

- Regulação da transcrição e transdução

21.001

ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA MYO-D, MIOSTATINA E ATROGINA APÓS ALONGAMENTO PASSIVO INTERMITENTE NO MÚSCULO SÓLEO DO RATO. <sup>1</sup>Peviani Messa, S. <sup>\*\*</sup>; <sup>2</sup>Gomes, A. R. S.; <sup>1</sup>Moreira, R.F.C.; <sup>4</sup> Moriscot, A. S.; <sup>1</sup>Salvini, T. F. <sup>1</sup>Fisioterapia UFSCar; <sup>2</sup>Fisioterapia UNIJUI; <sup>3</sup>Histologia e Embriologia USP

**Objetivo:**

Avaliar o efeito do alongamento muscular passivo, realizado de modo intermitente, na expressão gênica da myo-D, miostatina e atroquina, no músculo sóleo do rato.

**Métodos e Resultados:**

50 ratos machos Wistar (370±30g), com 3 meses, tiveram a articulação tibio-társica esquerda posicionada passivamente em flexão dorsal máxima para o alongamento do músculo sóleo esquerdo. Cada sessão de alongamento consistiu em 10 repetições de alongamento com 1 min de duração e 30s de repouso entre cada repetição. Cinco grupos de animais foram submetidos a uma única sessão de alongamento e foram avaliados imediatamente após (IA) (n=5), 8h (n=5), 24h (n=5) 48h (n=5), 72h (n=5) e 168h (n=5) após. Outros três grupos foram avaliados imediatamente após 2, 3 e 7 sessões diárias de alongamento (n=5). Um grupo controle também foi analisado. Posteriormente, os níveis de RNAm da myo-D, miostatina e atroquina, foram avaliados em PCR em tempo real. Após uma única sessão de alongamento houve aumento na expressão gênica da miostatina nos grupos IA (2±0.2 vezes, p≤0.001) e 168h após (1.33±0.04 vezes, p≤0.001), em relação ao controle. A atroquina também aumentou 48h após (3.08±0.48 vezes, p≤0.001), enquanto a myo-D permaneceu inalterada. Por outro lado, o gene da atroquina aumentou sua expressão após 2 (3.05±0.75vezes, p≤0.001), 3 (3.15±0.73 vezes, p≤0.001) e 7 (3.32±0.63vezes, p≤0.001) sessões de alongamento, quando comparado ao controle. Nesses grupos não houve alteração na expressão da myo-D e da miostatina.

**Conclusões:**

O alongamento intermitente ativou genes relacionados às vias de atrofia muscular (miostatina e atroquina) no músculo sóleo do rato.

21.002

GENE CHARACTERIZATION AND PREDICTED PROTEIN STRUCTURE OF THE MOLECULAR CHAPERONE HSP10 *TRYPANOSOMA CRUZI*. Fernandes, M. <sup>\*\*</sup>; Silva, R.; Rössle, S. C. S.; Bisch, P. M.; Rondinelli, E.; Urmenyi, T. P. IBCCF-UFRJ

**Objetivo:**

The HSP10 is a component of a multimeric apparatus composed of HSP60 and HSP10 proteins. This chaperone helps proteins to reach their stable three-dimensional conformation. Both HSPs are inducible proteins and must be coordinately regulated, and are, therefore, good models for studying kinetoplastid gene regulation. The *Trypanosoma cruzi* HSP60 gene has been previously isolated and characterized in our laboratory. The objective of this work is to characterize the coordinated regulation of HSP60/10, and we begun by studying the other component of the *T.cruzi* chaperone machine, HSP10.

**Métodos e Resultados:**

The comparison of the predicted amino acid sequence of *T.cruzi* HSP10 with other HSP10 sequences shows small conserved regions spread over the entire length of the protein. We also detected a 5 residue deletion conserved only in tripanosomatids. When molecular modeling methods were performed, this deletion leads to a two fold increase in the size of the orifice located on the upper surface of the HSP10 structure when compared with the *E.coli* ortholog protein complex. Southern blot and gene equivalent experiments, in agreement with preliminary genome sequence (tcruzidb.org) suggest that HSP10 is present as a multicopy gene arranged in tandem, which contain 3 copies. Northern blot experiments show that the level of HSP10 mRNA, of about 0.5 Kb, does not increase upon heat shock at 37 C and 40 C. However, a smaller mRNA is induced at higher temperatures. RT-PCR experiments suggest this is due to alternative polyadenylation.

**Conclusões:**

The unusual 3-D structure of the *T.cruzi* machinery could help to elucidate the still obscure role of this orifice on the chaperone machine function. The 3 copies in tandem for the HSP10 locus is a

typical arrangement in kinetoplastids. The smaller mRNA induced during the heat shock is derived from alternate polyadenylation.

21.003

EXPRESSION, PURIFICATION AND INITIAL CHARACTERIZATION OF A SINGLE STRAND BINDING PROTEIN FROM *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE*. <sup>1</sup>Serpa, V. I.; Tavares, C.; Vernal, J.; Pedrosa, F. O.; Souza, E. M.; Terenzi, H. Bioquímica CCB-UFSC

**Objetivo:**

Single strand binding proteins play vital roles in a number of cellular processes such as DNA replication, recombination and repair. There is evidence that they also interact specifically with a variety of other proteins which are involved in these processes including DNA polymerases and exonucleases.

*Herbaspirillum seropedicae* is a  $\alpha$ -proteobacteria and an obligate endophytic diazotroph found in association with grasses, rice, and sugarcane. In this work, we describe the expression, purification and initial characterization of a single strand binding protein from *H. seropedicae*.

**Métodos e Resultados:** Its amino acid sequence shows high identity with single strand binding proteins of other microorganisms. Mass spectrometry data confirmed the identity of this protein and also the coincidence between theoretical predicted molecular weight with that of the purified recombinant protein. Thermal denaturation monitored by UV absorption suggested proper folding of the recombinant protein.

**Conclusões:**

We obtained the single strand binding protein from *H. seropedicae* highly purified. From its amino acid sequence alignment it can be observed that it shares high identity with single strand binding proteins from others microorganisms. Further biochemical and functional properties of this protein are under investigation.

21.004

IDENTIFICATION OF THE HEAT SHOCK ELEMENT(S) IN THE POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HSP70 GENES OF *TRYPANOSOMA CRUZI*. <sup>1</sup>de Carvalho, D. R.\*\*; <sup>1</sup>Silva, R.; <sup>2</sup>Rondinelli, E.; <sup>1</sup>Urmenyi, T. P.; <sup>1</sup>IBCCF-UFRJ; <sup>3</sup>Medicina UFRJ

**Objetivo:**

Kinetoplastid protozoa show a predominance of regulation of gene expression at the post-transcriptional level, which have been shown to be mediated by sequence elements present in untranslated regions (UTRs) of mRNAs and/or intergenic regions. The HSP70 genes of *Trypanosoma cruzi* are organized as 7-10 copies arranged in tandem, and the protein is synthesized at normal temperatures. Upon heat shock, both HSP70 synthesis and mRNA levels are increased in a transcription-independent manner. We aim to identify the heat shock responsive elements of the HSP70 mRNA.

**Métodos e Resultados:**

The HSP70 trans-splicing acceptor and polyadenylation sites were first identified. We found a major and a minor trans-splicing acceptor site, and three distinct cleavage/polyadenylation sites. Plasmids containing the chloramfenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene were constructed to generate a reporter system. In these constructs the CAT gene is flanked by segments of the HSP70 intergenic region containing either the 5' UTR or 3' UTR and their respective regulatory sequences. Rab7 UTRs containing sequences are being used as control plasmids. The reporter genes are under the control of the 18S ribosomal RNA promoter. The activity of the promoter-containing sequence was validated in transient transfection essays. CAT enzymatic activity resulting from transient transfection of the plasmid constructs are being determined. The half-life of the endogenous *T. cruzi* HSP70 mRNA under stress and non-stress conditions are also being determined.

**Conclusões:**

Alternate trans-splicing and polyadenylation sites were identified in the processing of HSP70 mRNA. A CAT reporter gene assay in transiently transfected *T. cruzi* is currently being utilized to identify the heat-responsive elements of HSP70 mRNA.

21.005

EXPRESSÃO DA MELANOPSINA E MODULAÇÃO DO GENE *CLOCK* POR ENDOTELINA EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE *DANIO RERIO*. Farhat, F. P.; Isoldi, M. C.\*\*; Scarparo, A. C.\*\*; Visconti, M. A.; Castrucci, A. M. L. Fisiologia USP

**Objetivo:**

Investigar se as células embrionárias de *Danio rerio* ZEM 2S são fotossensíveis, graças a presença de melanopsina e constituem um relógio periférico, modulável por endotelina, através da verificação da expressão de melanopsina por PCR, clonagem e sequenciamento; da proliferação das células submetidas a diferentes fotofases; da expressão de receptores de endotelina por PCR, clonagem e sequenciamento e do efeito modulatório da endotelina sobre a expressão gênica de *clock*.

**Métodos e Resultados:**

Nos experimentos referentes à proliferação, semeou-se  $1 \times 10^6$  células em meio suplementado com 10% de soro fetal bovino em frascos de cultura de  $25 \text{cm}^2$ . A partir do segundo dia, a cada 24 horas, as células foram destacadas, em triplicata, coradas por Trypan Blue e contadas em câmara de Neubauer. Não houve diferença significativa entre o tempo de duplicação de células mantidas em fotoperíodos 14C:10E e 10C:14E, porém houve diminuição do tempo de duplicação no escuro e um aumento no claro. Foram feitos ensaios de PCR com cDNA de células ZEM 2S, com primers para melanopsina e para receptores de endotelina de *D. rerio*. A expressão tanto da melanopsina quanto do receptor ETA para endotelina foram confirmadas por sequenciamento. Através de PCR em tempo real foi detectada a ação da endotelina-1 sobre a transcrição do gene *clock* em duas condições experimentais: uma em que as células foram mantidas em escuro e outra em que as células foram mantidas em fotoperíodo 14C:10E. Houve inibição da transcrição de *clock* em escuro. Nos experimentos envolvendo luz, a transcrição nas células tratadas com o hormônio não apresentou diferença significativa em relação ao controle.

**Conclusões:**

A proliferação é inibida por luz, sendo que a mesma anula o efeito inibitório de endotelina sobre a transcrição de *clock*. Melanopsina e receptores do tipo ETA para endotelina são expressos em células ZEM 2S.

21.006

RNA INTERFERENCE AGAINST MHV-3 VIRUS. <sup>1</sup>Grippo, M. C. C.\*\*; <sup>1</sup>Campos-Pereira, T.\*\*; <sup>2</sup>Gilioli, R.; <sup>3</sup>Cendes, I. L. <sup>1</sup>FCM-UNICAMP; <sup>2</sup>Centro de Sanidade Animal UNICAMP; <sup>3</sup>Genética UNICAMP

**Objetivo:**

RNA Interference (RNAi) has become a powerful and widely used tool for the analysis of gene function and silencing mediated by double stranded RNA (dsRNAs) molecules, resulting in the specific posttranscriptional inactivation of genes. The objective of this study was to verify the efficiency of this new technique in the combat of the virus MHV-3 (hepatite murine type 3).

**Métodos e Resultados:**

MHV is an enveloped virus with a large plus-stranded genome RNA, and belongs to the Coronavirus family, the more frequently pathogen identified in mice used in experimental models. MHV-3 codifies three structural proteins: protein S (spike protein); protein M (membrane protein) and protein N (nucleocapsid protein). This last one was chosen as our target to produce siRNAs molecules. Design of siRNAs was based on the sequence genome of MHV (GenBank AF 201929). We obtained 2 siRNAs, named 634 and 910, based on the position of the messenger RNA. A T7 promoter sequence was inserted upstream to the 21-mer MHV oligonucleotides for the 'in vitro' transcription reaction. L-929 cells were cultivated in 24 wells plates and 270 ng/well of each RNAs were tested by transfection with lipofectin (Invitrogen™). After transfection, cells were infected with 1 TCID<sub>50</sub> of the virus and observed in an interval of 24 to 48 hours, for the presence of cytopathic effect. We found that the siRNAs synthesized with the T7 RNA polymerase system can trigger a potent induction of IFN  $\alpha$  and  $\beta$  in L929 cell line. Further treatment with calf intestine phosphatase successfully eliminated the IFN induction response. The analysis of the results, by direct microscopy, showed reduction of the cytopathic effect of the MHV-3 in the cellular cultures treated with siRNA 910; while siRNA 634 demonstrated not to have a significant effect.

**Conclusões:**

Experiments with siRNAs directed to others sequences of the MHV genome and 'in vivo' experiments are also planned to evaluate the full potential of RNAi against MHV-3 viral infection.

21.007

REGULATION OF PROCOLLAGEN AND HSP47 SYNTHESIS BY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES IN FIBROBLASTS TREATED WITH CYCLOSPORINE. <sup>1</sup>Ferreira, L. R.; <sup>2</sup>Velano, C. E.; <sup>3</sup>Botrel, T. E. A.; <sup>1</sup>Braga, F. A.; <sup>1</sup>Ciências da Vida PUC-MG; <sup>2</sup>Hematologia FMRP-USP; <sup>3</sup>Oncologia Clínica, PUCCamp

**Objetivo:**

Hsp47, an endoplasmic reticulum resident protein, has procollagen-binding properties and has been hypothesized to function as a molecular chaperone in regulating procollagen folding and assembly. In this study, we investigate the interaction of Hsp47 with polysome-associated type I procollagen alpha 1 chains following antisense oligonucleotide treatment directed to Hsp47 in 3T6 cells submitted to treatment with cyclosporine. Cyclosporine is a potent immunosuppressor used frequently in various situations to prevent transplant rejections. Cyclosporine is known to cause increased gingival enlargement and increased collagen production in fibroblasts.

**Métodos e Resultados:**

For these studies, we employed phosphorothioate oligodeoxynucleotides directed to the first five codons of Hsp47 that straddle the predicted translation initiation site of Hsp47. The levels of Hsp47 and type I procollagen were assessed by immunoprecipitation and/or Western Blot analysis. Labelled nascent procollagen chains were isolated from polysome preparations as peptidyl-tRNA complexes using ion exchange chromatography. The electrophoretic profiles of labeled polysomes revealed that the majority of Hsp47 was associated with nascent chains of procollagen. Treatment of 3T6 fibroblasts, previously grown in culture medium with 5 µg/ml cyclosporine, with antisense Hsp47 oligonucleotides after 48 days reduced the levels of Hsp47 and caused a "knock out" of the synthesis of nascent polysome associated procollagen chains.

**Conclusões:**

This study revealed that diminished levels of Hsp47 induced by antisense oligonucleotide treatment of 3T6 fibroblast cells stimulated with cyclosporine also reduce the levels of type I procollagen alpha 1 chains. The results provide further evidence that Hsp47 is associated with procollagen at a very early point during translocation of polysome associated nascent procollagen chains.

21.008

CONSTRUÇÃO DE UM NOVO SISTEMA INDUZÍVEL PARA POSSIBILITAR O ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS PRODUTORAS DE VETOR RETROVIRAL <sup>1</sup>Bajgelman, M. C.; <sup>2</sup>Krieger, J. E.; <sup>3</sup>Costanzi-Strauss, E.; <sup>2</sup>Strauss, B. E.; <sup>1</sup>Biotecnologia USP; <sup>2</sup>Genética e Cardio. Molecular InCor-HC-FMUSP; <sup>3</sup>Biologia Celular e Tecidual USP

**Objetivo:**

O vetor retroviral tem sido largamente utilizado como ferramenta de transferência gênica. Uma de suas aplicações consiste em veicular genes citotóxicos ou citostáticos em células tumorais, com o objetivo de parar seu crescimento. Nossa proposta consiste na construção de um novo sistema, induzível por temperatura, para controlar a transcrição do genoma do vetor retroviral nas células produtoras. O sistema induzível permite cultivar e expandir as células produtoras de vírus a 37°C, mantendo-se o genoma retroviral transcricionalmente inativo. Reduzindo-se a temperatura de cultivo para 32°C, o mecanismo de indução é ativado, iniciando a produção do vetor. Dessa forma, linhagens produtoras de vetor retroviral contendo genes tóxicos poderão ser estabelecidas na temperatura de 37°C, protegidas do efeito deletério de genes citotóxicos ou citostáticos codificados no genoma viral.

**Métodos e Resultados:**

O genoma retroviral é manipulado em vetores plasmídiais. Os plasmídios componentes do sistema foram construídos de forma a conter um promotor induzível para possibilitar o controle transcricional do genoma viral. Diversas combinações de enhancers e promotores foram testadas por meio de ensaios repórter com o gene da luciferase para se determinar o melhor arranjo para a construção do promotor quimérico induzível. Após obter as construções finais, os plasmídios induzíveis foram testados individualmente em ensaios Northern Blot para confirmar o controle transcricional, e em ensaios funcionais para verificar a produção de vírus.

**Conclusões:**

Os vetores induzíveis construídos foram analisados por meio de ensaios Northern Blot verificando-se controle transcricional conforme esperado. Os vetores também foram individualmente testados e aprovados em ensaios funcionais para a produção de vírus na ausência e na presença de indução.

21.009

EXPRESSÃO DA RODOPSINA E SUA MODULAÇÃO POR ENDOTELINA-1 EM MELANÓCITOS B16 DE MUS MUSCULUS. <sup>1</sup> Lopes, G. J. R.; <sup>2</sup>Isoldi, M. C.; <sup>2</sup>Scaparo, A.C.; <sup>1</sup>Visconti, M. A.; <sup>3</sup>Castrucci, A. M. L.; <sup>1</sup>Fisiologia IB-USP; <sup>2</sup>Biologia University of Virginia; <sup>3</sup>Biologia, USP

**Objetivo:**

Investigar (1) se os melanócitos B16 de *Mus musculus* são fotossensíveis devido à expressão gênica de opsinas através de PCR, clonagem e sequenciamento; (2) a expressão de receptores de endotelina através de PCR, clonagem e sequenciamento; (3) se a expressão gênica da rodopsina é modulável por endotelina-1 através de PCR em tempo real.

**Métodos e Resultados:**

Foram realizados ensaios de PCR com cDNA de células B16 e primers para opsinas e para receptores de endotelina. A expressão gênica de rodopsina e do receptor para endotelina ETA foi confirmada através de clonagem e sequenciamento. Para os ensaios de PCR em tempo real, as células foram mantidas em escuro constante, em meio suplementado com 2% de soro fetal bovino por 5 dias, sendo então submetidas ao tratamento com ET-1 em concentrações crescentes (10<sup>-11</sup> a 10<sup>-7</sup>M), pelo período de 12 horas. Demonstramos que os efeitos de ET-1 sobre a expressão da rodopsina são dose-dependente, pois nas concentrações de 10<sup>-11</sup> e 10<sup>-10</sup>M, a transcrição da rodopsina apresentou-se significativamente aumentada quando comparada ao grupo controle (n=6, P<0,05 e P<0,001, respectivamente). É interessante mencionar que concentrações mais altas não evocaram resposta, sugerindo uma dessensibilização por dose.

**Conclusões:**

Melanócitos B16 de *Mus musculus* expressam o fotopigmento rodopsina, assim como receptores para endotelina do tipo ETA. A expressão gênica da rodopsina é modulável pelo tratamento de 12h com ET-1, nas concentrações mais baixas (10<sup>-11</sup> e 10<sup>-10</sup>M), promovendo um aumento significativo da transcrição.

21.010

DEVELOPMENT OF AN RNAI-BASED TREATMENT FOR SHISTOSOMIASIS. <sup>1</sup>Campos-Pereira, T. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Pascoal, V. <sup>\*</sup>; <sup>2</sup>Maia, I. G.; <sup>3</sup>Magalhães, L. A.; <sup>3</sup>Zanotti-Magalhães, E. M.; <sup>4</sup>Cendes, I. L. <sup>1</sup>FCM-UNICAMP; <sup>2</sup>Genética UNESP-Botucatu; <sup>3</sup>Parasitologia, UNICAMP; <sup>4</sup>Genética UNICAMP

**Objetivo:**

Approximately two hundred million people are infected with *Schistosoma mansoni* worldwide, demonstrating its high medical importance. *S. mansoni* is unable to synthesize purines *de novo*; therefore, it uses precursors obtained from the host blood, using the essential gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRTase), a long-dated potential drug target. RNA interference (RNAi) is a technology that promotes potent and specific gene silencing. It is based on the introduction of small interfering RNAs (siRNAs) that guide target RNA degradation. Its therapeutic use was demonstrated against viruses *in vitro* and *in vivo*. These reports prompted us to investigate the *in vivo* efficiency of this technique against a parasitic infection, by silencing *S. mansoni* encoded HGPRTase gene in infected mice.

**Métodos e Resultados:**

We chose three target sequences in the *Schistosoma mansoni* encoded HGPRTase coding region and produced siRNAs by *in vitro* transcription.

One hundred twenty mice were infected with one hundred cercariae each. Seventy days later, animals were mock-inoculated (PBS buffer), inoculated with functional, irrelevant or mutated version of siRNAs (five micrograms diluted in PBS per animal). Six days after the injection, the animals were sacrificed and the number of parasites was counted in the liver and in the porta and mesenteric veins. Overall, the total number of parasites per mouse was reduced by approximately 27% after treatment with siRNAs. The mean number of parasites in control groups was: i) buffer only - 39 (median = 40), ii) mutated siRNAs - 39 (median = 39), iii) irrelevant siRNAs - 42 (median = 44) as compared to a mean of 29 parasites (median = 28) in the siRNA-treated group (*P* =

0.0023, Kruscal-Wallis). Kaplan-Meier survival analysis confirmed the difference between the tested groups ( $P = 0.0023$ ).

**Conclusões:**

Here we show the successful use of RNAi against *S. mansoni in vivo*. This new approach opens new avenues of research. Our work now expands RNAi therapeutic range to combat parasites, promising a general revolution in disease treatment.