

CONSTRUÇÃO DE UM VETOR CONTENDO A SEQUÊNCIA SILENCIADORA DE TGF- β 1 E O GENE REPÓRTER LACZ

GIOVANNA GRUNEWALD VIETTA; FERNANDA SPERB, VALESKA LIZZI LAGRANHA, ANGELA TAVARES, URSULA MATTE, NADINE CLAUSELL

INTRODUÇÃO: O TGF- β 1 é um polipeptídeo multifuncional que desempenha um importante papel na fibrose. Na insuficiência cardíaca (IC) exerce diferentes efeitos no remodelamento após o infarto do miocárdio (IM). O uso de um shRNA para *TGF- β 1* pode ser uma estratégia inovadora para o tratamento da IC pós-IAM. **OBJETIVO:** Construir um vetor que carregue a sequência específica para silenciamento do *TGF- β 1*, contendo o marcador *LacZ*, capaz de sinalizar, por coloração, sua presença no tecido. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A sequência do gene *LacZ* foi excisada do vetor *pnlacF* e subclonada ao plasmídeo pREP9 (Invitrogen) com a utilização das enzimas *KpnI* e *HindIII*. Com o objetivo de isolar o cassete de expressão (promotor pRSV, *LacZ*, e terminador SV40pA), o construto obtido na subclonagem, foi clivado com as enzimas *XbaI* e *AfeI*. Posteriormente este cassete foi inserido no plasmídeo pSUPER (Oligoengine), contendo a sequência específica para silenciamento do *TGF- β 1*. **RESULTADOS:** A subclonagem do *LacZ* ao plasmídeo pREP9 foi confirmada por clivagem. O plasmídeo pSUPER contendo o cassete de expressão com o gene repórter *LacZ* bacteriano (pSUPER/*LacZ*), foi usado para transformar *E. coli* DH5 α termocompetentes e a expressão de *LacZ* confirmada por coloração específica. O DNA plasmídeo foi extraído e purificado utilizando o Kit Maxi Prep (Invitrogen). **CONCLUSÃO:** O gene repórter foi inserido ao sistema de RNA de interferência pSUPER. No entanto, antes de sua utilização *in vivo*, é necessário verificar sua funcionalidade através de transferência gênica *in vitro* na linhagem celular GRX, que produz *TGF- β 1* e deverá apresentar coloração azulada na presença do gene marcador.