

ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DOS PRIMERS PARA SEQUENCIA GENOMICA DE β -ACTINA NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA *Canis lupus familiaris* (Linnaeus, 1758) (Carnivora, Canidae).

SPECIFICITY AND SENSITIVITY OF THE PRIMERS FROM GENOMIC SEQUENCE OF β -ACTIN IN THE POLYMERASE CHAIN REACTION TO *Canis lupus familiaris* (Linnaeus, 1758) (Carnivora, Canidae).

¹VIEIRA, J.; ²TEIXEIRA, A.B.; ²NOGUEIRA, M.F.G.

¹Departamento de Ciências Biológicas – Faculdades Integradas de Ourinhos – FIO/FEMM

²Departamento de Medicina Veterinária – Faculdades Integradas de Ourinhos – FIO/FEMM

RESUMO

Genes constitutivos são expressos em vários tecidos, tendo sido muito estudados nos últimos anos. A β -actina (ACTB) é uma proteína com importantes funções celulares, e vem sendo utilizada como gene constitutivo em análises semi-quantitativas utilizando a PCR, aumentando assim a confiabilidade das análises. O objetivo desse trabalho foi testar a especificidade de “primers” de ACTB delineado para cão (*Canis lupus familiaris*) com outros mamíferos na técnica da PCR, e em segundo plano a sua sensibilidade em diferentes concentrações de “primers”. Os resultados mostraram especificidade para a espécie canina, produzindo “amplicon” bem próximos ao esperado, e na sensibilidade apenas a menor concentração (0,5 pmoles) não produziu banda. Assim conclui-se que a concentração ideal fique entre 25,0 a 12,5 pmoles e que o “amplicon” necessita ser sequenciado para confirmação da amplificação da ACTB, para assim ser introduzido como controle interno no diagnóstico molecular da bactéria *Ehrlichia canis*.

Palavras-chave: Gene constitutivo, β -actina, PCR, *Canis lupus familiaris*

ABSTRACT

Housekeeping genes are expressed in various tissues and they have been studied in recent years. The β -actin (ACTB) is a protein with important cellular functions, and has been used as housekeeping gene in semi-quantitative analysis using the PCR, increasing reliability of the tests. The objective of this work was to test the specificity of primers of ACTB delineated to dog (*Canis lupus familiaris*) with other mammals in the PCR technique, in the background and its sensitivity to different concentrations of primers. The results showed specificity to the canine species, producing closer to the amplicon estimated, and on the sensitivity only the smallest concentration (0.5 pmoles) did not produce amplicon. So, we found that the ideal concentration is among 25.0 to 12.5 pmoles and the amplicon needs to be sequenced to confirm amplification of ACTB, this way, it will be introduced as an internal control in molecular diagnostic of the bacterium *Ehrlichia canis*.

Keywords: Housekeeping gene, β -actin, PCR, *Canis lupus familiaris*.

INTRODUÇÃO

Genes constitutivos são expressos em vários tecidos para assegurar as funções celulares (ALBERTS *et al.*, 2002; LEWIN, 2004). Esse tipo de gene tem sido estudado em diferentes tecidos de mamíferos para compreensão dos padrões de expressão gênica dentro das respectivas velocidades de evolução (ZHANG *et al.*, 2004). A β -actina (ACTB) é uma proteína ligada ao citoesqueleto,

desempenhando funções de tráfico intracelular e na morfologia celular, pois está associada à motilidade, endocitose, citocinese e na adesão celular (BRAKEBUSCH; FASSLER, 2003; ENGQVIST-GOLDSTEIN; DRUBIN, 2003; ASCOUGH, 2004). Este gene constitutivo serve como referência para análise semi-quantitativa (ASQ) de outros genes induzidos amplificados nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR). BAGALDO *et al.*, (2006) analisaram a expressão do gene IGF-I no intestino delgado de bezerros machos, utilizando a ACTB na ASQ verificando a expressão gênica relacionada à atividade celular no desenvolvimento pós-natal do jejuno e íleo.

Além da comparação em ASQ, o uso de um gene constitutivo em diagnósticos moleculares, serve como referência da amplificação da técnica de PCR, conferindo confiabilidade ao exame, eliminando assim possibilidade de reações falso-negativas, por contaminação ou pipetagem errada do DNA genômico (DNAg) ou das enzimas (DE LOMAS *et al.*, 1992; WIEDORN; GOLDMANN, 2003; ZHAO *et al* 2005).

O objetivo principal desse trabalho foi verificar a especificidade de “primers” de ACTB delineado para Cão: *Canis lupus familiaris* (Linnaeus, 1758) com outros mamíferos como: Camundongo: *Mus musculus* (Linnaeus, 1758), Cavalos: *Equus caballus* (Linnaeus, 1758) e Gato: *Felis catus domestica* (Erleben, 1777), e como objetivo secundário verificar sua sensibilidade em diferentes concentrações na técnica de PCR, para posterior utilização como gene constitutivo como controle interno no diagnóstico molecular da bactéria gram-negativa *Ehrlichia canis*.

MATERIAL E MÉTODOS

No Campus das Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), na clínica de patologia, foram colhidas as amostras de sangue dos mamíferos com anticoagulante EDTA em tubo a vácuo, e levados ao Laboratório de Biologia Molecular das FIO, para extração do DNA total utilizando o kit de extração NucleoSpin Blood QuickPure® (MACHEREY-NAGEL), seguindo metodologia do fabricante. Posteriormente foi verificada a integridade da extração em gel de agarose a 1,5%, com 4 µL da solução final (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Foram delineados “Primers” para ACTB (“primer sense” : 5' CCA CCT CAT GAC ATT CCT CAC C 3' ; “primer antisense” 5' CGC ATG TGC TAA GGC TAA AGG 3') utilizando o programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000), esperando um “amplicon” de 833 bp após a

amplificação. A seqüência utilizada foi retirada do Genbank do NCBI (AAEX02031363) para *Canis lupus familiaris*.

Para a análise da especificidade foram realizadas PCR em microtubos de 0,2 mL com 2,5 µL de amostra de DNA para cada animal, sendo adicionado 1,25 µL de cada “primer” (25 pmole) e 20 µL da enzima Platinum PCR SuperMix® (Invitrogen), totalizando uma reação com 25 µL ou seja, com concentração de cada “primer” de 1 pmole/µL.

Para a análise de sensibilidade foram realizadas cinco ensaios de PCR com diferentes concentrações de “primers”, conforme a tabela 1.

Tabela 1. Concentrações das amostras para sensibilidade da ACTB.

Amostras	1º	2º	3º	4º	5º
Quantidade em pmole*	25,0	12,5	5,0	2,5	0,5

*valor para cada “primer” (sense e antisense).

Tabela descritiva das diluições dos “primers” para o teste de sensibilidades.

As diluições foram realizadas com água ultra-pura autoclavada livre de DNase e RNase. A quantidade da solução dos “primers” se manteve constante para 1,25 µL, diferenciando apenas nas concentrações feitas para a sensibilidade em cada amostra (Tabela 1). O DNAg utilizado foi o de cão, com a quantidade de 2,5 µL da extração feita a partir do sangue total, a amostra foi completada com 20 µL de Platinum PCR SuperMix® (Invitrogen), totalizando uma reação de 25 µL.

Os tubos foram colocados no termociclador Veriti 96-Well® (Applied Biosystems), seguindo as seguintes etapas: primeira etapa, 10 minutos em temperatura de 94°C para desnaturação inicial; segunda etapa, 30 ciclos de 94°C por 60s (desnaturação), 64°C por 60s (anelamento), 72°C por 60s (extensão); a última etapa, extensão final foi a 72°C por 4 minutos. Depois da amplificação no termociclador, 8 µL de cada amostra foi carregado com 2 µL de 10X BlueJuice Gel Loading Buffer® (Invitrogen), conforme metodologia do fabricante, em gel de agarose a 1,5 % na cuba de eletroforese com solução tampão de corrida Tris-borato EDTA (TBE), com 150 volts por 30 minutos aproximadamente.

Após a corrida, o gel foi corado com solução de TBE com SYBR Safe DNA Gel Stain DMSO® (Invitrogen) por 30 minutos em constante movimentação, seguindo procedimento do fabricante. A captura digital da imagem do gel foi feita com transiluminador MiniBIS Pro® (DNR Bio-Imaging Systems), por meio do programa GelCapture Versão 4.24 do mesmo fabricante, sendo estas imagens

também analisadas por meio do programa ImageJ, modificado de ABRAMOFF (2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na PCR da especificidade com o DNA dos mamíferos, foi observada “amplicons” de aproximadamente 800 bp pela imagem encontrada no gel, muito próxima da esperada (833 pb), apenas para *Canis lupus familiaris*, conforme figura 1, assim sugerindo a especificidade dos “primers” de ACTB, pois os genes constitutivos evoluem mais lentamente do que os genes tecido-específico, conseqüentemente isto não quer dizer que exista um menor grau de redundância genética, sendo visto por ZHANG; LI (2004).

Analisando a PCR da sensibilidade, observou-se que somente a amostra numero 5 (0,5 pmoles), não produziu “amplicons”, sendo que as outras amostras produziram “amplicons” de tamanho desejado (aproximadamente 833pb), conforme figura 2. A partir da amostra 2 até a 4 foi observado também um subproduto com banda inespecífica, sendo esta resultado da concentração “DNA/primer” ou seja, o DNAg se manteve constante, sendo assim nas concentrações menores de “primers” houve uma quantidade alta de DNAg pela quantidade de “primers” utilizado, agravado pela quantidade de guanina/citosina das amostras, assim produzindo estas bandas (GRUNENWALD, 2003). A figura 3 mostra uma análise densitométrica do gel de agarose da sensibilidade da ACTB.

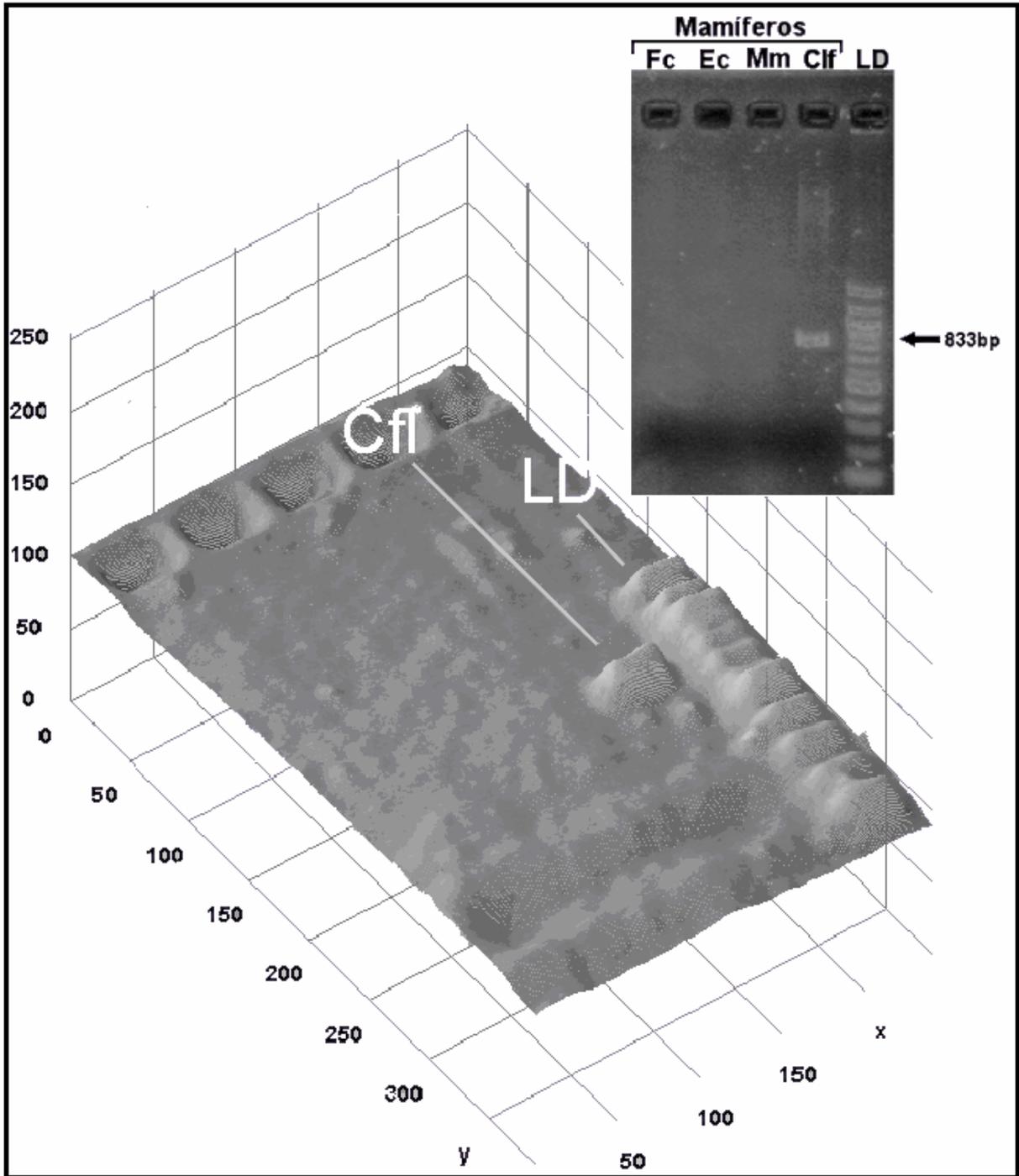


Figura 1. Imagens da eletroforese em gel de agarose a 1,5%, para o teste da especificidade dos “primers” de ACTB, onde (LD; “Ladder” 100bp), (Cfl; *Canis lupus familiaris*), (Mm; *Mus musculus*), (Ec; *Equus caballus*), (Fc; *Felis catus*)

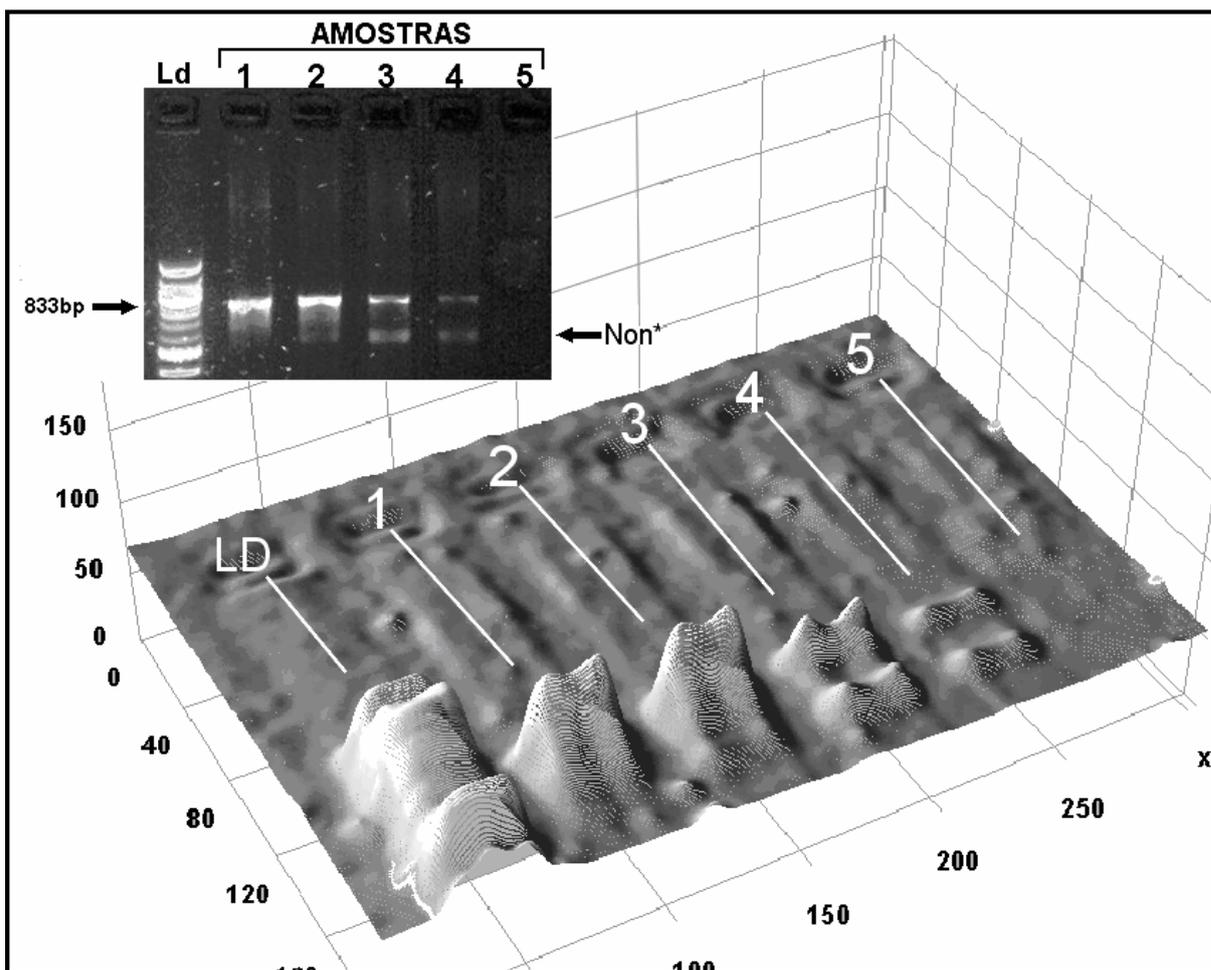


Figura 2. Imagens da eletroforese em gel de agarose 1,5% da eletroforese da sensibilidade da ACTB, onde (LD; "Ladder" 100bp) e (Non*; Banda inespecífica) - AMOSTRAS: (1°; 25 pmoles), (2°; 12,5 pmoles), (3°; 5,0 pmoles), (4°; 2,5 pmoles) e (5°; 0,5 pmoles).

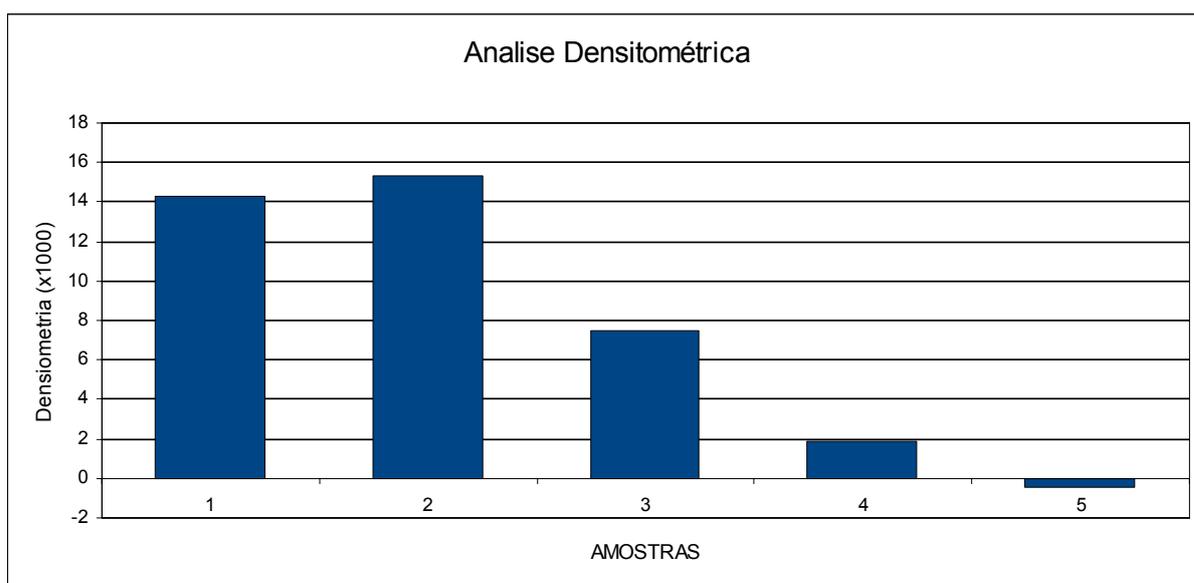


Figura 3. Gráfico da análise densitométrica do gel de agarose da sensibilidade da ACTB. Onde; AMOSTRAS: (1°; 25 pmoles), (2°; 12,5 pmoles), (3°; 5,0 pmoles), (4°; 2,5 pmoles) e (5°; 0,5 pmoles).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho sugerem que o tamanho do fragmento do “amplicon” encontrado de aproximadamente 800pb está bem próximo do esperado para a ACTB (833pb), podendo confirmar a especificidade dos “primers” delineados para espécie canina (cão, *Canis lupus familiaris*) em relação à ausência de banda nas outras espécies testadas (camundongo, *Mus musculus*; cavalo, *Equus caballus*; gato, *Felis catus domestica*) e ainda, que a melhor concentração dos “primers” para ACTB, deve estar entre 25 e 12,5 pmoles em função da densitométrica encontrada nas bandas com concentrações decrescentes de “primers”, nas mesmas condições de concentração de DNAg e das enzimas utilizadas. Entretanto, o seqüenciamento do “amplicon” encontrado, deverá ser feito para confirmação da amplificação da ACTB, para que, posteriormente, possa ser introduzido como controle interno no diagnóstico molecular da bactéria gram-negativa *Ehrlichia canis*.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. New York and London. Garland Science, 2002.
- LEWIN B. **Genes VIII**. 8ed. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, 2004.
- ZHANG, L.; LI W.H. Mammalian Housekeeping Genes Evolve More Slowly than Tissue-Specific Genes. **Molecular Biology and Evolution**. 21(2):236-239. 2004.
- BRAKEBUSCH, C.; FÄSSLER R. The integrin–actin connection, an eternal love affair. **The EMBO Journal** 22, 2324–2333, 2003.
- ENGQVIST-GOLDSTEIN A.E.Y.; DRUBIN D.G. Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. Vol. 19: 287-332 (Nov), 2003.
- ASCOUGH, K.R. Endocytosis: Actin in the Driving Seat. **Current Biology**, Vol. 14, R124–R126, Feb 3, 2004.
- BAGALDO, A. R.; PAULETTI, P.; DELGADO, E. F.; KINDLEIN, L.; OLIVEIRA, R. L.; MACHADO NETO, R. Utilização de indicadores de atividade celular no desenvolvimento pós-natal do jejuno e íleo de bezerros. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.7, n2, p. 128-138, 2006.
- DE LOMAS J.G.; SUNZERI F.J.; BUSCH M.P. False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder. **Transfusion**. Jan;32(1):83-5, 1992.
- WIEDORNK.H.; GOLDMANN T. Direct and Indirect In Situ PCR. In: BARTLETT J. M. S.; STIRLING D. **Methods in Molecular Biology: PCR Protocols**. Second Ed. Vol. 226, Humana Press Inc., Totowa, p.433-444. 2003.
- ZHAO F-L.; SHEN T.; KAYA N.; LU S-G.; CAO Y.; HERNESS S. Expression, physiological action, and coexpression patterns of neuropeptide Y in rat taste-bud cells. **PNAS** Aug;2, vol. 102 no. 31 11100-11105, 2005.
- SAMBROOK J.; RUSSELL D.W. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. Third Ed. Vol 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p 5.14-5.17, 2001.
- ROZEN S.; SKALETSKY H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ S.; MISENER S (eds). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, p. 365-386, 2000.
-

ABRAMOFF, M. D., MAGELHAES, P. J., RAM, S. J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics Intern.** issue 11, 36–42 2004.

GRUNENWALD H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. In: BARTLETT J. M. S.; STIRLING D. **Methods in Molecular Biology: PCR Protocols.** Second Ed. Vol. 226, Humana Press Inc., Totowa, p.89-99. 2003.
