, when administrated 48h after injury. Our initial results indicated a positive role for *Eag1* in neuronal recovering from injury provoked by neomycin. The *Eag1* shRNA expression vector tested here would be useful in further studies on the role of *Eag1* in cell signaling, gene expression, or neuronal apoptosis.

275. Time-Dependent siRNA Effects on nNOS Message in Glioma Cells in Culture

Fernando F. B. Resende,¹ Simoneide S. Silva,¹ Fátima M. C. Caldeira,¹ Elaine Del-Bel,² Luis A. Pardo,³ Walter Stühmer,³ Ricardo Titz-de-Almeida,¹ ¹FAV, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil; ²Laboratório de Neurofisiologia e Biologia Molecular, FORP, University of São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ³Molecular Biology of Neuronal Signals, Max-Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany.

Previous studies revealed the role of NOS enzymes and nitric oxide in the pathogenesis of brain tumors. The aim of the present study was to determine the temporal effects of a siRNA targeting the neuronal nitric oxide synthase enzyme (nNOS) in glioma cells *in vitro*. For that, we used the siRNA *e28_hnNOS*, which targets the nNOS mRNA sequence coded by exon 28. Glioma cells U-251MG in culture were transfected with *e28_hnNOS* (37.5 nM) mixed with cationic liposomes. The effects on nNOS mRNA content were examined at three time-points: 4, 24, and 48 h. The negative control was the commercial scramble All-Stars™ (Qiagen™). We used commercial kits for RNA extraction (RNeasy Plus MiniKit™, Qiagen) and reverse transcription (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen™). The mRNA content were determined by quantitative PCR with SYBR Green™ (Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System) and presented by the method $2^{-\Delta\Delta CT}$. The forward and reverse primers were, respectively, 5' - GGTGGAGATCAATATCGCGGTT - 3' and 5' - CCGGCAGCGGTACTCATTCT - 3' for nNOS. For the housekeeping gene GC-rich promoter binding protein 1 (GPB1), we used the primers 5' - TCACTTGAGGCAGAACACAGA - 3' and 5' - AGCACATGTTTCATCATTTCAC - 3'. We observed reduction in nNOS mRNA content at the time-points 4 h (0.88 fold) and 24 h (0.61 fold) post-transfection (figure1). Surprisingly, the nNOS mRNA content increased to 1.4 fold at 48 h post-transfection. The results presented here confirmed the time-dependent silencing behavior of siRNAs and raised the mystery about the nNOS increased expression observed at 48 h post-transfection.

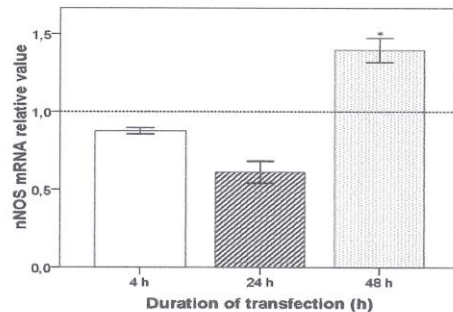


Figure 1. Effects of siRNA c28_hnNOS on nNOS content at time points 4 h, 24 h, and 48 hours post-transfection. Dotted line represents the scramble negative control values.

276. RNAi-Based Therapeutics Targeting nNOS for Prevention of Neuroblastoma Cell Apoptosis

Cátia F. Lustosa,¹ Simoneide S. Silva,¹ Nádia R. Ferreira,² Elaine Del-Bel,² Ricardo Títze-de-Almeida,¹

¹Lab. Tecnologias para Terapia Gênica, FAV, University of Brasília - UnB, Brasília, DF, Brazil; ²Laboratório de Neurofisiologia e Biologia Molecular, FORP, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

The death of neurons by apoptosis is a key step in natural history of various degenerative diseases. The nNOS enzyme is expressed in brain areas submitted to injury, and its blocking can decrease its neurotoxic effects. This study was aimed to test an RNAi-based strategy targeting nNOS to prevent cellular apoptosis. Firstly, neuroblastoma cells (ATCC® CRL-2266™ - SH-SY5Y) were plated in 96-well plates (5X10⁴ cells/well) and incubated for 24 hours with the injuring agent neomycin® (300 µg/ml, Sigma). After that, cells received 0.2 µg of plasmid vectors mixed with Lipofectamine® (Invitrogen) and were incubated for 48h. The two vectors used in our study contained the shRNA 28_hnNOS sequence (pc28_hnNOS) or a scrambled negative control sequence (pScramble) cloned into pSilencer™ 3.1-H1 (Applied Biosystems, Ambion®). Finally, the cell viability was determined by using the colorimetric MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. For that, 15 µL of the MTT-labeling reagent (0.5 mg/mL, Invitrogen) was added to each well and the plate was maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air for an additional 3h-period. The insoluble formazan was dissolved with dimethylsulfoxide and the determination of MTT reduction was measured at 595 nm. Control cells without treatment were taken as 100% viability. Each treatment was performed in triplicate and the absorbance values were averaged. The assays were repeated three times. The nNOS expression plasmid vectors (pc28_hnNOS) increased the viability of neuroblastoma cells injured by neomycin to 10% compared to control, when administrated 48h after injury. In conclusion we reported here an RNAi-based strategy targeting nNOS that prevented the neuronal cell death *in vitro*, which hold promise for treatment of neurodegenerative diseases.

PLURIPOTENT STEM CELLS

277. Time-Dependent Effects of Synthetic Double-Stranded RNA on Eag1 Potassium Channel mRNA Content from Human Glioma Cells

Ludmylla C. Cunha,¹ André S. Leonardo,¹ Elaine Del-Bel,² Luis A. Pardo,³ Walter Stühmer,³ Ricardo Títze-de-Almeida,¹

¹Lab. Tecnologias para Terapia Gênica, FAV, University of Brasília, UnB, Brasília, DF, Brazil; ²Laboratório de Neurofisiologia e Biologia Molecular, FORP, University of São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ³Molecular Biology of Neuronal Signals, Max-Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen, Germany.

Ether à go-go (Eag) potassium channels are natively expressed in mammalian brain regions. Most cancer cell lines and tumor tissues also express Eag1, the prototypic Eag potassium channel. In the present study, we follow the time course of siRNA effects on Eag1 mRNA content from glioma cells in culture. For that, we used small interfering RNA (siRNA) sequences synthesized by Qiagen targeted to the previously described mRNA Eag1 interfering sequence GTCCACTTGGTCCATGTCCAG. The siRNA was transfected (150pmol) into glioma cells (U251MG) in culture using Lipofectamine® (Invitrogen). Cells were incubated with equilibrated-siRNA transfection reagent mix for 4, 8 and 48 h. The negative control siRNA was the commercial scramble All-Star® (Qiagen). We used commercial kits for RNA extraction (RNeasy Plus MiniKit®, Qiagen) and reverse transcription (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen). The relative expression (2- $\Delta\Delta CT$) of Eag1 was determined by using a quantitative PCR protocol (qPCR) with SYBR Green® (Applied Biosystem 7500 Fast Real-Time PCR System). The forward and reverse primers for Eag1 were 5' - TCTGTCCTGTTGGCCATATGATGT - 3' and 5' - CGGAGCAGCCGGACAA - 3'. For the housekeeping gene PAPOLA, we used the primers 5'-TGTTGGTCCACAGATGCTGCT - 3' and 5'-GCTACGAAGACCAGTCCATTG - 3'. The PCR mixture contained the following reagents: SYBR Green mix 5.0 µL, 1 µL of the reverse transcription reaction mix prepared from RNA 1.5 µg, 0.4 µL of each primer 10 pmol/µL, MilliQ water up to 10 µL. The qPCR cycles used in our study were: initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 1 min, annealing and extension at 60°C for 1 min). Each sample run in triplicate wells in the same plate. Relative expressions of Eag1 in treated groups were 0.7, 0.4 and 0.8 fold in comparison to the negative control at 4, 8 and 48 h post-transfection, respectively. In conclusion, the siRNA targeting Eag1 produced time-dependent silencing effects on Eag1 mRNA from glioma cells in culture. The effects were detectable at 4 h and reached their maximum at 8 h post-transfection. A further study would clarify the dose-response curve and the resulting effects on cell.

Pluripotent Stem Cells

278. Gene Therapy of Erythropoietic Porphyria Mice with Induced Pluripotent Stem Cells

Yann Duchartre,¹ Magalie Lalanne,¹ Véronique Guyonnet-Duperat,² Alice Bibeyran,² Cécile Ged,¹ Pierre Dubus,³ Miguel Taillepiere,¹ Aurélie Bedel,¹ Hubert de Vermeuil,¹ Emmanuel Richard,¹

¹INSERM U1035, University Segalen Bordeaux, Bordeaux, France; ²Plateforme de Vectorologie, SFR Transbiomed, Bordeaux, France; ³Histology and Molecular Pathology of Tumors, University Segalen Bordeaux, Bordeaux, France.

Erythropoietic Porphyrias (EP) are inborn error of haem biosynthesis, resulting from the deficient activity of a specific enzyme of the haem biosynthetic pathway and accumulation of porphyrins in erythroid bone marrow cells, erythrocytes, spleen and liver. Porphyrin

**ANEXO B – CAPÍTULOS DO MANUAL DE CONSULTA – BIOTECNOLOGIA
APLICADA À FARMACOLOGIA**

Biotecnologia aplicada à Farmacologia

Manual de consulta

Capítulo 7

QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Os ensaios de biologia molecular requerem a utilização de quantidades específicas de ácidos nucleicos, sejam eles o DNA ou o RNA. Para se determinar a quantidade de material obtida após um processo de purificação, é necessário quantificá-los por meio de técnicas específicas. Desta forma será possível avaliar a eficiência do processo de extração destas moléculas a partir de tecidos, cultura de células ou outra origem.

Na rotina do laboratório de biologia molecular há basicamente duas formas de quantificar os ácidos nucleicos: a espectrofotometria e a fluorimetria. A seguir iremos descrever, de forma breve, o fundamento de cada um desses métodos e, ao final desta apresentação, você poderá definir aquele que melhor irá responder a sua pergunta de acordo com as necessidades do seu experimento.

I. ESPECTROFOTOMETRIA

Naturalmente que teremos a necessidade de quantificar os ácidos nucleicos obtidos ao final de um procedimento de purificação (Cap. 5), por exemplo, antes de seguirmos para outros passos experimentais. Assim, iremos precisar de um método capaz de determinar a presença destas moléculas na amostra em estudo. Para isso podemos empregar a espectrofotometria, que consiste em ensaio de análise baseado na absorção de luz (energia eletromagnética) pelas substâncias. E o aparelho que utilizamos para esta quantificação é o espectrofotômetro.

▪ O que é um espectrofotômetro?

O espectrofotômetro é um instrumento que basicamente mede a quantidade de luz absorvida por uma molécula (Fig. 7.1). Há vários fabricantes no mercado; a seguir apresentamos aquele comercializado pela Thermo, que utilizamos em nosso laboratório.



Fonte: <http://www.yu-shing.com.tw>

Figura 7.1 Equipamento de espectrofotometria do fabricante Thermo Scientific.

▪ Como funciona o espectrofotômetro?

De forma sintética, o espectrofotômetro é formado por um conjunto de dispositivos que são basicamente uma fonte de luz, a grade, a cubeta (que irá conter a amostra a ser quantificada), e o detector. A interação entre estes componentes é que irá permitir a quantificação do material presente na sua amostra, o que será descrito com mais detalhes a seguir. O funcionamento do espectrofotômetro ocorrerá então da seguinte forma, conforme ilustra a figura 7.2. Em primeiro lugar, a fonte luminosa irá emitir um feixe de luz e esta por sua vez irá incidir sobre uma grade e refletir uma luz monocromática, representada na cor laranja. A luz monocromática gerada após incidir na grade irá, na sequência, atravessar uma fenda. É importante ressaltar que esta fenda permite passar apenas o comprimento de onda previamente especificado pelo pesquisador. Este feixe de luz que atravessou a fenda será então parcialmente absorvido pela amostra. A outra parte da luz que atravessou a amostra (ou seja, que não foi absorvida) irá incidir sobre o detector.

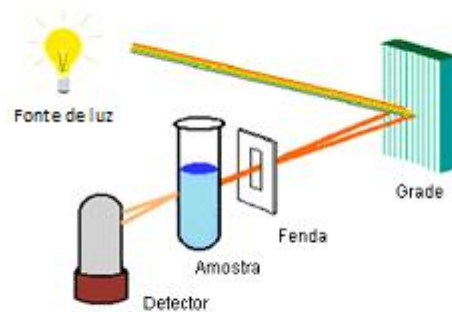


Figura 7.2 Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro.

▪ O que é efetivamente medido no espectrofotômetro?

Como você deve ter notado na figura anterior, parte da luz que incide sobre a cubeta é absorvida e isto ocorre graças às moléculas de ácidos nucléicos presentes na amostra. Esta propriedade que os ácidos nucléicos possuem de absorver a luz será descrita mais detalhadamente a seguir. No momento o que precisamos ter em mente é que a quantidade de luz absorvida é diretamente proporcional à quantidade de moléculas na cubeta. Isto ocorre porque cada molécula irá absorver certa quantidade de energia luminosa. Finalmente, a luz que incide no detector poderá então ser calculada comparando-se a luz incidente (P_0) com aquela que emerge do outro lado da cubeta (P), ou seja, a fração da intensidade luminosa que atravessa a cubeta (P/P_0). Dessa forma, podemos concluir que quanto maior a quantidade de DNA na amostra, por exemplo, maior quantidade de luz será absorvida por esta mesma amostra.

▪ De que forma o espectrofotômetro reconhece as moléculas de ácidos nucléicos?

Pois bem, continuando a falar um pouco mais sobre a questão da absorção de luz, vamos refletir um pouco sobre esta interessante propriedade que as substâncias possuem de absorver energia luminosa. É importante notar que toda substância tem um padrão de absorção de energia característico. Dependendo da composição química, observam-se um ou poucos comprimentos de onda que são fortemente absorvidos pela molécula. Cada substância tem assim um espectro de absorção e um comprimento de onda específico no qual ocorre um máximo de absorção (Fig. 7.3).

Análises quantitativas podem ser realizadas levando-se em consideração o fato de que determinadas substâncias cromóforas, tais como as bases nitrogenadas nos ácidos nucléicos e os aminoácidos nas proteínas, absorvem a luz em comprimentos de onda específicos e diferentes. As cinco bases encontradas no DNA ou RNA absorvem entre 250 e 270 nm (Fig. 7.3A), de forma que geralmente se observa um pico de absorção em torno de 260 nm em DNA ou RNA de alta massa molecular. As proteínas podem ser medidas em 280 nm (Fig. 7.3B).

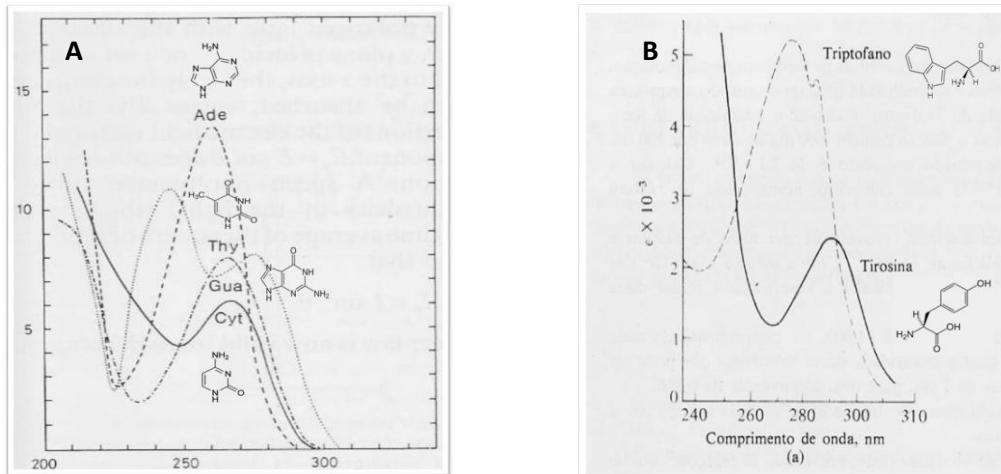


Figura 7.3. Representação esquemática do espectro de absorção dos ácidos nucléicos (A) e das proteínas (B). Notar o pico de leitura de 260 nm em A, de acordo com a estrutura dos anéis cíclicos das bases nitrogenadas presentes nos ácidos nucléicos. Da mesma forma, em B observa-se o pico com 280 nm, correspondendo aos anéis aromáticos que compõe a estrutura das proteínas.

▪ Como determinar o grau de pureza de sua amostra?

Há dois critérios importantes a serem considerados e avaliados após a extração de ácidos nucléicos. O primeiro deles é a integridade, ou seja, avaliar se os ácidos nucléicos não sofreram degradação no processo de purificação. Esta análise é feita por meio de eletroforese em gel de agarose (Cap. 6). O outro critério diz respeito à pureza da amostra. E por que seria importante avaliar a pureza da amostra? Justamente porque a contaminação da mesma por outras moléculas pode ocasionar sérios erros nas etapas seguintes dos experimentos, podendo comprometer a qualidade dos ensaios. Ou seja, para que o material seja seguramente utilizado em ensaios posteriores, é necessário certificar que o mesmo está livre de contaminações por proteínas, por exemplo. Isto pode ser determinado levando-se em consideração o diferente padrão de absorção que o DNA (260 nm) e as proteínas (280 nm) possuem. Esta avaliação de pureza pode ser realizada determinando-se a relação entre as absorvâncias (A_{260}/A_{280}). A razão esperada varia de 1,8 a 1,9 para DNA e de 1,9 a 2,0 para RNA. A presença de proteínas na amostra tende a reduzir esses valores, sugerindo a ocorrência de problema na extração. Outros compostos aromáticos, tais como fenóis, normalmente presentes nos reagentes utilizados para a extração de DNA e RNA, também podem interferir nesses valores. Portanto, essas relações são importantes para definirmos se a amostra está essencialmente pura e passível de ser utilizada na maioria dos procedimentos de manipulação genética.

▪ Na prática, como proceder para quantificar e avaliar o grau de pureza de uma preparação de ácidos nucléicos?

1. Diluir a amostra de DNA ou RNA em água milli-Q autoclavada. A diluição utilizada geralmente é de 1:5
2. Adicionar 10 μ L de água milli-Q autoclavada à cubeta de quartzo e zerar o aparelho a A_{260} (Fig. 7.4)

Observação: a cubeta de vidro é opaca à radiação ultravioleta, por isso deve-se utilizar a cubeta de quartzo.

3. Adicionar 10 μ L da amostra à cubeta de quartzo e ler a A_{260}
4. Repetir a leitura em 280 nm.

Observação: alguns aparelhos já fazem automaticamente a leitura a 280 nm.

5. Avaliar a pureza do material:

$$A_{260}/A_{280} \geq 1,8$$

Algumas importantes observações adicionais

1. As cubetas devem ser lavadas com água e detergente seguida por álcool após a finalização da quantificação.
2. As cubetas possuem ranhuras para auxiliar a manipulação. Não encoste os dedos na superfície lisa, pois a gordura da pele é adsorvida no vidro, refratando a luz e resultando em erro experimental. As paredes lisas devem ficar perpendiculares ao caminho da luz e nunca a parede opaca.

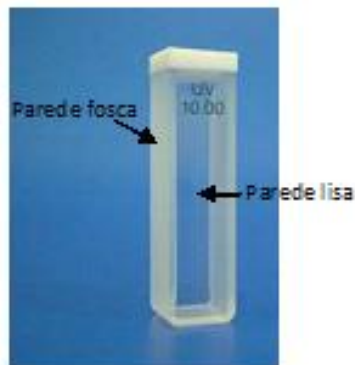


Figura 7.4 Cubeta de quartzo.

3. Amostras geladas podem condensar umidade nas paredes, alterando o resultado da leitura. Também a presença de bolhas na solução ou de partículas em suspensão deve ser evitada.
4. Atenção aos valores medidos. Valores de absorbância maiores que um são suspeitos, enquanto os acima de 2 não devem ser considerados. Matematicamente, o valor de absorbância com máximo de precisão ocorre em torno de 0,434, e, na prática, valores até 1 são suficientemente precisos. Caso a medida apresente valores superiores a um, recomenda-se que a amostra seja diluída, de modo que a leitura seja inferior a esse valor.

II. FLUORIMETRIA



Figura 7.5 Equipamento de fluorimetria Qubit®, do fabricante Invitrogen.

No item anterior discutimos um pouco sobre a quantificação dos ácidos nucleicos utilizando a técnica de espectrofotometria. Vimos que utilizando esta técnica é possível quantificar o número de moléculas presentes em uma amostra por meio da quantidade de luz absorvida. O que iremos descrever agora será outra técnica de quantificação de ácidos nucleicos, a qual vem sendo utilizada com maior frequência na rotina dos laboratórios de biologia molecular. Esta técnica se fundamenta na capacidade que algumas moléculas possuem de emitir fluorescência. Ao contrário da espectrofotometria, onde medimos absorbância, aqui o que irá determinar a quantidade de moléculas presentes na amostra será o seu espectro de emissão de energia (fluorescência). Fluorescência, por definição, é a capacidade de uma substância emitir luz quando exposta a determinada radiação. Isto já foi descrito na eletroforese, por exemplo, onde a luz ultravioleta faz com que o brometo de etídio irradie fluorescência (Cap. 6). No atual capítulo, esta propriedade será explorada pelo equipamento próprio, permitindo quantificar ácidos nucleicos.

▪ De que forma ocorre o estado de transição de energia nas moléculas?

O fenômeno da fluorescência consiste na absorção de energia por um elétron, passando do estado fundamental para o excitado. Este elétron, ao retornar ao estado fundamental, é acompanhado pela liberação de energia em excesso através da emissão de radiação. A fluorescência é medida pela detecção da radiação emitida. Um exemplo de aparelho utilizado para quantificar esta fluorescência é o Qubit® 2.0 Fluorometer da invitrogen™ (Fig. 7.5).

▪ Como quantificar os ácidos nucleicos utilizando o método fluorimétrico?

Os ácidos nucleicos e as proteínas não possuem a capacidade natural de emitir fluorescência. Por isso, para que possamos quantificar essas moléculas pelo método da fluorimetria, é necessário utilizar sondas que se acoplem especificamente a cada uma dessas moléculas. O aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™) utiliza sondas moleculares fluorescentes que irão emitir sinais somente quando se ligarem à molécula alvo específica que se quer medir a concentração: DNA, RNA ou proteína. Quanto maior a quantidade destas moléculas na amostra, maior será a fluorescência obtida.

Algumas recomendações importantes devem ser consideradas antes de iniciar os procedimentos para a quantificação:

- Todos os reagentes devem estar em temperatura ambiente;
- Usar luvas durante o manuseio da amostra;
- Não segurar o tubo de ensaio nas mãos antes de executar uma medição;
- Colocar o tubo no aparelho e proceder a leitura imediatamente.

POP 7.1 Quantificação de RNA por fluorimetria no equipamento Qubit®

MATERIAIS

- Qubit® reagente;
- Qubit® buffer;
- Standards do kit;
- Amostra
- Tubos tipo eppendorf de 1,5mL;
- Tubos tipo eppendorf do kit;
- Ponteiros e pipetas – P2, P10, P200 e P1000.

PROCEDIMENTOS

- Passo 1: Solução de trabalho
 - 1µL de Qubit® reagente para cada amostra;
 - 199µL de Qubit® buffer para cada amostra;
- Passo 2: Curva padrão 1 (*usar eppendorf do kit*)
 - 190µL da solução de trabalho;
 - 10µL do standard 0;
- Passo 3: Curva padrão 2 (*usar eppendorf do kit*)
 - 190µL da solução de trabalho;
 - 10µL do standard 10 ou 100;
- Passo 4: Preparo das amostras (*usar eppendorf do kit*)

- 198 μ L da solução padrão;
- 2 μ L da amostra;

- Passo 5: Levar ao vortex os tubos de ensaio por 2-3 segundos;

- Passo 6: Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos;

- Passo 7: Proceder a leitura
 - Ligar o aparelho e selecionar a opção desejada (DNA, RNA ou Proteína);
 - Selecionar a opção Read new standard;
 - Inserir Standard 1 e proceder a leitura;
 - Inserir Standard 2 e proceder a leitura;
 - Inserir a amostra e proceder a leitura;
 - Selecionar a opção concentração stock;
 - Ajustar o volume inicial da amostra (2 μ L) e escolher a unidade de medida (ng/ μ L).

BIBLIOGRAFIA

Azevedo et al. Técnicas básicas de biologia molecular. Editora UnB, Brasília, Brasil, 2003.

Sambrook & Russel. Molecular Cloning – a laboratory manual. 3. Ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.

Capítulo 10

DIGESTÃO DE DNA PLASMIDIAL

Para entendermos como ocorre a digestão plasmidial, primeiramente precisamos conhecer o que são e como atuam as enzimas de restrição. As enzimas de restrição, denominadas também de endonucleases de restrição, são as ferramentas básicas da engenharia genética, desempenhando função de clivagem (corte) da molécula de DNA em pontos específicos, em reconhecimento a determinadas sequências de nucleotídeos.

▪ Qual a origem das enzimas de restrição?

A função biológica destas enzimas consiste em proteger células da invasão de DNA exógeno. Assim, foram inicialmente descobertas em bactérias, atuando na defesa contra o DNA exógeno que penetrava na célula, por exemplo, via bacteriófago. Normalmente, os organismos produzem uma enzima de restrição junto com uma enzima modificadora (DNA metiltransferase) que protege seu próprio DNA do corte pela enzima de restrição. Essa enzima modificadora normalmente reconhece a mesma sequência que a enzima de restrição, e a protege pela metilação. O DNA das bactérias é metilado em seus resíduos adenina e citosina de maneira que as enzimas de restrição não possam reconhecer seus sítios de ligação, entretanto o DNA exógeno não metilado é reconhecido e quebrado pela enzima evitando, por exemplo, uma infecção viral.

▪ Enzimas de restrição têm nomes esquisitos. Por que?

A denominação das diferentes endonucleases de restrição se origina dos nomes dos microrganismos nas quais foram originadas e são escritas em itálico, depois vem a cepa e por último o subtipo. As primeiras enzimas identificadas foram *EcoRI* e *EcoRII* de *Escherichia coli* e *Hind II* e *Hind III* de *Haemophilus influenzae*. Várias outras bactérias têm sido avaliadas para essas enzimas desde então, e mais de 3.000 enzimas já foram identificadas com mais de 200 tipos de especificidade.

▪ Como atuam e quais os tipos de enzimas de restrição?

As endonucleases de restrição são enzimas que cortam o DNA tanto de fita simples quanto de fita dupla, em sítios específicos de restrição com 4 a 8 pares de base. Estas enzimas catalizam a quebra das ligações diéster-fosfato da cadeia lateral do DNA e também do RNA, sendo que existem enzimas que atuam em ambos substratos. Há três tipos de enzimas de restrição: I, II, III. Os tipos I e

III cortam o DNA fora do sítio de especificidade, enquanto as do tipo II clivam dentro do próprio sítio de restrição. A maioria das enzimas de restrição são do tipo II.

Quanto ao tipo de corte realizado no DNA, há duas possibilidades:

a) enzimas que geram extremidades simétricas ou cegas, onde o corte ocorre dentro de um centro de simetria, ou seja, as extremidades ficam retas após a realização da clivagem;

b) enzimas que geram extremidades coesivas, onde os cortes se encontram deslocados um do outro, fora de um eixo de simetria. São mais utilizadas para inserção plasmidial, pois permitem que dois fragmentos quaisquer possam ser facilmente ligados, desde que tenham sido originados pela mesma enzima ou por enzimas diferentes mas que produzam sequências complementares.

▪ **Na prática, como a digestão é realizada?**

Para digerir determinada amostra de DNA plasmidial, é necessário utilizar basicamente a enzima e o seu tampão apropriado, tomando-se o cuidado de incubar a reação na temperatura correta. Frequentemente, o DNA plasmidial tem que ser digerido por duas enzimas diferentes, e que requerem tampões diferentes. Neste caso, o pesquisador deve escolher aquele tampão que serve melhor a ambas as enzimas, sabendo que haverá certa perda de eficiência de digestão para uma delas.

O tampão de reação típico de endonucleases de restrição comumente contém:

- Cloreto de Magnésio;
- Cloreto de Sódio ou de Potássio;
- Tris-HCl;
- 2-β-mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT);
- Albumina de serum bovino (BSA).

As reações de digestão podem seguir a regra que 10 Unidades de enzima de restrição por µg de DNA. Normalmente esta quantidade da enzima é suficiente para digerir uma gama de variações na concentração, pureza e qualidade do DNA. Na prática, acrescenta-se 1 µL de enzima para cada 1 µg de DNA purificado. O volume final pode ser de 50 µL, incluindo-se o tampão apropriado e a amostra a ser digerida. O tempo de incubação pode variar de acordo com a enzima, não sendo normalmente inferior a 1 hora, na temperatura adequada.

▪ **Cuidado: enzimas de restrição devem ser mantidas sempre a baixas temperaturas!**

As enzimas de restrição são estocadas em freezer a -20°C, devendo ser expostas pelo menor tempo possível à temperatura ambiente.

Durante a preparação do ensaio de digestão, devem ser mantidas no gelo.

ANÁLISE EM GEL DE AGAROSE

- Passo 1 – Padrão 1 Kb Ladder

- 1 μL de 1Kb Ladder

- 1 μL de loading die

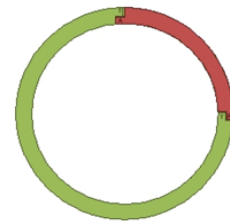
- 4 μL de H_2O Milli-Q

- Passo 2 – Controle

- 1 μL de plasmídeo não digerido

- 2,5 μL de tampão da amostra

- 2,5 μL de H_2O Milli-Q



- Passo 3 – DNA plasmidial linearizado

- 5 μL de digestão de DNA plasmidial

- 2,5 μL de tampão de amostra

- 2,5 μL de H_2O Milli-Q

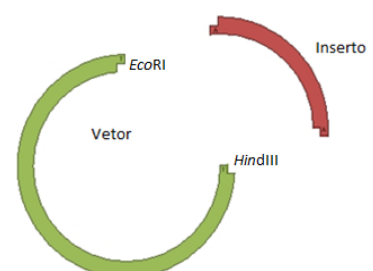


- Passo 4 – DNA plasmidial sem inserto

- 5 μL de digestão de DNA plasmidial

- 2,5 μL de tampão de amostra

- 2,5 μL de H_2O Milli-Q



BIBLIOGRAFIA

Azevedo et al. Técnicas básicas de biologia molecular. Editora UnB, Brasília, Brasil, 2003.

De Robertis, E. M. F. e Hib, J. Bases da Biologia Celular e Molecular. Guanabara, 3ª Ed. 2001.

McClelland, M., J. Hanish M. Nelson e Y. Patel. KGB: a single buffer for all restriction endonucleases. Nucleic Acid Research. 1988.

Sambrook & Russel. Molecular Cloning – a laboratory manual. 3. Ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.