

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RODRIGO SCHIMUNDA NEHER

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO PARA A
INVESTIGAÇÃO DA PROTEÍNA Ric-8B NO MODELO DE PARKINSONISMO
INDUZIDO POR 6-OHDA**

CURITIBA

2012

RODRIGO SCHIMUNDA NEHER

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO PARA A
INVESTIGAÇÃO DA PROTEÍNA Ric-8B NO MODELO DE PARKINSONISMO
INDUZIDO POR 6-OHDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Orientadora: Profa Dra. Adriana Frohlich
Mercadante**

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Neher, Rodrigo Schimunda

Padronização da técnica de PCR quantitativo para a investigação da proteína Ric-8B no modelo de parkinsonismo induzido por 6-OHDA. / Rodrigo Schimunda Neher. – Curitiba, 2012.

71 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Adriana Frohlich Mercadante

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Patologia e Parasitologia.

1. Parkinson, Doença de 2. Oxidopamina I. Título II. Mercadante, Adriana Frohlich F. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Patologia e Parasitologia.

CDD (20. ed.) 616.833

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer minha orientadora, **Professora Doutora Adriana Frohlich Mercadante**, não somente pela inspiração científica e por todas as oportunidades que me proporcionou durante esses vários anos, mas principalmente pela infinita paciência e respeito que teve comigo.

A doutoranda **Ronise Santiago** que me auxiliou em todas as cirurgias nos animais.

A professora **Maria Aparecida Vital** pela acolhida no laboratório e ajuda com os modelos animais.

Ao professor **Marcelo Lima** pelas dicas durante a qualificação e ajuda com os gráficos.

A professora **Sheila Maria Brochado Winnischofer** pela ajuda nas correções durante a qualificação.

A professora **Bettina Malnic** do Instituto de Química da USP-SP por emprestar, para sempre, alguns reagentes além de fornecer importantes apontamentos durante as fases iniciais do projeto.

Ao doutorando **Thiago Jacomasso** pela disponibilidade e paciência em me ajudar com a padronização.

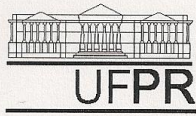
A **Sofia Pereira, Max Ingberman, Celso Fávaro Junior e Breno Beirão** colegas de trabalho essenciais que disponibilizaram tempo para me auxiliar com várias dúvidas.

Aos colegas do **Laboratório de Neurobiologia**, que com certeza sentirão minha falta, quero dizer que a melhor parte do trabalho foram as amizades que conquistei. Agradecimentos especiais para **Caroline Fidalgo** e **Silvia Daniele** pelas várias risadas e conversas durante o almoço, para **Luiz Eduardo Rizzo, Michele Dietrich** e **Márcia Helena Appel** pelos conselhos bem pontuados de quem já passou por tudo que estou passando.

Aos amigos **Bassam Felipe Mogharbel, Felipe Mattos, Luis Paulo Silveira Alves** que não têm medo de passar vergonha para dar umas boas risadas. Quero lembrar aos amigos cientistas **Luis Felipe Manvailier** e **Luis Fernando Kraft** que eles também moram no meu coração. Sentirei falta de vocês quando precisar escrever o item “alegria, modo de fazer” na dissertação da vida.

A minha família: **Michelle Yurie Nakamura** pessoa especial que acredita muito em mim, mesmo quando eu mesmo sou incapaz de acreditar que consigo. Além de ser minha musa inspiradora principalmente pela persistência e perseverança. Ao meu pai, **Wilmar Neher**, gaúcho casca grossa, que me apoia incondicionalmente em todas as minhas aventuras. Aos meus irmãos **Clarissa** e **Diogo Schimunda Neher**, que não me ajudaram mas também não me atrapalharam o que é bastante coisas. Eu amo todos eles.

A **Capes**, pelo auxílio financeiro: saudades já.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Padronização da técnica de PCR quantitativo para a investigação da proteína Ric-8B no modelo de Parkinsonismo induzido por 6-OHDA”

por

RODRIGO SCHIMUNDA NEHER

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Adriana F. Mercadante
Prof^a. Dr^a. Adriana Frohlich Mercadante (presidente)

Sheila Maria Brochado Winnischofer
Prof^a. Dr^a. Sheila Maria Brochado Winnischofer

Marcelo de Meira Santos Lima
Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Membro Suplente

Curitiba, 15 de maio de 2012.

“No que diz respeito ao desempenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.”

Ayrton Senna

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo causado pela morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* que liberam dopamina no estriado. No estriado há neurônios que expressam receptores de dopamina (D1R), os quais fazem parte da família de receptores acoplados à proteína G e estão associados a proteína Golf. A proteína Ric-8B se liga diretamente a subunidade alfa livre da proteína Golf e trabalhos anteriores indicam que Ric-8B é capaz de amplificar o sinal dessa via, funcionando como uma GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*). Como a DP é caracterizada por uma severa diminuição dos níveis de DA no estriado por consequente morte dos neurônios dopaminérgicos, se Ric-8B é capaz de aumentar o sinal dos receptores de DA, torna-se importante investigar uma possível relação entre a proteína Ric-8B e a DP para definir se essa proteína poderá ser usada como alvo para o tratamento da doença. Através do modelo animal de DP lesado com 6-OHDA esse trabalho iniciou a investigação dessa possível relação. Foram retirados os estriados dos animais tratados ou não com a toxina em diferentes tempos (4 horas, 24 horas, 3 dias e 7 dias). Inicialmente padronizou-se a técnica de RT-qPCR utilizando iniciadores específicos para Ric-8B (transcrito longo e transcrito curto) bem como para G α olf. Foram utilizados também 5 genes de expressão constitutivas na normalização: HPRT, GAPDH, HMBS, ACTB e β 2M. Através do uso do programa GeNorm, demonstrou-se que dentro desses 5 genes, para o nosso caso, os melhores genes para calcular a expressão normalizada seriam GAPDH e HMBS. Em seguida, através da mesma técnica de PCR em tempo-real (RT-qPCR), quantificou-se a expressão dos genes de Ric 8B (transcritos longo e curto) e de G α olf, na tentativa de se avaliar a expressão destes genes no decorrer na DP. Os resultados indicaram que há tendência a um aumento da expressão destes genes após 3 dias, porém tanto nos animais que foram tratados com 6-OHDA, quanto nos animais *sham*. Assim, os dados obtidos no presente trabalho ainda não foram conclusivos com relação a expressão desses genes no decorrer da DP. Entretanto, nesse trabalho foi possível padronizar a técnica de RT-qPCR para o estudo destes genes, o que possibilitará um estudo maior no futuro, utilizando outros modelos animais de DP ou outras regiões do cérebro. Sem dúvida, o desenvolvimento deste projeto foi importante para iniciar o estudo de Ric-8B como um potencial alvo na DP.

ABSTRACT

The Parkinson's Disease (PD) is a neurodegenerative disorder caused by the death of dopaminergic neurons in the substantia *nigra pars compacta* that release dopamine in the striatum. Striatal neurons express receptors for dopamine (D1R), which belong to the family of G protein-coupled receptors and are associated with Golf. Ric-8B protein binds directly to the free alpha subunit protein Golf, and previous studies indicate that Ric-8B is capable to amplify the D1R/Golf signalling pathway, functioning as a GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*). As PD is characterized by a severe decrease in dopamine levels in the striatum and Ric-8B is able to increase the signal of the D1 receptors, it is important to investigate a possible relationship between the protein Ric-8B and PD and if Ric-8B can be used as a target for treatment of this disease. In this work, we used the animal model of PD with 6-OHDA injured to investigate this possible relationship. The striatum of the animals treated with toxin or not at different times (4 hours, 24 hours, 3 days and 7 days) were removed and its RNA was used in RT-qPCR to quantify Ric-8B (full-length Ric-8B and Ric-8B Δ 9) and Golf genes expression during the PD. The RT-qPCR was standardized and reference genes GAPDH and HMBS were selected by a GeNorm analysis and used for normalization. Our results indicated that after 3 days, all these transcripts tend to increase their expression, however, both in animals treated with 6-OHDA, and *sham* animals. Thus, the data obtained in this study has not yet been conclusive regarding the expression of Ric-8B and Golf genes during the PD. It is important to note that this work enabled the standardization RT-qPCR to quantify these genes, in the future using other animal models of PD and other brain regions. Undoubtedly, the development of this project was important to start the study of Ric-8B as a potential target in PD.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GRUPOS DE ANIMAIS UTILIZADOS NA EXPERIMENTAÇÃO.....	34
TABELA 2 – SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE RT-qPCR.....	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – NEUROPATOLOGIA DA DP.....	15
FIGURA 2 – A DISSOCIAÇÃO DE UMA PROTEÍNA G ATIVADA EM DOIS COMPONENTES SINALIZADORES.....	18
FIGURA 3 - A DOPAMINA E SINALIZAÇÃO INTRACELULAR.....	19
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO GENE Ric-8B.....	22
FIGURA 5 – PCR PARA VERIFICAÇÃO DOS INICIADORES Ric 8B LONGO E Ric 8B CURTO.....	41
FIGURA 6 – PCR PARA VERIFICAÇÃO DOS INICIADORES G α olf CURTO, G α olf LONGO e G α olf CURTO E LONGO.....	42
FIGURA 7 - PCR PARA VERIFICAÇÃO DOS INICIADORES GAPDH, ACTB, HMBS e β 2M.....	43
FIGURA 8 – CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE DÍMERO DE INICIADOR.....	44
FIGURA 9 – CURVA DE DISSOCIAÇÃO PARA Ric 8B LONGO.....	45
FIGURA 10 – CURVA DE DISSOCIAÇÃO PARA Ric 8B CURTO.....	45
FIGURA 11 – CURVA DE DISSOCIAÇÃO PARA G α olf CURTO E LONGO.....	46
FIGURA 12 – CURVA DE DISSOCIAÇÃO PARA G α olf CURTO.....	47
FIGURA 13 – CURVA DE DISSOCIAÇÃO PARA G α olf LONGO.....	47
FIGURA 14 – CORRIDA DE RT-qPCR PADRÃO.....	49
FIGURA 15 - INÍCIO DA DETERMINAÇÃO DO GENE DE CONTROLE INTERNO MAIS ESTÁVEL.....	50
FIGURA 16 – FIM DA DETERMINAÇÃO DO GENE DE CONTROLE INTERNO MAIS ESTÁVEL.....	51
FIGURA 17 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE G α olf EM DIFERENTES TEMPOS DO TRATAMENTO.....	52
FIGURA 18 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE Ric 8B TRANSCRITO LONGO EM DIFERENTES TEMPOS DO TRATAMENTO.....	53
FIGURA 19 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE Ric 8B TRANSCRITO CURTO EM DIFERENTES TEMPOS DO TRATAMENTO.....	53

FIGURA 20 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE HPRT EM DIFERENTES TEMPOS DO TRATAMENTO.....	55
FIGURA 21 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE B2M EM DIFERENTES TEMPOS DO TRATAMENTO.....	55
FIGURA 22 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE ACTB EM DIFERENTES TEMPOS DO TRATAMENTO.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

6 – OHDA - 6-hidroxi-dopamina
ACTB – β actina
BLAST – *Basic local alignment search tool*
bp – Pares de Base
 β 2M – Beta-2-microglobulina
cAMP – AMP cíclico
cDNA – DNA complementar
Ct – *Threshold cycle* (ciclo limiar)
D1R – Receptor de dopamina 1
D2R – Receptor de dopamina 2
DEPC - Diethylpirocarbonato
DA - Dopamina
FWD - *Foward*
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G α q – Subunidade α da proteína G, classe q
G α o - Subunidade α da proteína G, classe o
G α OLF – Proteína G olfatória
G α s – Subunidade α da proteína G, classe s
GDP – Guanosina difosfato
GEF - *Guanine nucleotide exchange factor*
GPCR – Receptores associados a proteína G
GTP – Guanosina trifosfato
HMBS – Hidroximetilbilano sintase
HPRT – Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
LPS - Lipopolisacarídeo
M – Estabilidade da expressão do gene calculado
Min - Minutos
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

mRNA – RNA mensageiro

PCR – Reação em cadeia polimerase

DP – Doença de Parkinson

RVS - *Reverse*

RIC – Resistente a inibidores de colinesterase

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real

SNpc – Substância Negra *pars compacta*

SUMÁRIO

1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1 – A Doença de Parkinson.....	15
1.2 – Ação molecular da dopamina no estriado	17
1.3 – As proteínas Ric-8.....	21
1.4 Evidências da participação de Ric-8B na amplificação do sinal mediado por Golf e D1R.....	23
1.5 – Modelos animais no estudo da Doença de Parkinson.....	25
1.6 – O PCR em tempo real (RT-qPCR) e suas aplicações na quantificação de genes	28
2 - JUSTIFICATIVA.....	31
3 – OBJETIVOS	33
3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4 – METODOLOGIA.....	34
4.1 – Experimentação animal.....	34
4.1.1 – Cirurgia estereotáxica	34
4.2 – Extração de tecidos e RNA	35
4.3 – Reação de transcriptase reversa.....	36
4.4 – PCR.....	36
4.5 – Quantificação da expressão gênica	37
4.6 - Iniciadores utilizados.....	38
4.7- Análise estatística	40
5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
5.1 - Iniciadores e PCR	41
5.2 - Normalização utilizando múltiplos genes de controle interno.....	49
5.3 – Quantificação da expressão dos transcritos Golf, Ric 8B longa e Ric 8B curta	52
6 - DISCUSSAO FINAL.....	58
7 - CONCLUSOES	64
8 - PERSPECTIVAS PARA A PUBLICAÇÃO	65
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
10 – ANEXO.....	71

1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 – A DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais freqüente após a Doença de Alzheimer (Dauer e Przedborski, 2003).

A DP é um distúrbio neurodegenerativo causado pela degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra que fornecem dopamina (DA) para o estriado (Ahmed, Berthet *et al.*, 2010). A principal característica neuroquímica e neuropatológica da DP é a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da Substancia Negra *pars compacta* (SNpc) associada a inclusões citoplasmáticas denominadas de corpos de Lewy (Truong, Allbutt *et al.*, 2009).

A via dopaminérgica nigroestriatal é composta de neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na SNpc e projetam seus axônios para o caudado putamen, ou corpo estriado (Przedborski, 2005) (figura 1). A redução na densidade neuronal gera uma diminuição na projeção de fibras dopaminérgicas que se projetam para o estriado dorsal causando redução dos níveis de DA e de seus metabólitos (Przedborski, 2005).

Características clínicas da DP incluem bradicinesia (movimentos involuntários), rigidez e tremor. Essa perda neuronal resulta em sintomas que incluem o declínio cognitivo, sono anormal, depressão e distúrbios gastrointestinais e geniturinários. (Schapira, Bezard *et al.*, 2006).

Os sinais parkinsonianos aparecem quando a morte neuronal ultrapassa o limiar crítico que acarreta a diminuição de 70% a 80% de dopamina nos terminais nervosos do estriado (Warraich, Allbutt *et al.*, 2009).

Os corpos de Lewy são inclusões citoplasmáticas eosinofílicas arredondadas, compostas de várias proteínas. A deposição dessas proteínas pode ser tóxica aos neurônios, visto que essas causariam danos celulares, seqüestrando outras proteínas importantes para a sobrevivência da célula nervosa (Mattson, Gleichmann *et al.*, 2008).

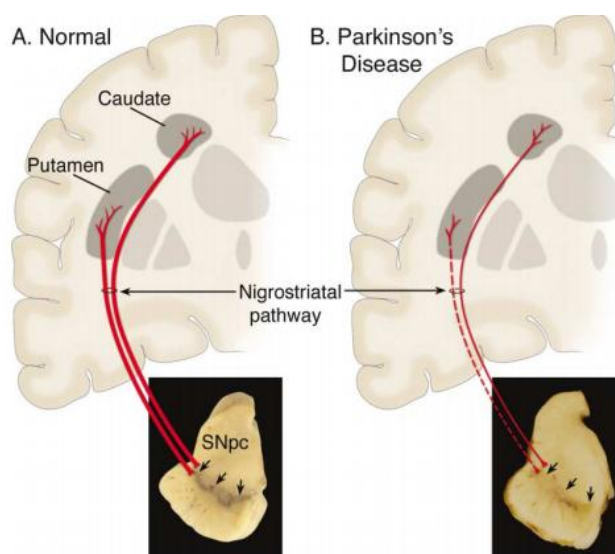


FIGURA 1: NEUROPATOLOGIA DA DP:

FONTE: (Dauer e Przedborski, 2003)

NOTA: Letra **A**: representação esquemática do caminho nigroestriatal normal. Letra **B**: representação esquemática do caminho nigroestriatal doente.

A etiologia do Parkinsonismo primário ou idiopático, ou ainda chamado de Parkinsonismo esporádico, permanece desconhecida (Mattson, Gleichmann *et al.*, 2008), o que a diferencia de outras formas de Parkinsonismo como o secundário, que pode ser causado por hidrocefalia, hipóxia, infecções, trauma, tumor, por exposições a drogas e Parkinsonismo associado a outras doenças neurodegenerativas. Ainda, há a forma familiar da doença, 5 a 10%, dos casos, na qual se observam ligações entre a ocorrência da doença e mutações de genes. A DP familiar e a DP esporádica se diferenciam clinicamente e patologicamente, mas ambas apresentam degeneração dopaminérgica (Moore, West *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, estudos clínicos *pos mortem* e experimentos *in vivo* e *in vitro* com modelos animais, tem possibilitado algum entendimento sobre a patogênese da doença. As hipóteses incluem: defeitos conformacionais nas estruturas de proteínas citoplasmáticas e disfunções mitocondriais com conseqüente aumento do estresse oxidativo resultando de morte neuronal (Reale, Iarlori *et al.*, 2009). Outros fatores considerados são a exotoxicidade, neuroinflamação e eventos apoptóticos (Reale, Iarlori *et al.*, 2009).

O tratamento farmacológico da DP é realizado principalmente por drogas que substituem a DA, inibidores da dopa descarboxilase de ação periférica, agonistas dopaminérgicos, inibidores da monoamina oxidase (MAO-B), drogas que liberam a DA e antagonistas de receptores colinérgicos, destinados a contrabalancear o

desequilíbrio neuroquímico provocado principalmente pela degeneração da via nigroestriatal dopaminérgica (Warraich, Allbutt *et al.*, 2009). Apesar de muitas drogas estarem sendo estudadas, a progressão da doença não é ainda bloqueada por nenhum recurso terapêutico disponível e, conforme a doença progride, faz-se necessária a administração de doses cada vez maiores desses fármacos paliativos.

Atualmente a L-DOPA é a droga mais utilizada e eficaz para o controle de sintomas motores. Ela também pode causar um alto grau de complicações motoras, particularmente discinesia (Dauer e Przedborski, 2003).

1.2 – AÇÃO MOLECULAR DA DOPAMINA NO ESTRIADO

A DA é sintetizada no encéfalo através da ativação da enzima tirosina hidroxilase (TH) que converte o aminoácido tirosina em L-DOPA, que por sua vez é descarboxilado para formar a DA (Missale, Nash *et al.*, 1998). Como já mencionado, os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos se localizam na Substância Negra *pars compacta* (SNpc) e projetam seus axônios para o caudado-putâmen, ou corpo estriado (Przedborski, 2005), onde se encontram neurônios que expressam os receptores de dopamina. Estes receptores pertencem à super-família de receptores associados à proteína G (GPCRs- *G-protein coupled receptors*). Os GPCR formam a maior família de receptores de superfície e são encontrados em todos os eucariotos. Esses receptores medeiam as respostas de uma enorme diversidade de moléculas sinalizadoras, como hormônios, neurotransmissores e mediadores locais (Alberts, 2002) .

Todos os GPCRs têm estrutura semelhante, a despeito da diversidade química e funcional das moléculas sinalizadoras que se ligam a eles. Consistem de uma cadeia peptídica única que atravessa sete vezes a bicamada lipídica. Além da sua orientação característica na membrana plasmática, eles têm a mesma relação funcional com as proteínas G, com as quais se associam para sinalizar para o interior da célula a presença de um ligante extracelular (Alberts, 2002) (Pierce, Premont *et al.*, 2002). Quando as moléculas sinalizadoras extracelulares se ligam aos GPCRs, eles sofrem uma mudança conformacional que os torna capazes de ativar a proteína G. As proteínas G estão ligadas a face citoplasmática da

membrana, onde servem como moléculas transmissoras, acoplado funcionalmente os receptores a enzimas ou a canais iônicos na membrana. Existem vários tipos de proteínas G, cada uma específica para um conjunto particular de GPCR e para um conjunto particular de proteínas alvo na membrana plasmática. Contudo, todas as proteínas G possuem uma estrutura semelhante e funcionam de modo similar (Alberts, 2002). As proteínas G são formadas por três subunidades α , β , e γ . No estado não estimulado, a subunidade α possui GDP ligado, e a proteína G está inativa. Quando estimulada por um receptor ativado (GPCR que se ligou ao seu agonista), a subunidade α libera seu GDP, permitindo que o GTP se ligue no seu lugar. Essa troca causa a dissociação do trímero em dois componentes ativados: uma subunidade α e um complexo $\beta\gamma$ (Alberts, 2002). A subunidade α possui atividade GTPase e, ao hidrolisar o GTP ligado e ficar ligada a GDP, se reassocia com o complexo $\beta\gamma$, levando a formação de uma proteína G inativa, revertendo o processo de ativação (Alberts, 2002;(Hepler e Gilman, 1992). A figura 2 esquematiza a dissociação da proteína G após a ligação de uma molécula sinal em um GPCR.

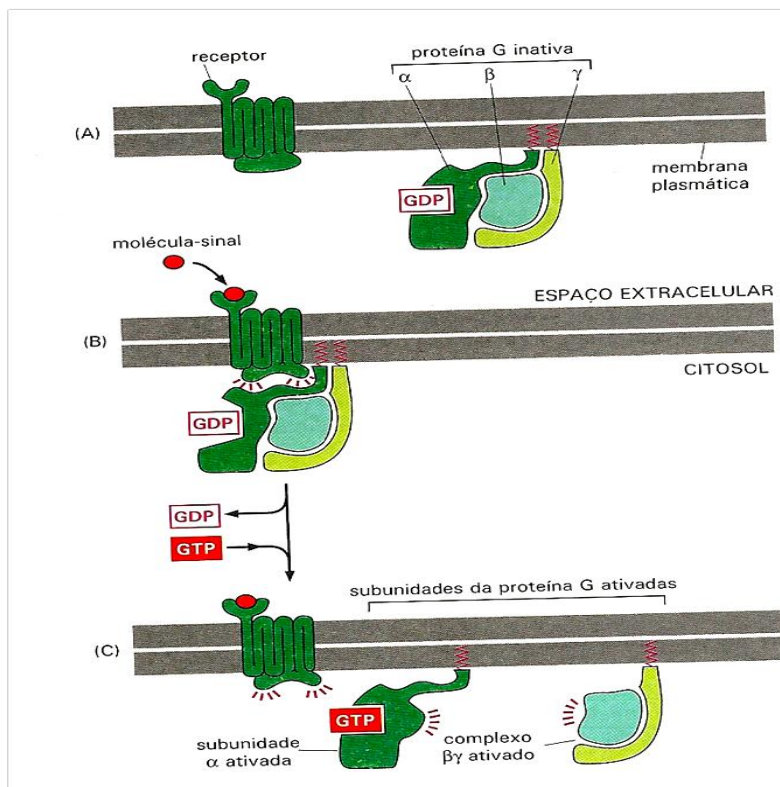


FIGURA 2: A DISSOCIAÇÃO DE UMA PROTEÍNA G ATIVADA EM DOIS COMPONENTES SINALIZADORES

FONTE: Alberts, 2002.

NOTA: (A) No estado não estimulado, o receptor e a proteína G estão inativos. Embora estejam mostrados aqui como entidades separadas na membrana plasmática, em alguns casos, pelo menos, eles estão associados em um complexo pré formado. (B) A ligação de um sinal extracelular ao receptor altera a conformação deste que, por sua vez, altera a conformação da proteína G associada a ele. (C) A alteração da subunidade α da proteína G permite a troca do seu GDP por GTP. Isso causa sua dissociação em dois componentes ativos – uma subunidade α e um complexo $\beta\gamma$, podendo, ambos, regular a atividade de proteínas alvo na membrana plasmática. O receptor permanece ativo enquanto o sinal externo estiver ligado a ele, podendo, por isso, catalisar a ativação de muitas moléculas de proteína G.

Existem pelo menos cinco tipos de receptores de DA no sistema nervoso central de vertebrados, e estes se enquadram em duas classes: tipo D1 (D1, D5) e D2-tipo (D2, D3, D4). O corpo estriado tem uma densidade muito elevada de receptores D1 e D2, concentrações localizadas de receptores D3 em regiões do estriado ventral, e níveis mais baixos de receptores D4 e D5. Em virtude de sua elevada densidade estriatal, serão focados aqui os receptores D1 e D2. Receptores D1 estão acoplados a G_s / G_{olf} e, assim, estimulam a adenilato-ciclase para produzir o segundo mensageiro intracelular de AMPc. O AMPc, por sua vez ativa a proteína quinase (PKA) dependente de AMPc, que fosforila numerosos substratos, incluindo

os canais de cálcio tipo L, fatores de transcrição tais como CREB e outros componentes de sinalização intracelular (figura 3).

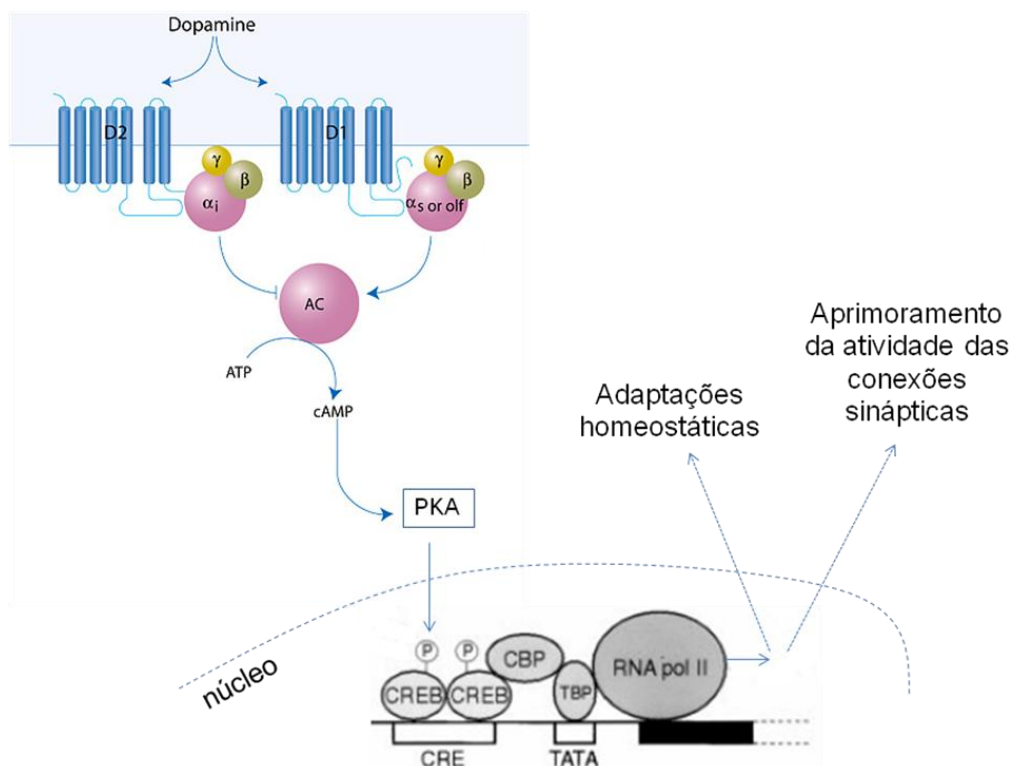


FIGURA 3. A DOPAMINA E SINALIZACAO INTRACELULAR

FONTE: adaptado de (Yamada, Gerber *et al.*, 2007) e de (Berke e Hyman, 2000)

NOTA: abreviações: D1 – receptor de dopamina D1; D2 receptor de dopamina D2; AC – adenilato ciclase; ATP – adenosina trifosfato; cAMP – AMP cíclico; PKA – proteína quinase dependente de AMP. Após receber o sinal externo de dopamina, os receptores acoplados a proteína G (α_s ou α_{olf}) estimulam a AC para produzir o segundo mensageiro de cAMP que por sua vez ativa PKA que fosforila numerosos substratos incluindo fatores de transcrição, tais como CREB, que são componentes de sinalização intracelular. Alguns genes são responsáveis pela resposta homeostática, outros estão envolvidos na mudança da força das conexões sinápticas.

Receptores D2 são acoplados a G_i / G_o e, assim, promovem a inibição da adenilato-ciclase. Os receptores D2 do estriado são continuamente estimulados por níveis basais de dopamina, e essa atividade é importante para o comportamento motor normal. Camundongos que não expressam receptores D2 apresentam sintomas Parkinsonianos (Baik, Picetti *et al.*, 1995), da mesma forma que animais selvagens tratados com antagonistas de D2. Camundongos que não expressam receptores D1 não mostram sintomas Parkinsonianos ou outras anormalidades motoras, sugerindo que a estimulação de receptores D2 pode ser mais essencial para o papel facilitador de dopamina no comportamento estriatal. Receptores D1 pode ter um papel maior nos efeitos da DA sobre a aprendizagem (Beninger e Miller,

1998). No entanto, a ativação de ambos os receptores D1 e D2 pode ter efeitos sinérgicos sobre a atividade neural, expressão gênica e comportamento (Schapira, Bezard *et al.*, 2006).

Com relação à DP, vários alvos vêm sendo estudados para o uso de fármacos no tratamento dessa doença (Schapira, Bezard *et al.*, 2006). A via de sinalização da DA, mediada pelos receptores GPCR é um desses alvos. Como será visto adiante, durante o seu pós-doutorado, a orientadora do presente trabalho participou de um projeto que foi capaz de identificar a proteína Ric-8B como sendo capaz de amplificar o sinal da subunidade alfa da proteína Golf. A localização de Ric-8B no estriado e sua capacidade de amplificar *in vitro* o sinal de AMPc mediado pela ligação de DA ao receptor D1, trouxeram fortes suspeitas de que Ric-8B possa ser um desses alvos moleculares para o tratamento da DP. A seguir, Ric-8B e seu possível papel no estriado serão reportados.

1.3 – AS PROTEÍNAS RIC-8

Ric-8 foi inicialmente isolada através de varreduras feitas em mutantes de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) que eram resistentes a inibidores de colinesterases (Ric). Estes mutantes foram selecionados pela sua habilidade de sobreviver a estes inibidores, os quais causam o acúmulo tóxico de acetilcolina nas sinapses. Dessa forma, várias proteínas envolvidas na liberação de acetilcolina foram identificadas e assim designadas como Ric, sendo a Ric-8 uma destas proteínas (Miller, Alfonso *et al.*, 1996). Através de ensaios de imunohistoquímica, demonstrou-se que Ric-8 está localizada no citoplasma de neurônios e parece atuar positivamente na via de $G\alpha_q$, uma via que regula a liberação de acetilcolina (Miller e Rand, 2000).

Foi visto que Ric-8 também está envolvido no processo de embriogênese. Miller e colaboradores, 2000, demonstraram, através de experimentos com mutantes de *C. elegans*, que Ric-8 possui importante papel em múltiplos eventos que envolvem o funcionamento normal dos centrôsomos, como o alinhamento correto do plano mitótico e os eventos de migração nuclear (Miller e Rand, 2000). Esta atuação de Ric-8 parece estar relacionada com a interação com a proteína $G\alpha_o$, e

não mais com $G\alpha_q$. Pelo fato de Ric-8 estar envolvida tanto no mecanismo de sinapse, quanto na embriogênese, ele também é conhecido como “Synembryn” “Syn”, referindo-se à sua importância na sinapse e “Embryn”, referindo-se à sua importância no processo de embriogênese) (Miller e Rand, 2000).

Posteriormente, novos trabalhos usando *C. elegans* como modelo, reforçaram que tanto a via de sinalização da sinapse (Reynolds, Schade *et al.*, 2005), quanto o posicionamento do fuso mitótico embrionário (Afshar, Willard *et al.*, 2004; Couwenbergs, Spilker *et al.*, 2004) são desempenhados pela atividade de $G\alpha$, dependente de Ric-8.

Em outro artigo, Tall e colaboradores, através do sistema de duplo-híbrido em leveduras, utilizaram $G\alpha_s$ e $G\alpha_o$ como iscas na varredura de uma biblioteca de cDNA de encéfalo de rato e identificaram duas formas de Ric que foram denominadas Ric-8A e Ric-8B. Experimentos realizados com Ric-8A mostraram que ela se liga na subunidade α da proteína G quando esta apresenta-se inativa, ou seja, ligada a GDP. Quando Ric-8A se liga em $G\alpha$, $G\alpha$ libera o GDP ligado formando um complexo estável com Ric-8A. Estando o sítio GTPásico vazio, GTP é capaz de entrar nele, levando à ativação de $G\alpha$. Nessa etapa, Ric-8A se desligaria do complexo liberando $G\alpha$ ativa. Através da elucidação da função de Ric-8A, esta proteína foi caracterizada como sendo uma GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*) (Tall, Kruminis *et al.*, 2003).

As GEFs formam uma família de proteínas com estruturas bastante diversificadas que catalisam a liberação de GDP do núcleo GTPásico de proteínas da família RAS e da família das proteínas G. Outra característica da interação entre estas proteínas é a formação de um complexo estável entre a GEF e a proteína G (ou RAS) em que o núcleo GTPásico se apresenta vazio, ou livre de nucleotídeo. Como a concentração de GTP intracelular é aproximadamente dez vezes maior que a de GDP, GTP entra neste sítio GTPásico livre ocasionando a desestabilização deste complexo e a conseqüente liberação da proteína G (ou RAS) na conformação ativa, ligadas à GTP (Sprang, 2001).

Através do sistema de duplo-híbrido em levedura, foi identificada uma interação específica entre $G\alpha_{olf}$ (subunidade alfa da proteína G encontrada predominantemente nos neurônios sensoriais olfatórios) e Ric-8B. Ensaio de

“Northern blot” demonstraram que Ric-8B é preferencialmente expresso no epitélio olfatório. Em experimentos de hibridização “in situ”, foi possível verificar que Ric-8B co-localiza-se com G α olf nos neurônios sensoriais maduros do epitélio olfatório. Essa co-localização também foi demonstrada em certas regiões do encéfalo, como o estriado, o *núcleo acumbens* e o tubérculo olfatório. O mais interessante é que foram identificadas duas isoformas de Ric-8B no epitélio olfatório, produzidas por “splicing” alternativo: uma isoforma que não contém o exon 9 (Ric-8B Δ 9) e outra que contém todos os dez exons (Ric-8B) (figura 4). Apenas o transcrito maior é capaz de interagir com G α olf (Von Dannecker, Mercadante *et al.*, 2005).

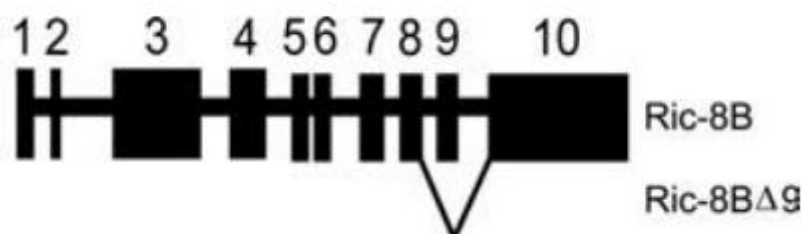


FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO GENE DE Ric-8B

FONTE: (Von Dannecker, Mercadante *et al.*, 2005).

NOTA: Exons são representados pelas caixas pretas e introns são representados pelas linhas. O transcrito alternativo é denominado de Ric-8B Δ 9.

1.4 EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DE RIC-8B NA AMPLIFICAÇÃO DO SINAL MEDIADO POR GOLF E D1R

Na tentativa de verificar um possível papel fisiológico para Ric-8B na modulação do sinal via G α olf, Von Dannecker e colaboradores, 2005, demonstraram, com os ensaios de quantificação de AMPc em células HEK293, que Ric-8B é capaz de amplificar o sinal gerado pela ativação do receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR) e do receptor de DA D1 (D1R) por seus agonistas e que este efeito é dependente de G α olf. O exato mecanismo da modulação de G α olf por Ric-8B, até então, ainda não havia sido determinado. Entretanto, já se suspeitava que Ric-8B também seria uma GEF e que funcionaria da mesma maneira que Ric-8A, já que das proteínas conhecidas, a que apresenta maior identidade com Ric-8B é

mesmo Ric-8A. Fato este que foi confirmado mais recentemente no trabalho de Chan e colaboradores (Chan, Gabay *et al.*, 2010). Foi visto em células HeLa que o transcrito longo de Ric-8B (denominado pelos autores de *full-length* Ric-8B - Ric-8BFL) ligou-se endogenamente em $G_{\alpha s}$ e em quantidades menores em $G_{\alpha q}$. Ric-8BFL estimulou a ligação de GTP na subunidade $G_{\alpha olf}$ enquanto que Ric-8B Δ 9 estimulou a ligação de GTP em $G_{\alpha s}$. Os autores demonstraram, através de ensaios bioquímicos, que o transcrito longo de Ric-8B é uma GEF para $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha olf}$, $G_{\alpha q}$ e $G_{\alpha 13}$. Nesse trabalho os autores também relatam que Ric-8B Δ 9 atua mais como um modesto inibidor de $G_{\alpha olf}$, porém age como GEF para $G_{\alpha s}$ (Chan, Gabay *et al.*, 2010). Quanto à Ric-8A, Tall e colaboradores já haviam mostrado sua especificidade como GEF para $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ e $G_{\alpha 12/13}$ (Tall, Kruminis *et al.*, 2003).

Um outro estudo também demonstrou que Ric-8B regula a atividade de Gas. Foi visto que a proteína Gas é ubiquitinada e que essa ubiquitinação é inibida por Ric-8B. Além disso, em um ensaio bioquímico *in vitro* sugeriu que Ric-8B não possui atividade de GEF (fato negado no trabalho de Chan, 2011). Nesse mesmo estudo observou-se que a isoforma de Ric-8B, gerada por *splicing* alternativo (Ric-8B Δ 9), não conseguiu evitar a ubiquitinação de Gas (Nagai, Nishimura *et al.*, 2010). Um trabalho mais recente ainda (Gabay, Pinter, *et al.*, 2011) demonstrou que tanto Ric-8A, quanto Ric-8B participam como chaperonas importantes para a associação das subunidades alfa de proteínas G. Para investigar o mecanismo pelo qual Ric-8A e Ric-8B regula a função da proteína G *in vivo*, foram criados camundongos transgênicos que não expressavam Ric-8A ou Ric-8B. Animais que tiveram esses genes completamente deletados não se mostraram viáveis e morreram durante a embriogênese. Para sanar o problema da não viabilidade dos animais nocautes, os autores utilizaram células tronco embrionárias de blastocistos viáveis com o propósito de criar um modelo de linhagem de cultura celular para estudar a função da proteína G na completa ausência de Ric-8A e Ric-8B. A abundância de $G_{\alpha s}$ foi reduzida em aproximadamente 85% nas células que não expressavam Ric-8B. Muitas das subunidades G_{α} permaneceram solúveis (não se ligaram na membrana) e foram rapidamente degradadas. Os autores então concluíram que a proteína Ric-8 controla a abundância e função da proteína G pela ação molecular de chaperonas que medeiam a associação inicial da subunidade α da proteína G com a endomembrana (Gabay, Pinter *et al.*, 2011).

Como já mencionado anteriormente, as regiões do encéfalo nas quais detectou-se a co-localização de Ric-8B e G α olf foramestriado, *nucleus accumbens* e tubérculo olfatório (Von Dannecker et al, 2005). Estas áreas estão envolvidas em importantes comportamentos, como o controle da atividade motora e o mecanismo de recompensa mediado por drogas (Gerdeman et al., 2003). Além disso, várias doenças neuropsiquiátricas e motoras, como DP, Huntington e esquizofrenia, estão relacionadas a estas regiões (Graybiel, 2000; Gerdeman et al., 2003). Assim, Ric-8B poderia estar modulando a ativação de G α olf, e conseqüentemente a via de AMPc nestas regiões do encéfalo. No estriado, por exemplo, o controle da via de AMPc, mediada por receptores de adenosina e DA, poderia ser um potencial alvo para o tratamento de psicoses e da DP.

Já foi demonstrado que camundongos nocaute para G α olf mostram alterações na atividade locomotora em resposta a cocaína ou outro agonista do receptor D1 (Zhuang, Belluscio et al., 2000). É provável que G α olf presente no estriado tenha um papel na transdução do sinal mediado por D1R. Trabalhos anteriores já haviam demonstrado uma ligação a D1R para adenilil ciclase no estriado mediado por G α olf (Herve, Levi-Strauss et al., 1993; Zhuang, Belluscio et al., 2000; Herve, Le Moine et al., 2001). Assim, os dados de co-localização de Ric-8B e G α olf em regiões específicas do encéfalo, sobretudo no estriado e os resultados que indicam um efeito amplificador de Ric-8B sobre a estimulação de D1R por DA, dependente de G α olf, sugerem que Ric-8B pode estar envolvida na regulação da via de sinalização da DA (Von Dannecker et al, 2005) .

Com base nisso, o presente trabalho pretendeu investigar se existe alguma relação da proteína Ric-8B com a Doença de Parkinson. Como será visto, um modelo animal para DP foi utilizado para avaliar a expressão de Ric-8B, Ric-8B Δ 9 e G α olf no estriado durante o desenvolvimento da doença. Assim, cabe a seguir uma breve revisão sobre os modelos animais de DP.

1.5 – MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON

Ainda não existe um modelo animal que pode, por si só, representar fidedignamente todos os sinais e sintomas da DP (Da Cunha, Wietzikoski et al.,

2008). Muitos modelos que causam a morte neuronal na SNpc são utilizados como ferramentas para o estudo da DP, dentre esses a administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), do herbicida Paraquat, do herbicida Rotenona (Dauer e Przedborski, 2003) e do Lipopolisacarídeo (LPS) (Reale, Iarlori *et al.*, 2009) . Os animais mais comumente utilizados são ratos, camundongos e macacos (Beal, 2010).

A injeção intranigral de 6-OHDA leva a degeneração, bem como a ativação astrogliar e microglial na via nigroestriatal dopaminérgica, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que conduzem a degeneração dos neurônios catecolaminérgicos e podem também danificar a atividade de proteases (Vercammen, Van Der Perren *et al.*, 2006). Diferente da toxina MPTP, a 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica, e para reproduzir o modelo de Parkinsonismo utilizando essa toxina, é necessário que ela seja infundida intracerebral.

Apesar de muito utilizada, a lesão causada pela 6-OHDA difere da verdadeira lesão da DP, e seu mecanismo ainda não está totalmente elucidado (Przedborski e Vila, 2003).

O MPTP é uma substância lipossolúvel, fato que lhe confere grande capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica, e penetrar nas células gliais e em neurônios serotoninérgicos, e ao sofrer a ação da MAO-B é oxidada em 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinium (MPDP) e em então seletivamente captado pelos neurônios dopaminérgicos, através dos mesmos mecanismos de recaptação da dopamina, vindo a produzir degeneração dessas células por interferência com o metabolismo oxidativo (Kumar, Kaundal *et al.*, 2009).

O herbicida Paraquat, aparentemente, medeia a formação de radicais superóxido (Day, Patel *et al.*, 1999) o que leva a destruição de neurônios dopaminérgicos.

Já foi relato que o inseticida Rotenona administrado intravenosamente em ratos produz uma seletiva degeneração de neurônios dopaminérgicos acompanhado por inclusões de α -sinucleína (Betarbet, Sherer *et al.*, 2000). Por a Rotenona ter acesso livre às células, esse estudo sugere que os neurônios dopaminérgicos são preferencialmente sensíveis a inibição do complexo I da mitocôndria (Dauer e Przedborski, 2003).

Mais recentemente o LPS, uma endotoxina presente na parede celular de bactérias gram-negativas, tem sido estudada e também usada para desenvolver uma síndrome parkinsoniana. O modelo utilizando LPS se faz devido a essa substância ser um potente estimulante de células imunes e a infusão intranigral dessa toxina ser capaz de induzir a degeneração dopaminérgica em ratos (Reale, Iarlori *et al.*, 2009).

Em um estudo recente comparando a administração das três toxinas em ratos observou-se que MPTP foi capaz de provocar alterações motoras como diminuição da frequência de locomoção e levantar 1 dia após a infusão, mimetizando características motoras iniciais da DP. Além disso, foi capaz de promover diminuição nos níveis de DA em 3 e 7 dias após infusão. A infusão de 6-OHDA causou severo prejuízo motor com diminuição da frequência de locomoção e levantar, além do aumento da imobilidade nos dias 1 e 3 após cirurgia. Os níveis de DA estavam aumentados no primeiro dia e diminuídos no terceiro e sétimo dia após a cirurgia. Com relação a LPS não ocorreram alterações na atividade motora dos animais após a infusão ocorrendo apenas a diminuição da dopamina ao sétimo dia após cirurgia (Ariza, Lima *et al.*, 2010).

Apesar de o modelo animal satisfazer quesitos com relação à similaridade entre a DP em animais e no homem, ainda assim há que se confrontar as diferenças entre o curso da neurodegeneração em modelos animais versus DP em humanos.

Em modelos animais usando o método cirúrgico ou lesões induzidas por neurotoxinas, há uma rápida e frequentemente completa destruição da via nigroestriatal. Em humanos com DP, a perda de neurônios da substância negra é muito mais lenta. Além disso, o acúmulo de sinucleína e ubiquitina que se manifestam nos Corpos de Lewy em humanos DP é ausente na maioria dos modelos animais induzidos por neurotoxinas (Backman, Shan *et al.*, 2006). No entanto a utilização de algumas toxinas como a Rotenona e o Parquat já suprimem essa deficiência e seus modelos mostram inclusões de α -sinucleína que outros modelos não apresentam (Dauer e Przedborski, 2003).

1.6 – O PCR EM TEMPO REAL (RT-QPCR) E SUAS APLICAÇÕES NA QUANTIFICAÇÃO DE GENES

A detecção dos padrões de expressão gênica pode ajudar na elucidação do funcionamento de complexas redes regulatórias e provavelmente poderá levar a identificação de genes relevantes em novos processos biológicos ou no entendimento de doenças (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002).

PCR em tempo real acoplada à reação de transcrição reversa (RT-qPCR) distinguiu-se de outros métodos para avaliar a expressão de genes em termos de acurácia, sensibilidade e resultados rápidos (Derveaux, Vandesompele *et al.*, 2009). A principal vantagem do PCR quantitativo é a capacidade de medir o acúmulo do produto da PCR durante a fase log-linear da reação, combinando a amplificação, detecção e quantificação simultaneamente (Bustin, 2000). Apesar das grandes vantagens sobre outros métodos de quantificação, Derveaux, 2009 recomenda que haja um intenso controle de qualidade na preparação e análise dos resultados obtidos. Segundo esse mesmo autor há quatro passos necessários para a obtenção do sucesso na técnica de RT-qPCR: atenção quando desenhar o experimento, qualidade e controle das amostras e do ensaio e seleção apropriada de genes de referência.

Um importante passo para um RT-qPCR de sucesso é a validação do genes envolvidos. Essa etapa começa ao se desenhar os iniciadores que serão utilizados no experimento. Sabe-se que a presença de grampos (*hairpins*) nesses iniciadores possuem um impacto negativo na eficiência do PCR (Hoebeek, Van Der Luijt *et al.*, 2005). Os iniciadores precisam ser verificados através da produção do produto de amplificação usando gel de eletroforese e posteriormente analisando a curva de dissociação quando usar o SYBR Green I (Derveaux, Vandesompele *et al.*, 2009).

Um passo final na fase de preparação é a seleção apropriada de genes de referência para a normalização. O propósito dessa normalização é remover ao máximo as variações técnicas para que a mudança biológica observada possa ser a verdadeira. No 3º Simpósio de Londres de qPCR (abril 2005), normalização com três ou mais genes de referência foi considerada o mais apropriado e universal método (Derveaux, Vandesompele *et al.*, 2009). Genes de referência são selecionados através de sua representatividade em diferentes processos biológicos bem como

sua expressão abundante. O método padrão para escolha e normalização dos genes de referência, com mais de 2000 citações e que será utilizado nesse trabalho é o método descrito por Vandesompele et al. (2002), que utiliza o programa GeNorm. Os valores de expressão dos genes são importados para o programa GeNorm e ranqueados de acordo com a estabilidade de sua expressão. Em uma análise subsequente, o software é capaz de indicar quantos e quais genes de referência são requeridos para remover a maioria da variação técnica (isso depende da estabilidade da expressão dos genes testados e da heterogeneidade das amostras investigadas). Tipicamente, entre 3 e 5 genes são requeridos para uma normalização precisa (Derveaux, Vandesompele et al., 2009). O uso de múltiplos genes de referência resulta em dados mais acurados e em resultados estatisticamente mais significante e permite a quantificação confiável de diferenças pequenas de expressão (Vandesompele, De Preter et al., 2002).

A literatura mostra que a expressão de genes controles, embora ocasionalmente constantes em um tipo de célula ou condição experimental, pode variar consideravelmente (Vandesompele, De Preter et al., 2002) (Warrington, Nair et al., 2000) (Bustin, 2000). Vandesompele e colaboradores em 2002 propuseram a estratégia de identificar a expressão mais estável de uma série de genes controles em uma série de diferentes tecidos. Os autores avaliaram 10 diferentes genes controles que possuíam uma diferente abundancia e atividade em vários tecidos humanos e comprovaram que o uso de apenas um gene para normalização leva a grandes erros.

A técnica de RT-qPCR é bastante utilizada na literatura para quantificar a expressão de diferentes genes na Doença Parkinson, tantos em modelos animais, quanto em amostras provenientes de pacientes humanos.

Backman e colaboradores em 2006 investigaram a expressão de mRNA do gene *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), um potente fator trófico para neurônios dopaminérgicos. Os níveis de expressão de GDNF foram analisados usando a técnica de RT-qPCR em tecidos *post-mortem* de pacientes PD comparados com tecido de pacientes normais. Como controle interno foram utilizados dois genes: GAPDH e β -Actina. Foi encontrado um significativo aumento da expressão de mRNA de GDNF comparado com o controle (Backman, Shan et al., 2006).

A técnica de RT-qPCR também vem sendo utilizada em trabalhos recentes. Metalotioninas são proteínas metalo-ligantes presentes no sistema nervoso central, liberadas por astrócitos e associadas com neuroproteção. A investigação em 18 pacientes com DP e em 15 pacientes sem DP mostrou um aumento da expressão de metalotioninas em pacientes DP através da técnica de RT-qPCR (Michael, Esmailzadeh *et al.*, 2011).

Em um outro trabalho, os autores utilizaram a técnica de RT-qPCR para determinar os efeitos neuroprotetores de uma droga. Os autores induziram Parkinsonismo em ratos através do uso da substância 6-OHDA e após a lesão os animais foram tratados com Resveratrol. Testes comportamentais mostraram uma melhora de desempenho dos animais tratados com Resveratrol em relação aos animais controle. Além disso os autores mediram os níveis de mRNA de COX-2 e TNF- α na substância negra por RT-qPCR e ambos os níveis apresentaram um decréscimo após o tratamento com Resveratrol (Jin, Wu *et al.*, 2008).

Shehadeh e colaboradores em 2010 investigaram o gene SRRM2 e seus *splicing* alternativos através da técnica de RT-qPCR. Analisaram tecidos *postmortem* da SN e da amígdala e descobriram diferentes razões dos transcritos alternativos presentes em pacientes com DP. O transcrito menor estava presente em maior quantidade na SN enquanto que o transcrito maior estava presente em menor quantidade na SN e na amígdala (Shehadeh, Yu *et al.*, 2010).

Assim, a técnica de PCR em tempo real vem sendo bastante usada para a quantificação da expressão de vários genes relacionados à DP. Por termos disponível no nosso laboratório reagentes e o equipamento necessário para dar à cabo o desenvolvimento dessa tecnologia, decidimos padronizá-la para a quantificação da expressão de Ric-8B, Ric-8B Δ 9 e G α olf no estriado durante o desenvolvimento da DP induzida em ratos tratados com 6-OHDA.

2 - JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Mundial da Saúde, 1% a 3% da população acima dos 65 anos é acometida pela DP, sendo que a prevalência é de 150 a 200 casos a cada 100.000 habitantes. De acordo com a OMS, existem cerca de 4 milhões de pessoas no mundo convivendo com a DP. Com o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento da população, estima-se que esse número dobre até 2040. No Brasil, estima-se que a doença atinja 250 mil pacientes. Sendo assim, é de interesse, não somente da comunidade científica, mas de toda uma população que descobre anualmente ser portadora da DP, que cada vez mais pesquisas estejam relacionadas ao tema.

A DA é liberada por neurônios dopaminérgicos, presentes na SNpc, diretamente na região cerebral denominada de estriado. No estriado há neurônios que expressam receptores de DA, os quais são GPCRs associados à proteína Golf. A proteína Ric-8B está associada diretamente a subunidade alfa da proteína Golf e trabalhos anteriores indicam que Ric-8B amplifica o sinal dessa via (Chan, Gabay *et al.*, 2010). Se Ric-8B é capaz de aumentar o sinal da DA, ele poderia ser um alvo molecular para a modulação do sinal dopaminérgico, o qual apresenta-se defeituoso em indivíduos portadores de DP. Portanto, torna-se importante investigar uma possível relação entre a proteína Ric-8B e a DP. Assim, através de um modelo animal de DP, esse trabalho pretende iniciar o estudo dessa possível relação. Através da técnica de RT-qPCR, pretendeu-se avaliar como a modulação da expressão dos genes de Ric-8B (transcrito alternativo longo e curto) e de Golf comportam-se ao longo do decorrer da doença no modelo animal de 6-OHDA. O modelo de Parkinsonismo induzido por 6-OHDA foi introduzido a mais de 30 anos atrás e possui extensos trabalhos relatando os mecanismos da lesão por 6-OHDA. Além dos vários estudos que ajudam a correlacionar dados antigos com novos a toxina e a técnica cirúrgica já estavam sendo estudados em um laboratório parceiro. A técnica de RT-qPCR foi escolhida para esse trabalho por ser disponível no

laboratório em questão e pela falta de anticorpos anti-Ric-8B comercialmente disponíveis para a avaliação da proteína. Esse estudo poderá contribuir para um maior entendimento da DP para que futuramente terapias mais adequadas sejam planejadas para controlá-la. Ainda, é importante mencionar que a padronização da metodologia de RT-qPCR para quantificação desses genes em regiões do sistema nervoso central será importante para outros projetos desenvolvidos pelo grupo.

3 – OBJETIVOS

O trabalho em questão tem como objetivo principal padronizar a técnica de PCR quantitativo (RT-qPCR) para investigar a possível relação dos genes Ric-8B e G α olf com a DP em modelo animal de Parkinsonismo induzido por 6-OHDA. Assim, através da técnica de PCR quantitativo (RT-qPCR) pretende-se quantificar a expressão de Ric-8B e G α olf no estriado de ratos sem nenhum distúrbio neurodegenerativos e compará-los com o de animais tratados com a neurotoxina 6-OHDA que induz quadro semelhante ao Parkinson em modelos animais.

3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar o tratamento dos animais com a toxina 6-OHDA. Extrair o estriado dos animais após os tempos de: 4 horas, 24 horas, 3 dias e 7 e obter os cDNAs.;
- b) Padronizar a técnica de RT-qPCR;
- c) Através do *software* GeNorm determinar os genes de controle interno ideais;
- d) Quantificar os transcritos alternativos de Ric-8B, a que não contém o exon 9 (Ric-8B Δ 9) e outra que contém todos os dez exons (Ric-8B) e também o gene da proteína G α olf em RT-qPCR em animais sem nenhum distúrbio neurodegenerativo e no modelo de Parkinsonismo induzido por 6-OHDA nos tempos acima.
- e) Aplicar os testes estatísticos necessários para a compreensão dos resultados.

4 – METODOLOGIA

4.1 – EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Foram utilizados ratos adultos Wistar com peso aproximado de 280-320g. Todos os animais foram mantidos em condições semelhantes: gaiolas de polipropileno com substrato de maravalha, mantidos em temperatura controlada (22 ± 2 °C) com um período de 12h de luz com 12h de escuro. Os animais tiveram acesso livre a água e comida durante toda a experimentação animal. O protocolo está de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná e certificado sob o número: 515 (conforme folha em anexo)

4.1.1 – CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a administração da neurotoxina indutora de Parkinson foi utilizado protocolo semelhante ao descrito por Ariza 2010 (Ariza, Lima *et al.*, 2010). Os animais foram anestesiados (intraperitonealmente) com equitesin (0,3 ml/kg) e bilateralmente foi administrada, diretamente na SNpc 6-OHDA, (6µg em 2µl de fluido cerebrospinal artificial estéril) ou fluido cérebro-espinhal, suplementado com ácido ascórbico 0,2% (controle). A escolha dessas neurotoxinas foi feita com bases em estudos prévios que comprovaram a efetiva perda neuronal após a administração de 6-OHDA e subsequente geração de alterações comportamentais (Ariza, Lima *et al.*, 2010). A administração das drogas foi feita com uma agulha estéril (30 gauge), em um fluxo de 0,33µL/min, durante 3 minutos, de acordo com as coordenadas obtidas no atlas de Paxino e Watson (1986). Depois da cirurgia os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada até a recuperação da anestesia.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- 1) Controle: os ratos foram apenas manipulados pelos pesquisadores

- 2) *SHAM*: ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e receberam apenas veículo na SNpc.
- 3) 6-ODHA: ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e receberam 6-ODHA na SNpc.

Os grupos e animais obedeceram a seguinte ordem conforme a tabela abaixo:

TABELA 1 – GRUPOS DE ANIMAIS UTILIZADOS NA EXPERIMENTACAO

GRUPOS *TEMPOS	NÃO OPERADO	<i>SHAM</i>	6-OHDA	TOTAL
4 horas	3 animais	3 animais	6 animais	12
24 horas	3 animais	3 animais	6 animais	12
3 dias	3 animais	3 animais	6 animais	12
7 dias	3 animais	3 animais	6 animais	12
TOTAL	12	12	24	48

(*) Esses são tempos que foram considerados após a administração das drogas/veículo.

FONTE: O autor

Após o tempo de administração das drogas, os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação sob anestesia (148 mg/kg de Xilasina) e tiveram seus cérebros removidos. O estriado foi então isolado para a extração de RNA total.

4.2 – EXTRAÇÃO DE TECIDOS E RNA

Inicialmente foi isolado o estriado de encéfalos de ratos sem nenhum distúrbio neurodegenerativo em um número estatisticamente significativo. Posteriormente as cirurgias com a droga indutora de Parkinson, foi retirado o estriado dos animais em 4 horas, 24 horas, 3, e 7 dias após a cirurgia. O isolamento dos tecidos foi feito através de métodos tradicionais de micro dissecação. Todo tecido animal isolado foi pesado e homogeneizado. Após o isolamento do estriado, hipocampo e cerebelo foi realizada a extração de RNA total utilizando, inicialmente, o reagente de TRIZOL (Invitrogen) utilizando protocolo fornecido pela própria empresa e descrito inicialmente por (Chomczynski e Sacchi, 1987). Também foi utilizado para a extração

o kit denominado de INVITRAP Spin Tissue RNA Mini Kit utilizando o protocolo fornecido no manual pelo próprio fabricante.

4.3 – REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA

Para a síntese de cDNA foi utilizado protocolo semelhante ao descrito no trabalho de (Backman, Shan *et al.*, 2006). Em um tubo para PCR foi adicionado 1µl do iniciador Oligo dT (0,5 µg/µl) e 1 µg do RNA cerebral e água tratada com DEPC para um volume final de 5µl; a mistura será incubada a 70°C por 5 min. para desnaturação do RNA, em seguida foi colocada no gelo por 5 min. Paralelamente, uma segunda mistura foi preparada, composta por tampão ótimo para a enzima, 2,4µl de MgCl₂ (3 mM), 1µl dNTPs (0,5 mM: Promega®) e inibidor de RNase (2U/µl - RNaseOUT: Invitrogen®) e água tratada com DEPC para um volume final de. 15 µl. À primeira mistura foi incorporada a segunda mistura e a enzima transcriptase reversa Improm II Reverse transcriptase. A solução final foi incubada em um termociclador por: 25°C/ 5min; 42°C/ 60min; 70°C/ 5min. O cDNA resultante foi usado nas reações de qPCR (descrita adiante).

4.4 – PCR

Um mix foi preparado contendo água (10,3µl), tampão 10x (1x), dNTPs (0,2mM), iniciadores (1µM de *forward* e 1µM de *reverse*), MgCl₂ 25mM (1,5mM), cDNA (0,5µg/50µl) e enzima *Taq* DNA Polymerase (1,25u/50µl). Misturar todo esse mix e posteriormente centrifugar gentilmente para que todo o líquido fique no fundo do tubo.

Esse Mix foi colocado dentro de um termociclador (BioRad®) e as condições foram ajustadas da seguinte forma:

- 1) 95 °C, 2 minutos, uma vez;
- 2) 95 °C, 45 segundos, trinta e cinco vezes;
- 3) 56 °C, 45 segundos, trinta e cinco vezes;
- 4) 72 °C, 30 segundos, trinta e cinco vezes,
- 5) 72 °C, 5 minutos, uma vez;

6) 4°C indefinidamente.

O produto obtido foi analisado através de gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata.

4.5 – QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão dos genes de interesse Ric 8B transcrito longo, Ric 8B transcrito curto e G α olf, foi quantificada no tecido estriado, extraídos do encéfalo de ratos. A quantidade de mRNA de cada gene de interesse foi comparada em relação a expressão de genes constitutivos (controle interno). Nesse trabalho foram utilizados 5 controles internos para a normalização:

1. GAPDH, que codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma enzima da via glicolítica.
2. HMBS, que codifica a porfobilinogênio deaminase (hidroximetilbilano sintase), enzima da biossíntese do heme
3. HPRT, gene que codifica para a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase, que é uma enzima do metabolismo de purinas.
4. β 2M, gene que codifica para a beta-2-microglobulina, cadeia beta do complexo de histocompatibilidade principal.
5. ACTB, gene que codifica para a beta actina, que é uma proteína do citoesqueleto.

Os cDNAs, obtidos através dos tecidos foram diluídos para a concentração de 2,5 ng/ μ l e utilizados nas reações de RT-qPCR. Todos os experimentos foram realizados no equipamento Corbett Research® utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Quiagen, de acordo com as recomendações do fabricante e iniciadores específicos para os genes de interesse. As amostras foram corridas em triplicatas. As eficiências dos iniciadores foram determinadas de acordo com o método descrito por (Schmittgen e Livak, 2008) . A reação seguiu as curvas de temperatura padrão do equipamento, repetidos por 40 ciclos. A expressão dos genes foi apresentada como valores relativos à média geométrica entre as expressões dos cinco genes endógenos de expressão constitutiva e independente do tempo analisado: GAPDH, HMBS, HPRT, ACTB e β 2M, através do programa GeNorm v. 3.4, que utiliza o método descrito por Vandesompele *et al.* (2002)

4.6 - INICIADORES UTILIZADOS

Os iniciadores foram desenhados utilizando os programas Primer 3® v. 0.4.0 e IDT (Integrated DNA Technologies) oligo analyzer e foram avaliados quanto a especificidade utilizando o programa BLAST, comparando com o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Para que posteriormente o RT-qPCR fosse um sucesso, os iniciadores foram desenhados obedecendo a certos pré requisitos. Tais normas estão descritas no manual da Qiagen de 2004 denominado de Critical factors for Successful Real-Time PCR. Tais normas recomendam que o produto do iniciador deve ter menos de 150 pares de bases; evitar uma base T na ponta 3'; tamanho do iniciador entre 18 e 30 nucleotídeos; porcentagem das bases G e C deveria ficar em torno de 40% a 60%

A sequência dos iniciadores utilizados nos experimentos de RT-qPCR estão descritos na tabela 2.

TABELA 2 – SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE RT-qPCR

Gene	Concentração	Sequência	Tamanho do amplicon (bp)
Ric 8B transcrito longo	300 nM	FWD: 5` AGTGGATAGTCTGCTGAAGTA 3` RVS: 5` ATGACCAGTGATAAGATTAATGTTTG 3`	169 bp
Ric 8B transcrito curto	300 nM	FWD: 5` AGTGGATAGTCTGCTGAAGTA 3` RVS: 5` AGCAACTCCTCTTTTGGTTTTG 3`	159 bp
Gaolf transcrito longo	300 nM	FWD: 5` TAAGCCGGGGTATCGAC 3` RVS: 5` CTTCTTTTCCTCGGGGTTGA 3`	158 bp
Gaolf transcrito curto	300 nM	FWD: 5` ATCAGGGCGTGGATGAAA 3` RVS: 5` CTTCTTTTCCTCGGGGTTGA 3`	191 bp
Gaolf transcrito curto e longo	300 nM	FWD: 5` TGAGTACCATAATACCTCCAGTTC 3` RVS: 5` GAACTCCTGGGAATATTCAAAGTC 3`	110 bp
GAPDH	300 nM	FWD: 5` CATCTTCCAGGAGCGAGATC 3` RVS: 5` CAGTAGACTCCACGACATACTC 3`	74 bp
HMBS	300 nM	FWD: 5` TGAAGTGGACCTGGTTGTTC 3` RVS: 5` GTAAAGCCAGGAGGTAGTTAGG 3`	63 bp
β2M	300 nM	FWD: 5` CCATTCAGAAACTCCCCAAA 3` RVS: 5` GGTGGAAGTGGAGACACGTAG 3`	96 bp
HPRT	500 nM	FWD: 5` TCCACTTTTCGCTGATGACAC 3` RVS: 5` CAGGCCAGACTTTGTTGGAT 3`	102 bp
ACTB	300 nM	FWD: 5` GACCCAGATCATGTTTGAGAC 3` RVS: 5` GTACGACCAGAGGCATACAG 3`	87 bp

FONTE. O autor

4.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para a comparação da expressão de um determinado gene entre os diferentes tratamentos utilizou-se ANOVA bidirecional com pós teste Bonferroni. Foram consideradas significativas as diferenças com valor de p menor que 0,05.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 - INICIADORES E PCR

Dando início ao trabalho, desenhou-se iniciadores conforme recomendado no item 4.6 e em seqüência iniciou-se o tratamento com a toxina 6-OHDA conforme tabela 1.

Foram desenhados 18 iniciadores, obedecendo-se os critérios descritos na metodologia para desenhar os mesmos. HPRT não foi desenhado pelo autor desse trabalho, pois já havia sido utilizado por outro membro do laboratório em um outro estudo. A escolha dos iniciadores para os genes normalizadores foi baseada em trabalhos que realizaram estudos com a DP e RT-qPCR, conforme descrito na metodologia. A escolha foi também delimitada através do trabalho referência que estabeleceu uma robusta e inovadora estratégia para identificar a expressão mais estável de genes de controle em uma série de tecidos (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002).

Os resultados com os pares de iniciadores para Ric 8B longo e para Ric 8B curto se mostraram satisfatórios, conforme será observado abaixo.

G α olf também possui transcrito longo e curto e não se sabe ao certo se há diferenças na atividade biológica entre os dois transcritos. Mesmo assim optou-se por desenhar 3 pares de iniciadores: um par para o transcrito longo, um par para o transcrito curto e um par que amplifica os dois transcritos. Como será mostrado adiante, o iniciador que se mostrou mais satisfatório nos resultados foi o G α olf longo e curto.

Após a chegada dos iniciadores no laboratório, realizou-se uma PCR a fim de verificar se os mesmos estavam de acordo com planejado, ou seja, amplificando o gene de interesse. Primeiramente amplificou-se, por reação de PCR, o cDNA obtido através da extração do estriado de um dos animais controle. Para verificar a amplificação, submeteu-se o produto da reação de PCR, à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e posterior coloração com nitrato de prata 10%.

Como pode ser visto na figura 5, houve uma amplificação satisfatória de ambos os genes, evidenciando que os iniciadores possuem a especificidade desejada. No entanto apareceu uma banda na altura de 500 pares de bases que não foi identificada. Esse fragmento poderia ser uma preocupação nos ensaios posteriores de RT-qPCR, no entanto, como será evidenciado mais adiante não houve imprevistos com relação a essa amplificação inespecífica.

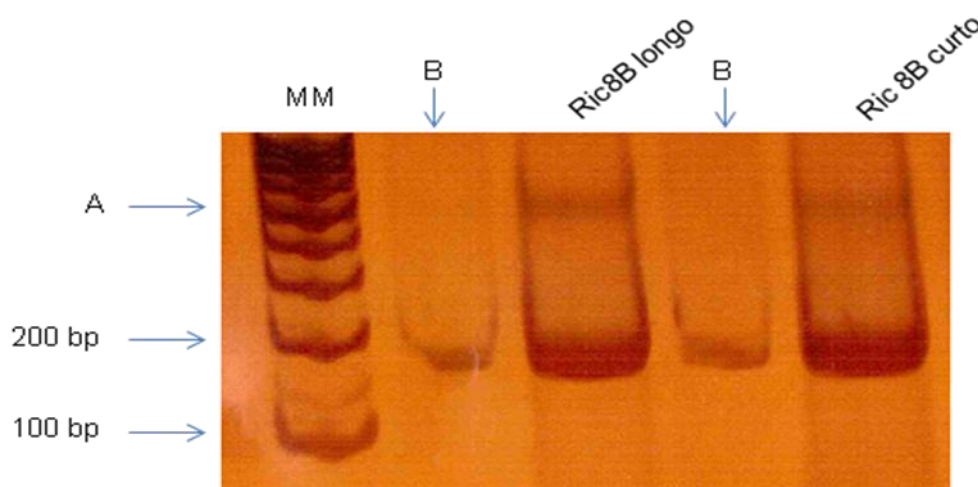


FIGURA 5: PCR PARA VERIFICAÇÃO DOS INICIADORES Ric 8B LONGO E Ric 8B CURTO

NOTA: Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata mostra o produto da PCR após amplificação com iniciadores específicos, utilizando como molde o cDNA de estriado de rato. Uma parte do gene para Ric 8B transcrito longo (Ric 8B longo) (169 pares de base) e para Ric 8B transcrito curto (Ric 8B curto) (159 pares de base) foram amplificadas por reação de PCR. Marcador de massa (MM) utilizado foi 100 bp da Fermentas®. O produto da PCR amplificado está na altura esperada, entre a marcação de 100 bp e 200 bp. Letra A indica uma marcação inespecífica na altura de 500 pares de bases. Letra B indica poços em que houve vazamento da amostra, não indicando nenhum resultado significativo.

A figura 6 mostra a amplificação bem sucedida dos fragmentos de DNA correspondentes à *Golf* curto e longo com os iniciadores desenhados. Fica evidente também uma marcação abaixo de 100 pares de bases que aparece também no controle negativo. Tal marcação é uma provável evidência de dímeros de iniciadores, já que ela também está presente no controle negativo.

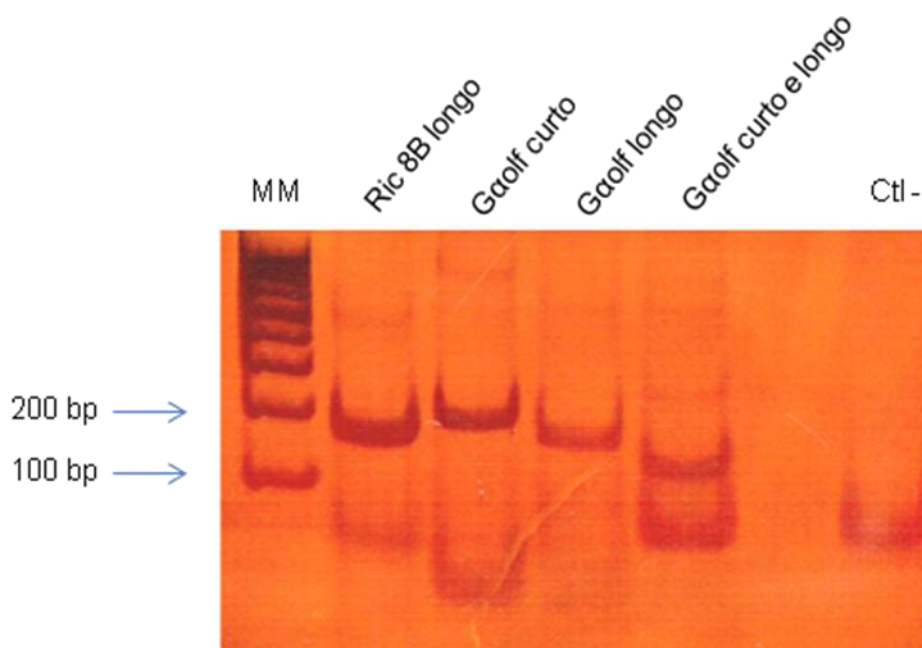


FIGURA 6 – PCR PARA VERIFICACAO DOS INICIADORES Gaolf CURTO, Gaolf LONGO E Gaolf CURTO E LONGO

NOTA: Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata mostra o produto da PCR após amplificação com iniciadores específicos, utilizando como molde o cDNA de estriado de rato. Uma parte do gene para Gaolf transcrito curto e (Gaolf curto) (191 pares de base), para Gaolf transcrito longo (Gaolf longo) (158 pares de base) e para Gaolf transcrito curto e longo (Gaolf curto e longo) (110 pares de base) foram amplificadas por reação de PCR. Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata 10% mostra o produto da PCR. Marcador de massa (MM) utilizado foi 100 bp da Fermentas®. Os produtos da PCR estão na altura esperada, entre a marcação de 100 bp e 200 bp. Ric 8B longo foi utilizada como controle positivo e para controle negativo foi utilizada uma amostra com os iniciadores para Gaolf curto e longo mas no lugar do cDNA foi utilizado água. Nota-se uma banda aparecendo abaixo da marcação de 100 bp e menos evidente que a marcação principal. É provável que essa banda seja dímero de iniciadores.

Na figura 7 são mostrados os genes que serão utilizados como normalizadores. Todos foram amplificados especificamente com os iniciadores utilizados: os produtos da PCRs geraram bandas únicas, nas alturas desejadas.

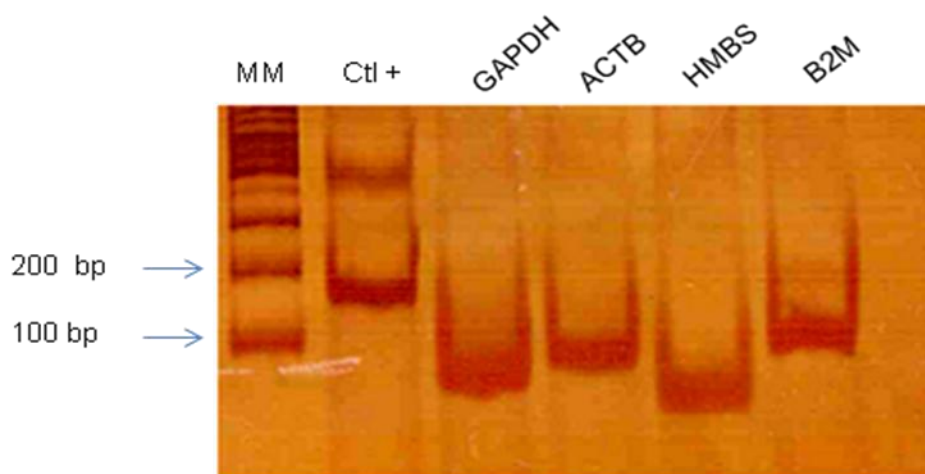


FIGURA 7: PCR PARA VERIFICACAO DOS INICIADORES GAPDH, ACTB, HMBS E β 2M

NOTA: Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata mostra o produto da PCR com iniciadores específicos, utilizando como molde o cDNA de estriado de rato. Uma parte do gene para GAPDH (74 pares de base), para ACTB (87 pares de base), para HMBS (63 pares de base) e para β 2M (B2M) (96 pares e base) foram amplificadas por reação de PCR. Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata 10% mostra o produto da PCR. Marcador de massa (MM) utilizado foi 100 bp da Fermentas®. O produto da PCR amplificado está na altura esperada, entre a marcação de 100 bp e 200 bp. Ric 8B longo foi utilizado como controle positivo.

A próxima etapa seria descobrir qual a concentração ideal de cada iniciador deveria ser utilizada durante os experimentos com RT-qPCR. Para tanto foi realizado um experimento de RT-qPCR em que uma quantidade pré definida de cDNA (10 ng/ μ l) do estriado foi utilizada com diferentes concentrações dos iniciadores: 100 nM, 200 nM, 300 nM e 400 nM. A reação usou o kit SYBR Green PCR Master Mix de acordo com as instruções do fabricante.

Após o preparo do experimento, usou-se o termociclador da Quiagen e posterior leitura em tempo real no software Rotor Gene 6000 Software. Após 40 ciclos o equipamento faz a leitura da curva de dissociação. Curva de dissociação é um gráfico do produto amplificado do RT-qPCR. As mudanças na fluorescência são plotadas com a temperatura. As mudanças na fluorescência, descritas no gráfico são devidas a interação do SYBR com o DNA dupla fita. Eleva-se gradativamente a temperatura do equipamento até aproximadamente 95°C. Quando o SYBR Green se liga a DNA dupla fita ele emite fluorescência. Sendo assim, há uma constate emissão de fluorescência até que em determinada temperatura inicia a separação das dupla fitas de DNA. A separação da dupla fita fará com que a emissão de fluorescência diminua gerando uma leitura no aparelho e um pico no gráfico. O que

se espera com isso é verificar que não somente houve a amplificação do produto desejado como também amplificou-se apenas o produto de interesse. Se há apenas um pico, há um único produto. Picos múltiplos indicam a presença de outros produtos além do gene de interesse. Amplificações não específicas indicam a presença de dímeros de iniciadores e podem afetar a qualidade dos dados. A figura 8 exemplifica um par de iniciadores com esse problema.

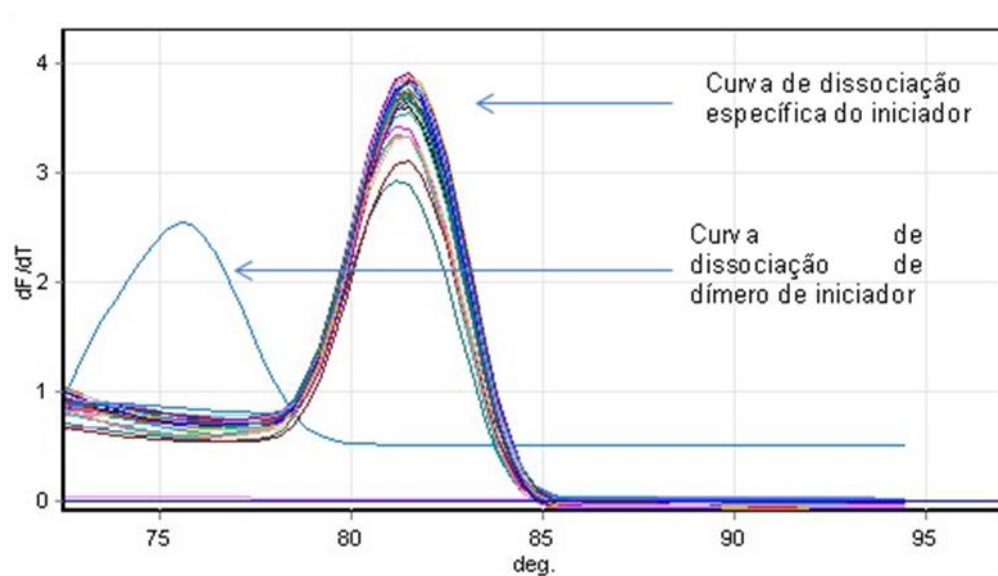


FIGURA 8: EXEMPLO DE CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE DÌMERO DE INICIADOR

FONTE: o Autor.

NOTA: Eixo x representa a temperatura em graus Celsius. Eixo y representa a derivada da fluorescência. Curva azul na linha de 75°C representa a curva de dissociação de dîmero de iniciador. Demais curvas, na linha aproximada de 82°C, representam as diversas concentrações de cDNA inicial variando de 0,1 ng/reação até 10 ng/reação. Representam também as curva de dissociação específica do iniciador de interesse testado.

A presença de vários picos na mesma curva de dissociação impossibilita a posterior quantificação precisa do gene de interesse. (protocolo da Applied Biosystems, 2006 e Manual do Operador do Rotor-Gene 6000 da Corbett Research, 2008)

O que se observa na figura 9 abaixo é o esperado para uma curva de dissociação com iniciadores capazes de amplificar especificamente uma única banda: apenas um pico na temperatura aproximada de 85 °C e nenhum pico na reação controle (branco, no qual não foi adicionado cDNA).

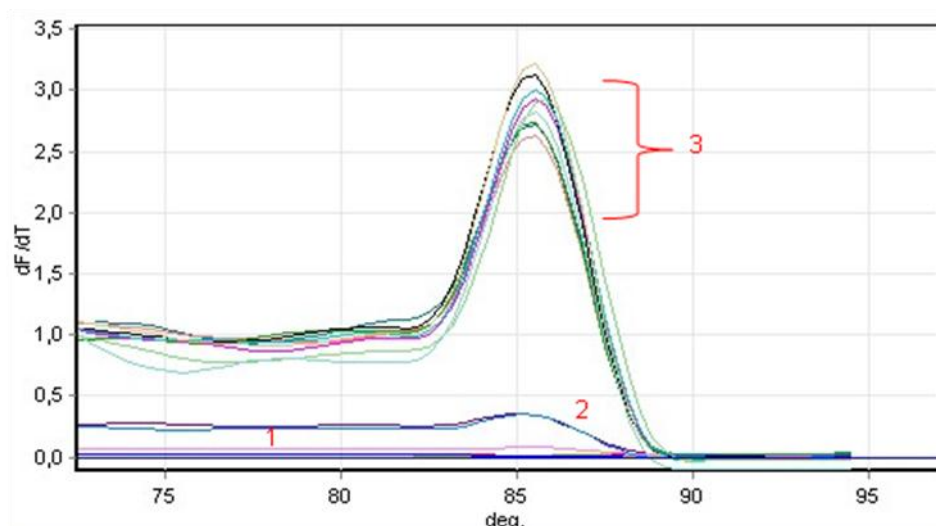


FIGURA 9: CURVA DE DISSOCIACAO PARA Ric 8B longo

NOTA: 10 ng de cDNA foram utilizados nessa reação de RT-qPCR. Número 1 indica o branco (não há cDNA); número 2 indica triplicata das curvas para 100 nM; número 3 indica as triplicatas das curvas para 200 nM, 300 nM e 400 nM dos iniciadores específicos.

Com base na curva de dissociação a concentração escolhida do iniciador Ric 8B longo foi de 300 nM. Foi a concentração que apresentou o maior potencial de amplificação do cDNA sem desperdiçar estoque do material.

A figura 10 mostra novamente que houve apenas a amplificação do gene para Ric 8B curto (apenas um pico). A concentração do iniciador escolhida foi de 300 nM.

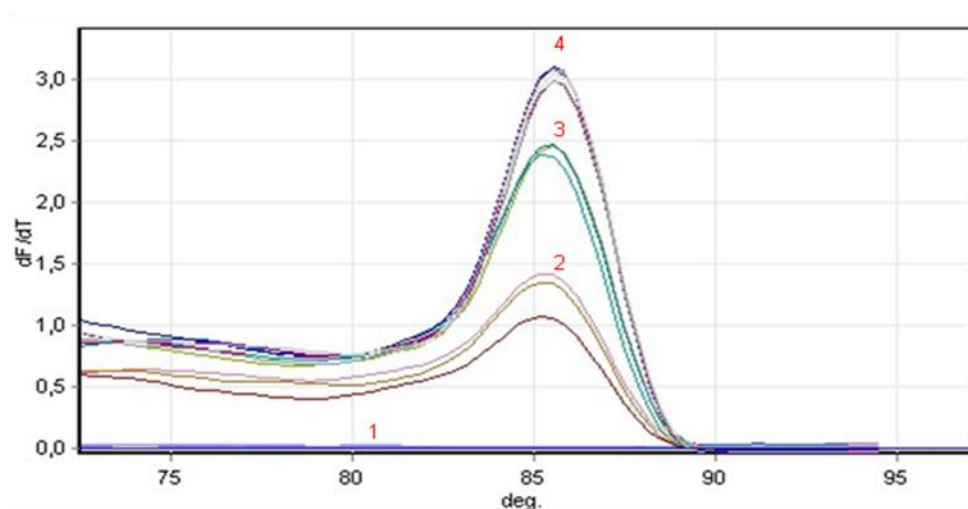


FIGURA 10: CURVA DE DISSOCIACAO PARA Ric 8B CURTO

NOTA: 10 ng de cDNA foram utilizados nessa reação de RT-qPCR. Número 1 indica o branco (não há cDNA); número 2 indica triplicata das curvas para 100 nM; número 3 indica as triplicatas da curva de 200 nM. Número 4 indica as triplicatas para as curvas de 300 nM e 400 nM.

O par de iniciadores para amplificar os transcritos de $\text{G}\alpha\text{olf}$ curto e longo foi escolhido para ser utilizado na quantificação do gene para $\text{G}\alpha\text{olf}$ porque apresentou a melhor curva de dissociação (figura 11) em relação aos iniciadores que amplificam só a forma $\text{G}\alpha\text{olf}$ curto (figura 12) ou só $\text{G}\alpha\text{olf}$ longo (figura 13).

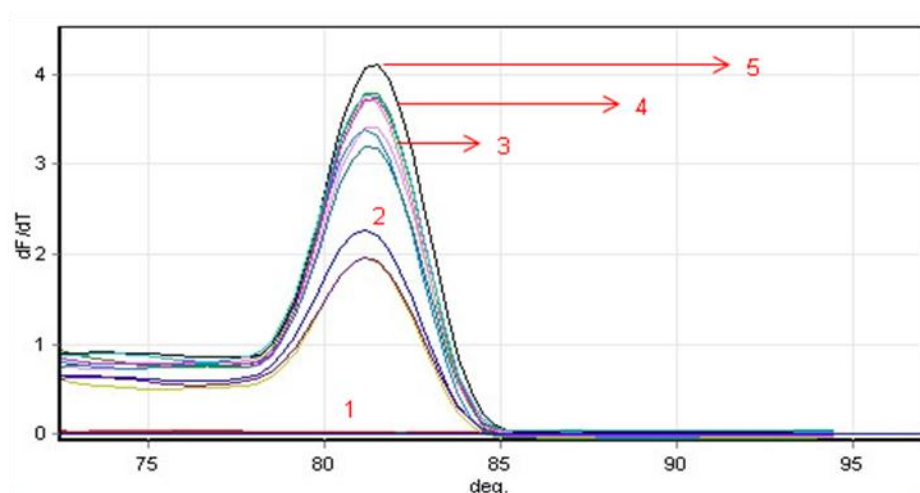


FIGURA 11: CURVA DE DISSOCIAÇÃO PARA $\text{G}\alpha\text{olf}$ CURTO E LONGO

NOTA: 10 ng de cDNA foram utilizados nessa reação de RT-qPCR. Número 1 indica o branco (não há cDNA); número 2 indica triplicata das curvas para 100 nM; número 3 indica as triplicatas da curva de 200 nM; número 4 indica as triplicatas para as curvas de 300 nM e número 5 indica as triplicatas para as curvas de 400 nM.

Embora o produto do PCR que foi mostrado na figura 6 tenha aparecido uma banda mais baixa indicando a existência de dímeros de iniciadores, a figura 11 mostra a existência de um único produto. Isso pode ser explicado pelas diferenças das condições de reação entre o RT-qPCR e o PCR da figura 6 evitando a formação de dímeros de iniciadores. A concentração escolhida foi também de 300 nM.

Embora a curva de dissociação para os iniciadores de $\text{G}\alpha\text{olf}$ curto tenha ficado como esperado (figura 12), optou-se por não usar esse par de iniciador na quantificação futura.

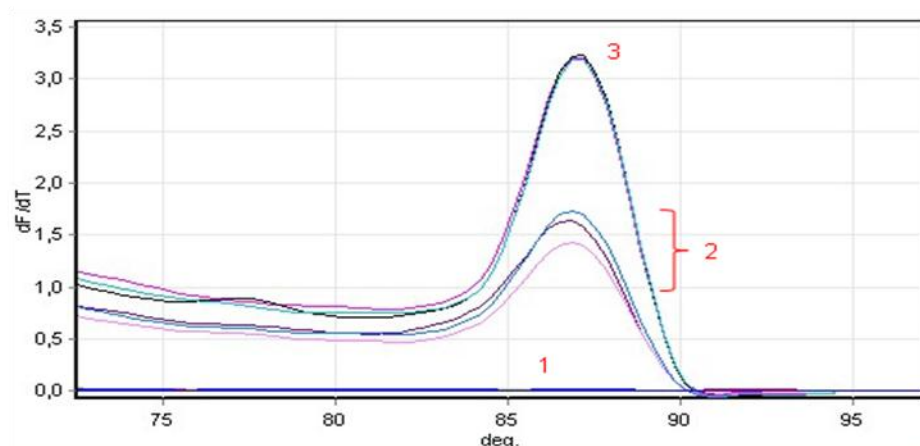


FIGURA 12: CURVA DE DISSOCIACAO PARA G α olf CURTO

NOTA: 10 ng de cDNA foram utilizados nessa reação de RT-qPCR. Número 1 indica o branco (não há cDNA); número 2 indica triplicata das curvas para 100 nM; número 3 indica as triplicatas das curvas para 200 nM, 300 nM e 400 nM.

Não se sabe ao certo se há diferenças entre os transcritos na atividade biológica de G α olf. A decisão de não usar esse iniciador foi estabelecida com base no próximo resultado também em que foi optado por não utilizar o iniciador para o transcrito longo de G α olf.

O resultado apresentado na figura 13 evidencia a presença de um segundo pico (número 4) o que indica que houve a formação de um produto além do gene G α olf longo. A presença de outro pico pode atrapalhar na quantificação futura do gene. Dessa forma optou-se por não utilizar esse iniciador nos experimentos futuros.

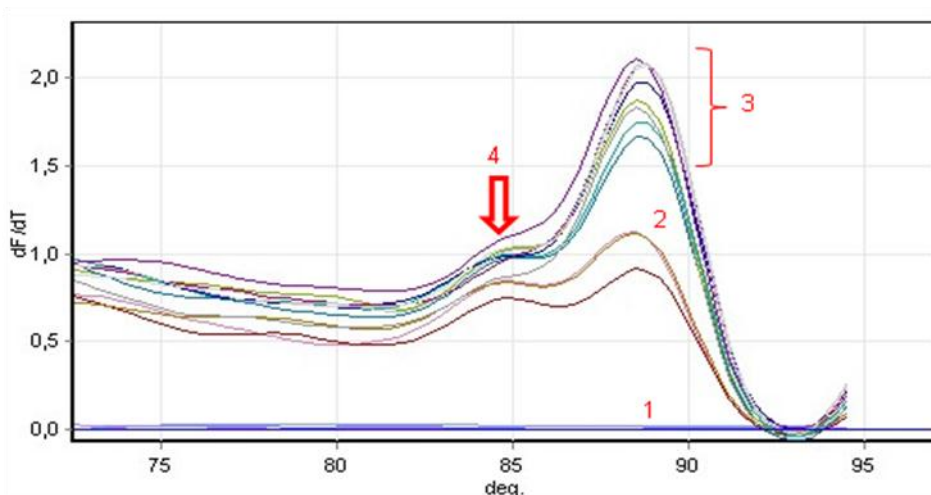


FIGURA 13: CURVA DE DISSOCIACAO PARA G α olf LONGO

NOTA: 10 ng de cDNA foram utilizados nessa reação de RT-qPCR. Número 1 indica o branco (não há cDNA); número 2 indica triplicata das curvas para 100 nM; número 3 indica as triplicatas das curvas para 200 nM, 300 nM e 400 nM. Número 4 indica a presença de outro pico mostrando que houve a formação de um segundo produto.

Utilizamos então, para a quantificação de GOLF apenas o iniciador que amplifica os dois transcritos do gene, resultado mostrado na figura 11.

Os genes normalizadores GAPDH, HPRT, HMBS, ACTB e B2M passaram pelo mesmo processo de padronização e todos os pares de iniciadores foram validados para serem utilizados com confiança na técnica de RT-qPCR (resultados não mostrados).

5.2 - NORMALIZAÇÃO UTILIZANDO MÚLTIPLOS GENES DE CONTROLE INTERNO

Após a determinação da concentração ideal dos iniciadores, deve-se estipular qual será o melhor gene de controle interno. Para tanto foi utilizado o método descrito por Vandesompele e colaboradores, 2002, que faz uso do programa GeNorm v. 3.4.

O *software* GeNorm v. 3.4 é um aplicativo para o *software* MicrosoftExcel que determina o gene mais estável de controle interno em uma série de genes testados, em uma determinada amostra de cDNA. Este programa calcula um fator de normalização de expressão do gene para cada amostra de tecido baseado em uma média geométrica dos genes de controle internos definidos pelo usuário (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002).

GeNorm calcula a estabilidade da expressão do gene (denominado de M) O M é calculado como a média da variação entre um gene particular e os outros genes controles analisados. O programa permite eliminar o pior score do gene de controle interno (que é aquele com o valor de M mais alto) e recalcular um novo valor de M com os genes restantes (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002).

Para colocar os dados no programa utilizamos os valores do ciclo limiar (Ct) obtidos nas corridas de RT-qPCR realizadas posteriormente. O Valor de Ct, do inglês *threshold cycle*, é definido durante o ciclo da PCR em que uma linha arbitrária cruza um limiar de amplificação marcado pelo sinal de fluorescência. Os valores de Ct asseguram que o PCR está em uma fase exponencial de amplificação. O valor numérico do Ct é inversamente relacionado a quantidade do amplicon na reação.

Quanto menor o valor do Ct, maior a quantidade de amplicon (Schmittgen e Livak, 2008) (figura 14).

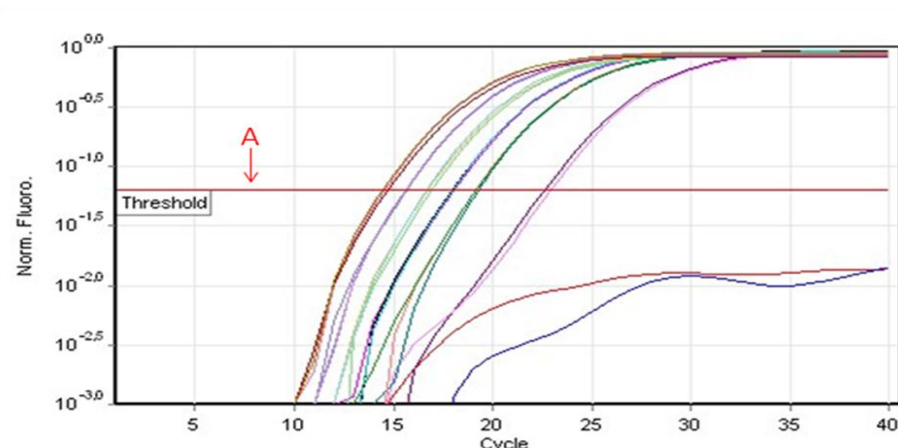


FIGURA 14: CORRIDA DE RT-qPCR PADRÃO

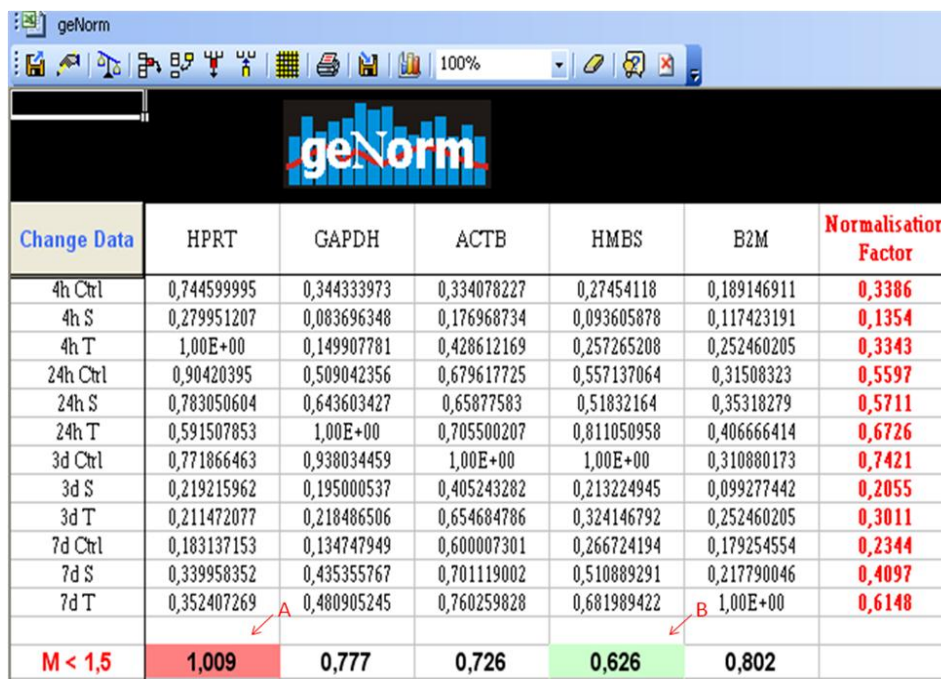
FONTE: O autor.

NOTA: 10 ng de cDNA foram utilizados nessa reação de RT-qPCR. Letra A indica a linha de *threshold* (limiar). Linhas coloridas indicam as curvas da corrida. Eixo x indica os ciclos da corrida. Eixo y indica escala da fluorescência.

Fonte: O autor

Para delimitar o valor do Ct o *software* Rotor-Gene traça automaticamente a linha de *threshold*. O valor do Ct será o ciclo (eixo x, conforme figura 14) por onde a linha de *threshold* cruza a amplificação de determinada amostra.

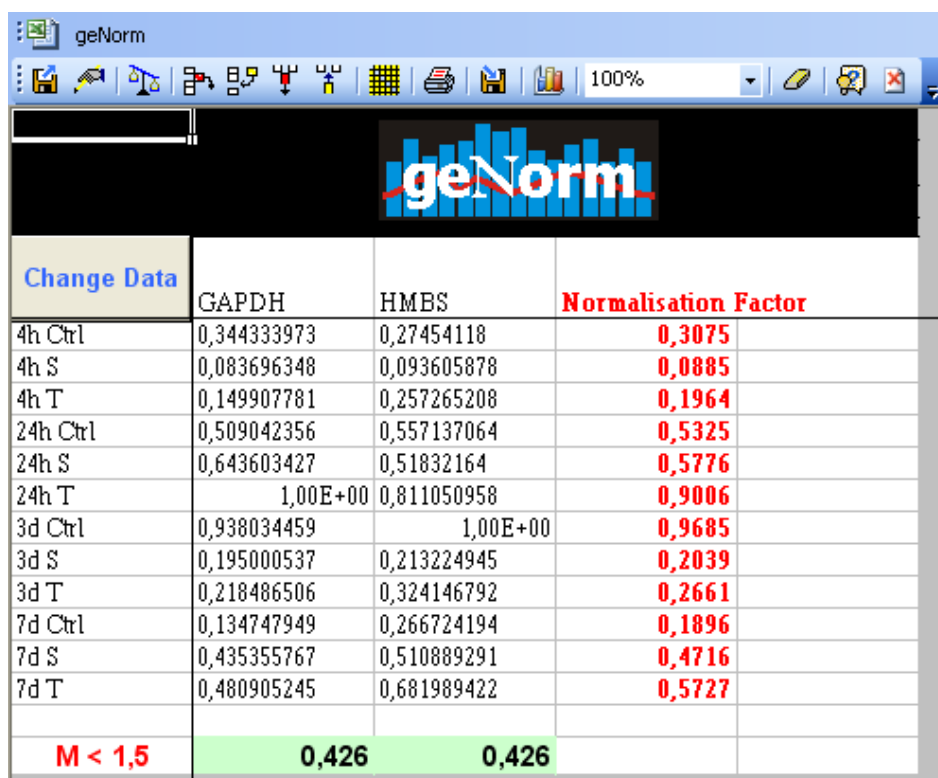
Inicialmente testamos no *software* todos os 5 genes endógenos (GAPDH, HPRT, HMBS, ACTB e β 2M) em todos os tratamentos e condições utilizadas nesse experimento. Após plotar todos os dados no programa GeNorm, calculou-se o valor de M e o programa apontou qual o gene mais instável, ou seja, que possui o M mais alto (marcado em vermelho) e o mais estável, com o M mais baixo (marcado em verde) (Figura 15).



Change Data	HPRT	GAPDH	ACTB	HMBS	B2M	Normalisation Factor
4h Ctrl	0,744599995	0,344333973	0,334078227	0,27454118	0,189146911	0,3386
4h S	0,279951207	0,083696348	0,176968734	0,093605878	0,117423191	0,1354
4h T	1,00E+00	0,149907781	0,428612169	0,257265208	0,252460205	0,3343
24h Ctrl	0,90420395	0,509042356	0,679617725	0,557137064	0,31508323	0,5597
24h S	0,783050604	0,643603427	0,65877583	0,51832164	0,35318279	0,5711
24h T	0,591507853	1,00E+00	0,705500207	0,811050958	0,406666414	0,6726
3d Ctrl	0,771866463	0,938034459	1,00E+00	1,00E+00	0,310880173	0,7421
3d S	0,219215962	0,195000537	0,405243282	0,213224945	0,099277442	0,2055
3d T	0,211472077	0,218486506	0,654684786	0,324146792	0,252460205	0,3011
7d Ctrl	0,183137153	0,134747949	0,600007301	0,266724194	0,179254554	0,2344
7d S	0,339958352	0,435355767	0,701119002	0,510889291	0,217790046	0,4097
7d T	0,352407269	0,480905245	0,760259828	0,681989422	1,00E+00	0,6148
M < 1,5	1,009	0,777	0,726	0,626	0,802	

FIGURA 15: INÍCIO DA DETERMINAÇÃO DO GENE DE CONTROLE INTERNO MAIS ESTÁVEL
NOTA: Todos os genes utilizados como controle interno (HPRT, GAPDH, ACTB, HMBS e B2M) foram plotados no programa GeNorm. Letra A indica o valor de M mais alto. Letra B indica o valor de M mais baixo.

O programa sugeriu, a cada etapa, então excluir os genes HPRT, ACTB e B2M por apresentarem o escore mais baixo de M. Assim, através do uso desse *software* determinou-se que para condições experimentais desse trabalho os melhores genes controles seriam GAPDH e HMBS pois foram os genes com o menor valor de M (figura 16). De fato, já foi demonstrado que os genes restantes (GAPDH e HMBS) apresentam maior estabilidade (no tecido estudado) do que os genes excluídos (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002).



Change Data	GAPDH	HMBS	Normalisation Factor
4h Ctrl	0,344333973	0,27454118	0,3075
4h S	0,083696348	0,093605878	0,0885
4h T	0,149907781	0,257265208	0,1964
24h Ctrl	0,509042356	0,557137064	0,5325
24h S	0,643603427	0,51832164	0,5776
24h T	1,00E+00	0,811050958	0,9006
3d Ctrl	0,938034459	1,00E+00	0,9685
3d S	0,195000537	0,213224945	0,2039
3d T	0,218486506	0,324146792	0,2661
7d Ctrl	0,134747949	0,266724194	0,1896
7d S	0,435355767	0,510889291	0,4716
7d T	0,480905245	0,681989422	0,5727
M < 1,5	0,426	0,426	

FIGURA 16: FIM DA DETERMINAÇÃO DOS GENES DE CONTROLE INTERNO MAIS ESTÁVEIS
NOTA: Após sucessivos cálculos os genes GAPDH e HMBS foram os que apresentaram o menor valor de M, mostrado em verde.

O programa também fornece um número chamado de Fator de Normalização (*Normalisation Factor*) que posteriormente será utilizado para quantificar a expressão dos genes de interesse (figura 16).

5.3 – QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS GAOLF, RIC 8B LONGA E RIC 8B CURTA

Os níveis de expressão dos transcritos Gaolf, Ric 8B longa e Ric 8B curta foram avaliados através de RT-qPCR (conforme descrito no item 6.5 da seção “Metodologia”). A expressão dos genes foi apresentada como valores relativos a média geométrica entre as expressões de dois genes endógenos de expressão constitutiva e independente da progressão da doença: GAPDH e HMBS. Os resultados obtidos estão relacionados nas figuras abaixo.

O número de animais utilizados em cada tratamento foi o seguinte: CONTROLE n = 2; SHAM n = 3, TRATADO n = 3.

É possível observar na análise gráfica da figura 17 que, apesar de não haver diferença estatística, há uma tendência de maior expressão de *Gαolf* no tempo de 3 dias tanto no grupo *sham*, como no grupo tratado com a toxina.

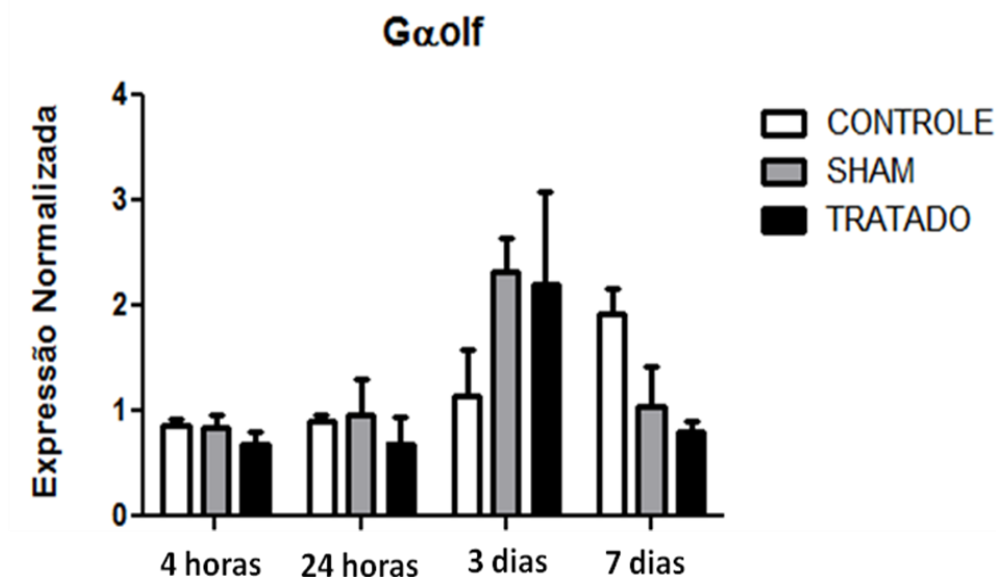


FIGURA 17: NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE *Gαolf* EM DIFERENTES TEMPOS DE TRATAMENTO

NOTA: A quantificação do cDNA de *Gαolf* no estriado nos diferentes tempos foi feita por RT-qPCR, e os resultados são apresentados como a expressão relativa do transcrito, normalizada como descrito no item 6.5 da seção "Metodologia". As barras indicam a média e o desvio padrão resultantes de experimentos independentes, realizados em duplicatas. Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$, teste de Bonferroni) relevantes.

Para Ric-8B longa (figura 18) e Ric-8B curta (figura 19) esse padrão (tendência de maior expressão dos transcritos em 3 dias nos grupos *sham* e tratado) também se repete.

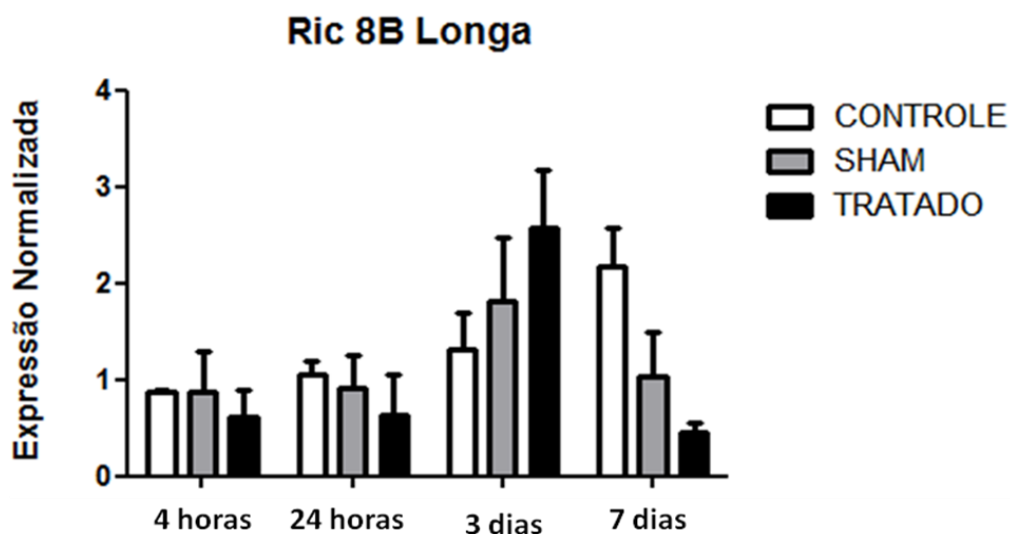


FIGURA 18: NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE Ric 8B TRANSCRITO LONGO EM DIFERENTES TEMPOS DE TRATAMENTO

NOTA: A quantificação do cDNA de Ric-8B longa no estriado nos diferentes tempos foi feita por RT-qPCR, e os resultados são apresentados como a expressão relativa do transcrito, normalizada como descrito no item 6.5 da seção “Metodologia”. As barras indicam a média e o desvio padrão resultantes de experimentos independentes, realizados em duplicatas. Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$, teste de Bonferroni) relevantes.

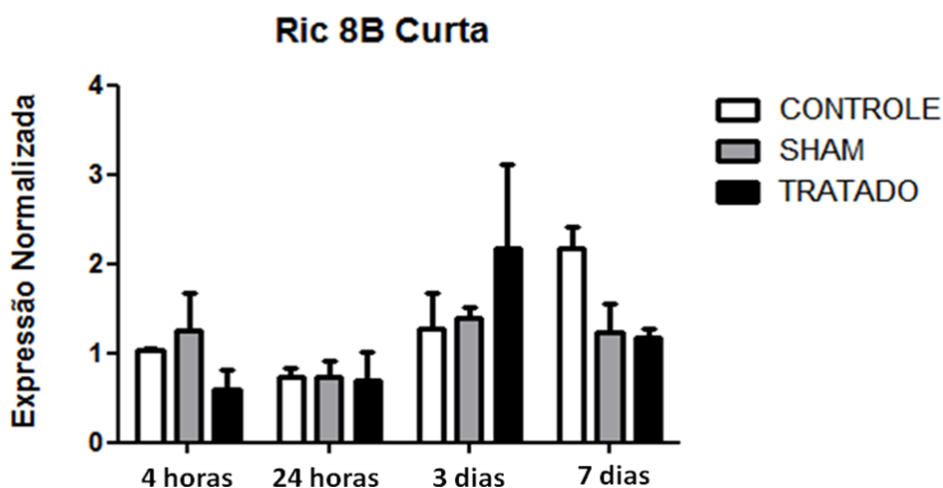


FIGURA 19: NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE Ric 8B TRANSCRITO CURTO EM DIFERENTES TEMPOS DO TRATAMENTO

NOTA: A quantificação do cDNA de Ric-8B curta no estriado nos diferentes tempos foi feita por RT-qPCR, e os resultados são apresentados como a expressão relativa do transcrito, normalizada como descrito no item 6.5 da seção “Metodologia”. As barras indicam a média e o desvio padrão resultantes de experimentos independentes, realizados em duplicatas. Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$, teste de Bonferroni) relevantes.

Esse resultados parecem estar de acordo com trabalhos envolvendo testes comportamentais em ratos tratados com 6-OHDA, de frequência de locomoção e tempo de imobilidade em que no tempo de 3 dias há uma diminuição considerável na locomoção e um aumento no tempo de imobilidade (Ariza, Lima *et al.*, 2010). No entanto, o mesmo trabalho afirma que no tempo de 24 horas também há uma considerável diminuição na locomoção bem como um aumento no tempo de imobilidade, o que difere dos dados desse presente trabalho.

Ariza e colaboradores, 2010, demonstraram que há variações nos níveis de dopamina nos diferentes tempos de tratamentos. Em 3 dias há uma queda significativa na concentração de dopamina em relação aos controles. Nossos resultados mostram que, no tempo de 3 dias, há um aumento no nível de expressão dos genes que estão associados ao receptor de dopamina. Esse aumento poderia indicar que há uma super expressão dos genes das proteínas reguladoras da dopamina que tentariam compensar a eventual falta de dopamina. Para poder afirmar com mais clareza o que esses resultados podem significar é necessário aumentar o número de experimentos. Só assim poderemos relacionar os dados moleculares com os dados comportamentais. Além disso, como será discutido mais adiante (“Discussão Final”, item 6), não era esperado que as quantidades de expressão dos transcritos em questão nos animais *sham* variassem da mesma forma que nos animais tratados.

Com o objetivo de verificar se o padrão de expressão observado para os transcritos de *Golf*, *Ric 8B longa* e *Ric 8B curta* era específico ou não para genes relacionados à via de ativação de *Golf*, quantificou-se transcritos não relacionados a essa via através da mesma metodologia. Para tanto foram aproveitados dados prévios usados para a determinação dos normalizadores. Assim, os genes *HPRT*, β 2M e *ACTB* foram usados como genes não relacionados e quantificados. Os resultados serão mostrados nas figuras abaixo:

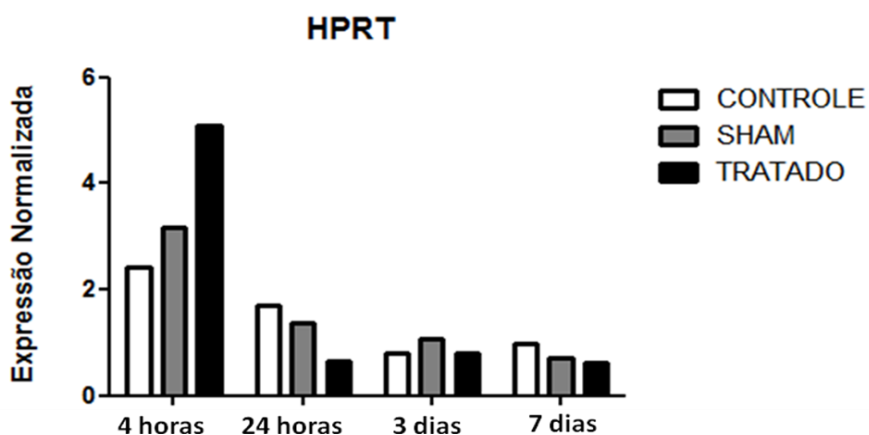


FIGURA 20: NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE HPRT EM DIFERENTES TEMPOS DE TRATAMENTO

NOTA: A quantificação do cDNA de HPRT no estriado nos diferentes tempos foi feita por RT-qPCR, e os resultados são apresentados como a expressão relativa do transcrito, normalizada como descrito no item 6.5 da seção “Metodologia”.

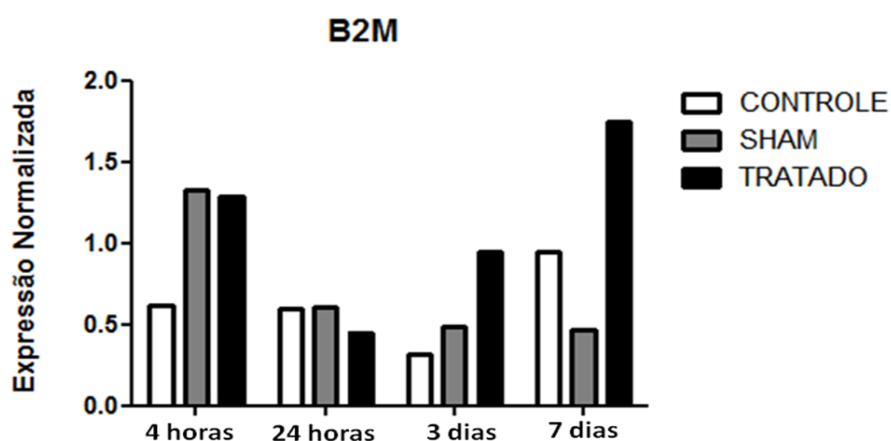


FIGURA 21: NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE β 2M EM DIFERENTES TEMPOS DO TRATAMENTO

NOTA: A quantificação do cDNA de B2M no estriado nos diferentes tempos foi feita por RT-qPCR, e os resultados são apresentados como a expressão relativa do transcrito, normalizada como descrito no item 6.5 da seção “Metodologia”.

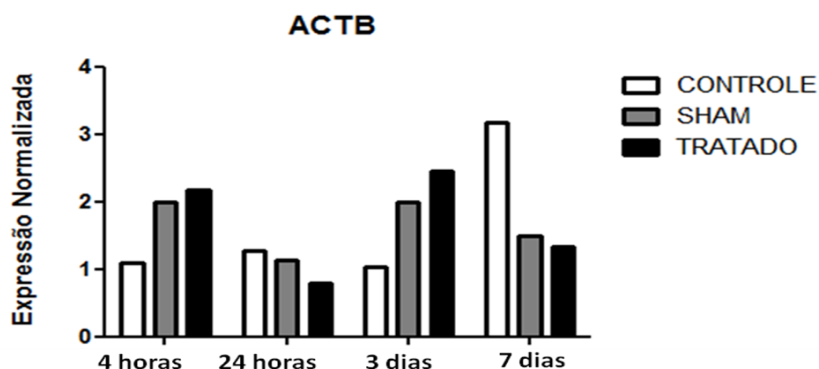


FIGURA 22: NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE ACTB EM DIFERENTES TEMPOS DO TRATAMENTO

NOTA: A quantificação do cDNA de ACTB no estriado nos diferentes tempos foi feita por RT-qPCR, e os resultados são apresentados como a expressão relativa do transcrito, normalizada como descrito no item 6.5 da seção “Metodologia”.

Embora o gene ACTB tenha tido um desempenho gráfico semelhante aos genes Ric-8B e G α olf (figura 22), HPRT e B2M mostraram uma expressão diferente dos genes de interesse (figuras 20 e 21, respectivamente). O objetivo aqui foi descobrir se o padrão observado na Ric-8B e G α olf repetia-se em outros genes não relacionados ao modelo de DP. Aparentemente Ric-8B e G α olf tem um comportamento de expressão particular, embora ainda não totalmente claro se independente de outros genes.

6 - DISCUSSAO FINAL

RT-qPCR distingui-se de outros métodos para a avaliação da expressão de genes em termos de precisão, sensibilidade e rápidos resultados. É por causa disso, que essa tecnologia tem se estabelecido como um padrão ouro para analisar a expressão de genes (Derveaux, Vandesompele *et al.*, 2009).

Por ser uma tecnologia disponível no laboratório, a escolha da técnica de RT-qPCR foi lógica para o objetivo inicial: medir a expressão gênica de Ric-8B (transcritos longo e curto) e Gαolf em Parkinsonismo induzido pela toxina 6-OHDA.

Trabalhos anteriores mostraram a presença de Ric-8B e Gαolf no estriado, região afetada na DP (Von Dannecker, Mercadante *et al.*, 2005). Portanto seria interessante observar o comportamento desses genes ao longo do desenvolvimento da DP.

A escolha do modelo animal de Parkinsonismo induzido por 6-OHDA, para estudar a variação das formas de Ric-8B, foi baseada em trabalhos que demonstram a eficiência do método no estudo da doença. Esse foi o primeiro modelo animal de DP que demonstrou a morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc há mais de 30 anos atrás (Ungerstedt, 1968).

Embora a tecnologia de RT-qPCR estivesse disponível no laboratório, havia a necessidade de padronização do método para estudar os genes de Ric-8B e Gαolf no modelo animal de Parkinsonismo. O primeiro passo foi coletar informações referentes a esses dois genes no BLAST e posteriormente desenhar iniciadores específicos para a reação de PCR. Os oligonucleotídeos desenhados seguiram as recomendações descritas na seção 4.5 da Metodologia e conforme os resultados das figuras 5, 6 e 7 os iniciadores para todos os genes utilizados nesse trabalho mostraram-se eficientes na amplificação específica dos fragmentos de interesse..

O *software* GeNorm foi usado para determinar quais seriam os melhores genes para serem utilizados como controles internos (normalizadores). Para tanto iniciadores foram desenhados para 5 genes de controle internos descritos no trabalho de Vandesompele em 2002 (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002). Embora a literatura mostre que ocasionalmente genes de controle interno tenham uma expressão constante em um dado tipo de célula ou experimento, é certo que eles podem variar consideravelmente (Warrington, Nair *et al.*, 2000). Para este

trabalho foram selecionados os genes HPRT, GAPDH, HMBS, ACTB e β 2M. A normalização com 3 ou mais genes de referência é considerado o mais apropriado e aplicado método (Derveaux, Vandesompele *et al.*, 2009). Após os cálculos realizados pelo *software* GeNorm determinou-se que os melhores genes para normalização das quantificações nos os experimentos descritos nesse trabalho foram GAPDH e HMBS (figura 16).

Embora trabalhoso e quase sempre tedioso o processo de padronização da técnica de RT-qPCR é de fundamental importância para a continuidade da experimentação. Além de selecionar os genes de referência em experimentos pilotos com amostras representativas, é importante avaliar a estabilidade da expressão em um experimento final. O *software* GeNorm calcula automaticamente a estabilidade da expressão se mais de um gene é utilizado para fazer a normalização. Essa abordagem fornece a qualidade e controles necessários para a normalização do gene de referência em cada experimento (Derveaux, Vandesompele *et al.*, 2009).

Após a determinação dos melhores genes de referência a padronização da técnica estava completa. O próximo passo foi testar na prática a padronização, ou seja, avaliar a expressão dos genes Ric-8B e G α olf no modelo animal de Parkinson induzido pela toxina 6-OHDA e em animais sem o distúrbio neurodegenerativo.

Embora a padronização da técnica tenha se mostrado satisfatória, os resultados observados com relação aos genes Ric-8B e G α olf ainda são muito preliminares. Conforme os resultados mostrados nas figuras 17, 18 e 19, parece haver uma tendência a um padrão de expressão comum para os genes Ric-8B (transcrito longo e transcrito curto) e G α olf ao longo do tempo. Todos parecem ter expressão aumentada no tempo de 3 dias após a cirurgia, o que está em parte de acordo com os dados comportamentais apresentados por Ariza 2010., Nesse estudo, as manifestações comportamentais dos ratos tratados com 6-OHDA iniciam-se no terceiro dia após a administração da toxina, embora haja também alterações comportamentais no tempo de 24 horas. Em nossos experimentos não observamos nenhuma alteração na expressão dos genes no tempo de 24 horas. Analisando o tempo de 7 dias observa-se que ele segue, mais ou menos, o mesmo comportamento do tempo de 4 horas e de 24 horas. Ainda no trabalho de Ariza e colaboradores (2010), os níveis de dopamina no estriado caem de maneira significativa após 3 dias de tratamento. Assim, com os nossos dados preliminares, é

possível sugerir que o aumento da expressão de Ric-8B e de G α olf observada funcionaria como um mecanismo que compensa a morte neuronal e a falta de DA no estriado.

É interessante lembrar que a técnica de RT-qPCR está analisando a expressão de mRNA e que não é possível afirmar com certeza que todo esse mRNA será traduzido em proteína e em atividade protéica. Portanto pode haver uma certa discrepância entre os dados moleculares e os dados comportamentais. Além disso, certos mecanismos moleculares da DP permanecem desconhecidos e as alterações comportamentais no tempo de 24 horas observadas no trabalho de Ariza 2010, mas não no nosso pode ser explicada por outras vias moleculares que não a de Ric-8B e G α olf.

Observa-se nos gráficos 17, 18 e 19 que não houve diferenças significativas entre os tempos e tratamentos realizados quando aplicados os testes estatísticos. Entretanto, como já mencionado, é possível observar que no tempo de 3 dias há um claro aumento da expressão gênica em relação aos outros tempos. No entanto essa afirmação ainda não é certa porque o desvio padrão é alto, muito provavelmente porque o número de animais (n) ainda é baixo para o modelo de experimento. Vale ressaltar que quando os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism, embora não tenham apresentado nenhuma diferença significativa entre o tempo e tratamento, o programa afirmou em seus dados narrativos que o fator TEMPO é importante e afeta os resultados. Portanto o efeito do TEMPO foi considerado significativo, ou seja, $p < 0,05$. Esse não foi um resultado que surpreendeu, pois sabe-se que o tempo que a toxina 6-OHDA encontra-se em contato com a SNpc é determinante na morte dos neurônios (Ariza, Lima *et al.*, 2010), (Przedborski, 2005), (Jeon, Jackson-Lewis *et al.*, 1995). Esperava-se que o fator TRATAMENTO também fosse considerado significativo, mas o programa afirmou que não é.

Outro dado intrigante é a variação dos animais *SHAM* quase similar a variação nos animais TRATADO. *SHAM* serve como controle e sua variação da expressão gênica deveria ser mínima, no entanto *SHAM* também está aumentado no tempo de três dias. Embora haja uma lesão mecânica devido a introdução da seringa na substância negra, o dano não é maior do que quando injetado a toxina, portanto *SHAM* não deveria variar tanto. De fato, no trabalho de Ariza e colaboradores, por exemplo, o grupo *SHAM* comportou-se da mesma forma que o

grupo controle, tanto para os parâmetros comportamentais analisados, quanto para a variação dos níveis de dopamina (Ariza, Lima *et al.*, 2010). Acredita-se a variabilidade dos animais utilizados nos experimentos foi responsável pela produção de alguns dados aberrantes. É provável que com o aumento do número de animais (aumento do “n”) os dados sejam normalizados. Quando observamos as figuras 17, 18 e 19 vemos que no tempo de 7 dias o grupo CONTROLE apresenta expressão dos transcritos de interesse aumentada. No entanto esses animais são apenas manipulados e que não recebem nenhum tipo de cirurgia. É um dado aberrante, talvez devido a algum erro de pipetagem ou alguma deficiência no planejamento e manipulação dos animais. É importante mencionar que muitos dos animais TRATADOS permaneceram na mesma caixa que os animais CONTROLE e SHAM. Talvez, de alguma forma, houve alguma influência comportamental que induziu um comportamento aberrante da expressão gênica.

Pelo fato dos genes de interesse (figuras 17,18 e 19) apresentarem um padrão semelhante de expressão nas condições analisadas, suspeitou-se que esse poderia ser um padrão inerente de todos os genes presentes nas células do estriado após a cirurgia e/ou tratamento com a 6-OHDA. Para testar essa hipótese, aproveitou-se alguns dados utilizados de genes controles testados durante a normalização. Embora o gene ACTB (figura 22) tenha apresentado um padrão semelhante ao observado em Ric-8B e G α olf, os demais genes, HPRT e β 2M (figuras 20 e 21), tiveram um comportamento bem diferente dos genes de interesse. Para esses últimos resultados, somente o cDNA de um único animal foi avaliado na quantificação dos genes controles, dado que impossibilita uma análise mais conclusiva, já que não há tratamento estatístico. Entretanto, é possível sugerir que o padrão das alterações na expressão de Ric-8B (dos dois transcritos) e G α olf deve-se ao tratamento e/ou cirurgia dos animais. De alguma forma a manipulação dos neurônios dopaminérgicos da SNpc com a cirurgia (procedimento comum nos grupos *sham* e controle) pode ter alterado a via da sinalização dos receptores D1 nos neurônios do estriado, modificando especificamente a expressão dos genes envolvidos nessa sinalização, tais como Ric-8B e G α olf. Curiosamente, um artigo recente (Wang, Guo *et al.*) reportou que o outro membro de Ric-8 dos mamíferos, Ric-8A, é capaz de modular a reorganização do citoesqueleto de actina, dependente do receptor para o fator de crescimento de plaquetas (receptor de PDGF- *platelet-*

derived growth factor receptor), um GPCR acoplado à $G\alpha_{13}$. Se Ric-8B também poderia estar envolvido na reorganização do citoesqueleto de actina ainda precisa ser investigado. Entretanto, pelas semelhanças funcionais entre Ric-8A e Ric-8B poderia se especular que a actina também está envolvida na via de sinalização de D1R e $G\alpha_{olf}$ e que por isso apresentou o mesmo padrão de expressão no estriado (figura 22).

É importante observar nas figuras 18 e 19 que os dois transcritos de Ric-8B possuem um comportamento semelhante. Esperava-se que com o aumento da expressão para o gene $G\alpha_{olf}$ também aumentaria-se a expressão de Ric-8B transcrito longo, pois esse é o transcrito que liga $G\alpha_{olf}$ e amplifica o seu sinal, atividade não observada para o transcrito curto (Chan, Gabay *et al.*, 2010). No entanto, os dados apresentados no presente trabalho indicam que o padrão de expressão de transcrito curto de Ric-8B no estriado varia como a expressão do transcrito longo. Os cDNAs dessas duas isoformas de Ric-8B também apresentam-se em igual quantidade em outros tecidos, como epitélio olfatório e encéfalo de camundongos (Von Dannecker, Mercadante *et al.*, 2005). De fato, o papel do transcrito curto de Ric-8B ainda não foi elucidado. Mas é atraente a ideia de que a regulação dessas variantes do processamento de RNA possa modular de algum modo a via de sinalização de $G\alpha_{olf}$ e também de DP. Sabe-se que entre 92% e 94% de genes multiexons possuem *splicing* alternativo (Pan, Shai *et al.*, 2008) e que a falta de regulação dos *splicing* alternativos pode levar a doenças (Faustino e Cooper, 2003)

Toda discussão feita acima é válida se realmente houver diferença estatística entre o expressão dos genes de interesse nos diferentes dias. No caso dessa tendência não se confirmar, a conclusão que poderá ser tirada é que não há variação da expressão dos genes de Ric-8B e $G\alpha_{olf}$ ao longo da evolução do Parkinsonismo nos ratos tratados com 6-OHDA. E uma explicação plausível para essa possível conclusão seria que a DP parece estar mais associada ao receptor D2 do que ao D1. Trabalhos já demonstraram que animais que não apresentavam os receptores D2 apresentavam os sintomas da DP tais como acinesia, bradicinesia e significativa redução de movimentos espontâneos (Baik, Picetti *et al.*, 1995). Camundongos que não expressam receptores D1 não mostram sintomas Parkinsonianos ou outras anormalidades motoras (Missale, Nash *et al.*, 1998). Por

Ric-8B e $G\alpha_{olf}$ estarem associadas ao receptor D1 e não D2 é possível que os dados obtidos no presente trabalho não se modifiquem mesmo com o aumento do número de experimentos (n), pois é provável que o receptor D1 tenha um papel mais secundário na DP.

7 - CONCLUSOES

- 1) A padronização do RT-qPCR foi realizada com sucesso para a quantificação dos genes de interesse no estriado de animais submetidos ao modelo de Parkinsonismo induzido por 6-OHDA. Sem dúvida, a padronização dessa metodologia foi de grande valia no laboratório e poderá ser utilizada em vários outros projetos.
- 2) Apesar de não haver diferença estatística, foi detectada uma tendência a um padrão de expressão comum para os genes Ric-8B (transcrito longo e transcrito curto) e GOLF ao longo do tempo, no estriado dos ratos tratados com 6-OHDA e *sham*. Estes transcritos apresentam expressão aumentada no tempo de 3 dias após a cirurgia, o que está em parte de acordo com os dados comportamentais.

8 - PERSPECTIVAS PARA A PUBLICAÇÃO

Após a padronização do experimento é possível pensar em novas abordagens que enriqueceriam o trabalho bem como ajudariam em uma futura publicação.

Desenhar novos iniciadores para os receptores de DA e quantificar a expressão gênica desses receptores nas mesmas condições de tempo e tratamento e correlacionar esses dados com os obtidos até o momento.

Seria interessante também quantificar a expressão dos genes para Ric-8B e $G\alpha$ olf em outro modelo animal para a DP, como a indução por MPTP ou Rotenona. É importante também realizar uma nova série de testes e acrescentar testes comportamentais ou bioquímicos para validar a lesão com 6-OHDA.

Por fim, para validar os dados moleculares, realizar experimentos utilizando *Western Blotting* para verificar a expressão protéica dos genes analisados em questão. O obstáculo aqui é a falta de anticorpos comerciais disponíveis para a realização de tais experimentos. Poderia tentar produzir tais anticorpos em laboratório o que enriqueceria ainda mais o trabalho.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. *Biologia Molecular da Célula*. São Paulo: Artmed, 2002.

AFSHAR, K., F. S. WILLARD, *Et Al*. Ric-8 Is Required For Gpr-1/2-Dependent Galpha Function During Asymmetric Division Of C. Elegans Embryos. Cell, V.119, N.2, Oct 15, P.219-30. 2004.

AHMED, M. R., A. BERTHET, *Et Al*. Lentiviral Overexpression Of Grk6 Alleviates L-Dopa-Induced Dyskinesia In Experimental Parkinson's Disease. Sci Transl Med, V.2, N.28, Apr 21, P.28ra28. 2010.

ARIZA, D., M. M. LIMA, *Et Al*. Intranigral Lps Administration Produces Dopamine, Glutathione But Not Behavioral Impairment In Comparison To Mptp And 6-Ohda Neurotoxin Models Of Parkinson's Disease. Neurochem Res, Jun 26. 2010.

BACKMAN, C. M., L. SHAN, *Et Al*. Gene Expression Patterns For Gdnf And Its Receptors In The Human Putamen Affected By Parkinson's Disease: A Real-Time Pcr Study. Mol Cell Endocrinol, V.252, N.1-2, Jun 27, P.160-6. 2006.

BAIK, J. H., R. PICETTI, *Et Al*. Parkinsonian-Like Locomotor Impairment In Mice Lacking Dopamine D2 Receptors. Nature, V.377, N.6548, Oct 5, P.424-8. 1995.

BEAL, M. F. Parkinson's Disease: A Model Dilemma. Nature, V.466, N.7310, Aug 26, P.S8-S10. 2010.

BENINGER, R. J. E R. MILLER. Dopamine D1-Like Receptors And Reward-Related Incentive Learning. Neurosci Biobehav Rev, V.22, N.2, Mar, P.335-45. 1998.

BERKE, J. D. E S. E. HYMAN. Addiction, Dopamine, And The Molecular Mechanisms Of Memory. Neuron, V.25, N.3, Mar, P.515-32. 2000.

BETARBET, R., T. B. SHERER, *Et Al*. Chronic Systemic Pesticide Exposure Reproduces Features Of Parkinson's Disease. Nat Neurosci, V.3, N.12, Dec, P.1301-6. 2000.

BUSTIN, S. A. Absolute Quantification Of Mrna Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. J Mol Endocrinol, V.25, N.2, Oct, P.169-93. 2000.

CHAN, P., M. GABAY, *Et Al*. Ric-8b Is A Gtp-Dependent G Protein Alphas Guanine Nucleotide Exchange Factor. J Biol Chem, V.286, N.22, Jun 3, P.19932-42. 2010.

CHOMCZYNSKI, P. E N. SACCHI. Single-Step Method Of Rna Isolation By Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Anal Biochem, V.162, N.1, Apr, P.156-9. 1987.

COUWENBERGS, C., A. C. SPILKER, *Et Al.* Control Of Embryonic Spindle Positioning And Galpha Activity By C. Elegans Ric-8. Curr Biol, V.14, N.20, Oct 26, P.1871-6. 2004.

DA CUNHA, C., E. C. WIETZIKOSKI, *Et Al.* Hemiparkinsonian Rats Rotate Toward The Side With The Weaker Dopaminergic Neurotransmission. Behav Brain Res, V.189, N.2, Jun 3, P.364-72. 2008.

DAUER, W. E S. PRZEDBORSKI. Parkinson's Disease: Mechanisms And Models. Neuron, V.39, N.6, Sep 11, P.889-909. 2003.

DAY, B. J., M. PATEL, *Et Al.* A Mechanism Of Paraquat Toxicity Involving Nitric Oxide Synthase. Proc Natl Acad Sci U S A, V.96, N.22, Oct 26, P.12760-5. 1999.

DERVEAUX, S., J. VANDESOMPELE, *Et Al.* How To Do Successful Gene Expression Analysis Using Real-Time Pcr. Methods, V.50, N.4, Apr, P.227-30. 2009.

FAUSTINO, N. A. E T. A. COOPER. Pre-Mrna Splicing And Human Disease. Genes Dev, V.17, N.4, Feb 15, P.419-37. 2003.

GABAY, M., M. E. PINTER, *Et Al.* Ric-8 Proteins Are Molecular Chaperones That Direct Nascent G Protein Alpha Subunit Membrane Association. Sci Signal, V.4, N.200, P.Ra79. 2011.

HEPLER, J. R. E A. G. GILMAN. G Proteins. Trends Biochem Sci, V.17, N.10, Oct, P.383-7. 1992.

HERVE, D., C. LE MOINE, *Et Al.* Galpha(Olf) Levels Are Regulated By Receptor Usage And Control Dopamine And Adenosine Action In The Striatum. J Neurosci, V.21, N.12, Jun 15, P.4390-9. 2001.

HERVE, D., M. LEVI-STRAUSS, *Et Al.* G(Olf) And Gs In Rat Basal Ganglia: Possible Involvement Of G(Olf) In The Coupling Of Dopamine D1 Receptor With Adenylyl Cyclase. J Neurosci, V.13, N.5, May, P.2237-48. 1993.

HOEBEECK, J., R. VAN DER LUIJT, *Et Al.* Rapid Detection Of Vhl Exon Deletions Using Real-Time Quantitative Pcr. Lab Invest, V.85, N.1, Jan, P.24-33. 2005.

JEON, B. S., V. JACKSON-LEWIS, *Et Al.* 6-Hydroxydopamine Lesion Of The Rat Substantia Nigra: Time Course And Morphology Of Cell Death. Neurodegeneration, V.4, N.2, Jun, P.131-7. 1995.

JIN, F., Q. WU, *Et Al.* Neuroprotective Effect Of Resveratrol On 6-Ohda-Induced Parkinson's Disease In Rats. Eur J Pharmacol, V.600, N.1-3, Dec 14, P.78-82. 2008.

KUMAR, P., R. K. KAUNDAL, *Et Al.* Beneficial Effects Of Pioglitazone On Cognitive Impairment In Mptp Model Of Parkinson's Disease. Behav Brain Res, V.197, N.2, Feb 11, P.398-403. 2009.

MATTSON, M. P., M. GLEICHMANN, *Et Al.* Mitochondria In Neuroplasticity And Neurological Disorders. Neuron, V.60, N.5, Dec 10, P.748-66. 2008.

MICHAEL, G. J., S. ESMAILZADEH, *Et Al.* Up-Regulation Of Metallothionein Gene Expression In Parkinsonian Astrocytes. Neurogenetics, V.12, N.4, Nov, P.295-305. 2011.

MILLER, K. G., A. ALFONSO, *Et Al.* A Genetic Selection For Caenorhabditis Elegans Synaptic Transmission Mutants. Proc Natl Acad Sci U S A, V.93, N.22, Oct 29, P.12593-8. 1996.

MILLER, K. G. E J. B. RAND. A Role For Ric-8 (Synembryn) And Goa-1 (G(O)Alpha) In Regulating A Subset Of Centrosome Movements During Early Embryogenesis In Caenorhabditis Elegans. Genetics, V.156, N.4, Dec, P.1649-60. 2000.

MISSALE, C., S. R. NASH, *Et Al.* Dopamine Receptors: From Structure To Function. Physiol Rev, V.78, N.1, Jan, P.189-225. 1998.

MOORE, D. J., A. B. WEST, *Et Al.* Molecular Pathophysiology Of Parkinson's Disease. Annu Rev Neurosci, V.28, P.57-87. 2005.

NAGAI, Y., A. NISHIMURA, *Et Al.* Ric-8b Stabilizes The Alpha Subunit Of Stimulatory G Protein By Inhibiting Its Ubiquitination. J Biol Chem, V.285, N.15, Apr 9, P.11114-20. 2010.

PAN, Q., O. SHAI, *Et Al.* Deep Surveying Of Alternative Splicing Complexity In The Human Transcriptome By High-Throughput Sequencing. Nat Genet, V.40, N.12, Dec, P.1413-5. 2008.

PIERCE, K. L., R. T. PREMONT, *Et Al.* Seven-Transmembrane Receptors. Nat Rev Mol Cell Biol, V.3, N.9, Sep, P.639-50. 2002.

PRZEDBORSKI, S. PATHOGENESIS Of Nigral Cell Death In Parkinson's Disease. Parkinsonism Relat Disord, V.11 Suppl 1, Jun, P.S3-7. 2005.

PRZEDBORSKI, S. E M. VILA. The 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model: A Tool To Explore The Pathogenesis Of Parkinson's Disease. Ann N Y Acad Sci, V.991, Jun, P.189-98. 2003.

REALE, M., C. IARLORI, *Et Al.* Peripheral Cytokines Profile In Parkinson's Disease. Brain Behav Immun, V.23, N.1, Jan, P.55-63. 2009.

REYNOLDS, N. K., M. A. SCHADE, *Et Al.* Convergent, Ric-8-Dependent Galpha Signaling Pathways In The Caenorhabditis Elegans Synaptic Signaling Network. Genetics, V.169, N.2, Feb, P.651-70. 2005.

SCHAPIRA, A. H., E. BEZARD, *Et Al.* Novel Pharmacological Targets For The Treatment Of Parkinson's Disease. Nat Rev Drug Discov, V.5, N.10, Oct, P.845-54. 2006.

SCHMITTGEN, T. D. E. K. J. LIVAK. Analyzing Real-Time Pcr Data By The Comparative C(T) Method. Nat Protoc, V.3, N.6, P.1101-8. 2008.

SHEHADEH, L. A., K. YU, *Et Al.* Srrm2, A Potential Blood Biomarker Revealing High Alternative Splicing In Parkinson's Disease. Plos One, V.5, N.2, P.E9104. 2010.

SPRANG, S. GEFS: Master Regulators Of G-Protein Activation. Trends Biochem Sci, V.26, N.4, Apr, P.266-7. 2001.

TALL, G. G., A. M. KRUMINS, *Et Al.* Mammalian Ric-8a (Synembryn) Is A Heterotrimeric Galpha Protein Guanine Nucleotide Exchange Factor. J Biol Chem, V.278, N.10, Mar 7, P.8356-62. 2003.

TRUONG, L., H. N. ALLBUTT, *Et Al.* Behavioural Effects Of A Selective Nmda Nr1a/2b Receptor Antagonist In Rats With Unilateral 6-Ohda+Parafascicular Lesions. Brain Res Bull, V.78, N.2-3, Feb 16, P.91-6. 2009.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-Dopamine Induced Degeneration Of Central Monoamine Neurons. Eur J Pharmacol, V.5, N.1, Dec, P.107-10. 1968.

VANDESOMPELE, J., K. DE PRETER, *Et Al.* Accurate Normalization Of Real-Time Quantitative Rt-Pcr Data By Geometric Averaging Of Multiple Internal Control Genes. Genome Biol, V.3, N.7, Jun 18, P.Research0034. 2002.

VERCAMMEN, L., A. VAN DER PERREN, *Et Al.* Parkin Protects Against Neurotoxicity In The 6-Hydroxydopamine Rat Model For Parkinson's Disease. Mol Ther, V.14, N.5, Nov, P.716-23. 2006.

VON DANNECKER, L. E., A. F. MERCADANTE, *Et Al.* Ric-8b, An Olfactory Putative Gtp Exchange Factor, Amplifies Signal Transduction Through The Olfactory-Specific G-Protein Galphaolf. J Neurosci, V.25, N.15, Apr 13, P.3793-800. 2005.

WANG, L., D. GUO, *Et Al.* Resistance To Inhibitors Of Cholinesterase-8a (Ric-8a) Is Critical For Growth Factor Receptor-Induced Actin Cytoskeletal Reorganization. J Biol Chem, V.286, N.35, Sep 2, P.31055-61.

WARRAICH, S. T., H. N. ALLBUTT, *Et Al.* Evaluation Of Behavioural Effects Of A Selective Nmda Nr1a/2b Receptor Antagonist In The Unilateral 6-Ohda Lesion Rat Model. Brain Res Bull, V.78, N.2-3, Feb 16, P.85-90. 2009.

WARRINGTON, J. A., A. NAIR, *Et Al.* Comparison Of Human Adult And Fetal Expression And Identification Of 535 Housekeeping/Maintenance Genes. Physiol Genomics, V.2, N.3, Apr 27, P.143-7. 2000.

YAMADA, K., D. J. GERBER, *Et Al.* Genetic Analysis Of The Calcineurin Pathway Identifies Members Of The Egr Gene Family, Specifically Egr3, As Potential Susceptibility Candidates In Schizophrenia. Proc Natl Acad Sci U S A, V.104, N.8, Feb 20, P.2815-20. 2007.

ZHUANG, X., L. BELLUSCIO, *Et Al.* G(Olf)Alpha Mediates Dopamine D1 Receptor Signaling. J Neurosci, V.20, N.16, Aug 15, P.Rc91. 2000.

10 – ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 515

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

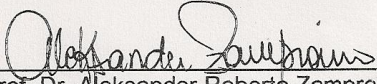
PROCESSO: 23075.069270/2011-28

APROVADO: 05/04/2011 – R.O. 03/2011

TÍTULO: Investigação de um possível envolvimento da proteína Ric-8B na Doença de Parkinson

AUTORES: Adriana Frohlich Mercadante, Rodrigo S. Neher, Maria Aparecida B. Frazão Vital, Ronise Santiago

DEPARTAMENTO: Patologia Básica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA