

## ANÁLISE *IN SÍLICO* PARA UTILIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE MENSURAÇÃO DE TELOMEROS EM EQUINOS

MARTIN LARANJEIRA<sup>1</sup>; DANIEL BERTOLDI<sup>1</sup>, PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON<sup>1,2</sup>; FABIANA KOMMLING SEIXAS<sup>1,2</sup>; TIAGO COLLARES<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – [martin.laranjeira@hotmail.com](mailto:martin.laranjeira@hotmail.com)

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – [collares.t@gmail.com](mailto:collares.t@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Telômeros são complexos de DNA presentes no final de cromossomos, formados por hexâmeros repetitivos (TTAGGG) cuja função é a proteção do DNA cromossomal, tendo seu comprimento reduzido a cada divisão celular (BLACKBURN, 1991). O comprimento desses telômeros mostrou-se associado com o aumento de risco de uma série de condições como declínio cognitivo e demência (BAKAYSA, 2007), além de doença da artéria coronariana e infarto do miocárdio (ZEE, 2009).

Apesar de haverem muitos estudos no que se refere ao comprimento de telômeros em humanos (BAKAYSA, 2007; ZEE, 2009), o estudo dessa estrutura do DNA em equinos é extremamente pequeno, considerando-se que essa espécie é de grande importância econômica, por ser uma espécie que atua fortemente em diversas áreas, como o trabalho no campo e esportes equestres, ainda podendo servir como modelo experimental para condições humanas, seria de grande utilidade o desenvolvimento desta linha de pesquisa em equinos.

Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar e adequar, com ferramentas de análise *in sílico*, o protocolo de mensuração de comprimento relativo de telômeros usado por CAWTHON (2002), a fim de adaptá-lo para que possa ser utilizado em equinos, adequando-o para as possíveis diferenças presentes entre as sequências de DNA amplificado em humanos e equinos.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Modelo de protocolo para análise dos telômeros

No estudo de Cawthon (2002), são utilizados dois pares de *primers*, sendo um par utilizado para amplificação dos telômeros em si (*primer T*), e outro par utilizado para amplificação de um gene de cópia única (*primer S*), amplificando-se o DNA através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Obtendo-se o resultado do ciclo em que houve amplificação, calcula-se a razão T/S, que seria equivalente ao comprimento relativo dos telômeros das amostras do DNA amplificado.

O grande diferencial dessa técnica são os *primers T*, que não se anelam 100% no DNA, de forma proposital. Pois como os telômeros são sequências repetitivas, se os *primers* fossem totalmente complementares, haveria formação em grande número de dímeros de *primers* (quando *primers*, invés de se anelarem no DNA cromossomal, se anelam a outro *primer*).

Já os *primers S*, de grande importância para esse protocolo, anelam-se no gene 36b4, codificante da proteína ribossomal P0, estando presente no

cromossomo 12 em humanos. Enquanto que, a mesma proteína é codificada no cromossomo 8 em equinos.

## 2.2 Análise *in silico*

Para as análises *in silico* foram utilizadas ferramentas de bioinformática de alinhamento global Emboss Needle vinculada ao Instituto Europeu de Bioinformática (EBI) parte do Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL), realizando-se alinhamento dos *primers* S e T (*forward* e *reverse*), tanto com a sequência de DNA humano quanto com a de DNA equino.

## 2.3 Análise *in vitro*

Para validação das análises realizadas *in silico*, foram obtidas duas amostras de DNA genômico equino, para comparação com duas amostras de DNA genômico humano.

Na obtenção do DNA genômico equino foram coletadas alíquotas de sangue periférico, ao qual foram utilizadas no processamento para extração do DNA genômico.

Para a extração de DNA foi utilizado Kit comercial, Dneasy Blood & tissue kit (Qiagen). O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (Nanovue Plus) para padronização da concentração em 100ng/ $\mu$ L.

As reações de qRT-PCR foram realizadas no Stratagene® Mx3005P™ Real-Time PCR System (Agilent Technologies, USA), utilizando o SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, UK) e os primers descritos. As condições de reação foram as seguintes: 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56°C por 2 minutos para ambos os primers, condições um pouco diferentes das utilizadas no protocolo de Cawthon (2002).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *primers* T obtiveram alinhamento igual comparando-se os telômeros humanos com telômeros equinos, mostrando 100% de homologia. Isso se deve ao fato de telômeros serem estruturas extremamente conservadas das bases TTAGGG. A figura 1 mostra os *primers* T alinhados aos telômeros, deixando evidente como algumas bases dos *primers* T não se anelariam aos telômeros, para evitar a formação de dímeros de *primers*.

Já no alinhamento dos *primers* S, específico para o gene 36b4 humano, apresentou um *missmatch* em cada *primer* (troca de C para T no alinhamento do *primer forward* e de C para A no *primer reverse*), como mostra a figura 2. É necessário lembrar que é possível utilizar, nessa técnica de mensuração de telômeros, qualquer gene de cópia única, sendo o 36b4 utilizado por Cawthon (2002), pois esse gene já tinha sido validado para estudo de dosagem de genes.

Já no caso dos *primers* S, talvez a troca de apenas uma base por *primer* não interferisse em grande quantidade na amplificação do DNA alvo. Entretanto, como se busca sempre minimizar as chances de erro em estudos desse tipo, o ideal seria fazer um desenho de novos *primers* que se anelariam completamente ao gene 36b4 equino ou a outro gene de cópia única (como o gene ACTN3).

A técnica de qRT-PCR realizada comparativa entre DNA equino e DNA humano não obteve resultados semelhantes aos de Cawthon, visto que, nos resultados obtidos em seu estudo, o DNA amplificado pelos *primers* S demoraram, em média, 9 ciclos a mais para emitir o mesmo nível de fluorescência

que o DNA amplificado pelos *primers* T. Enquanto que, no presente trabalho esta diferença não foi observada.

```

TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAG
|.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||
GGTTTTTGGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-----

CTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAAC
|||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||
TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-----

```

Figura 1 – Alinhamento entre *primers* T (*forward* e *reverse*) com DNA telomérico. Ponto indica os locais de degeneração dos primers a fim de otimizar a reação molecular de detecção.

```

CCCCATTCTATCATCAATGGGTACAAGCGGGTCTGGCTTTGTCTGIGGA
|||||||.|.|||||||
-CCCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-----

CCTTTTCAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCAGTCTCCACAGACAAAGCCAGG
|||||||.|.|||||||
-----CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-----

```

Figura 2 – Alinhamento entre *primers* S (*forward* e *reverse*) com gene 36b4 equino. Ponto indica não compatibilidade entre a sequência gênica e o *primer* analisado.

#### 4. CONCLUSÕES

Concluiu-se que é possível a adaptação do protocolo utilizado por Cawthon (2002) para estudo do DNA telomérico em equinos. Não sendo necessário o desenho de novos *primers* T, por serem estruturas extremamente conservadas entre as espécies. Já no caso dos *primers* S, o ideal seria fazer novos *primers* específicos para o gene 36b4 equino ou eleger outro gene de cópia única para normalizador.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLACKBURN, EH. Structure and Function of Telomeres. **Nature**, San Francisco, v. 350, n. 6319, p. 569-573, 1991.

CAWTHON, RM. Telomere Measurement by Quantitative PCR. **Nucleic Acids Research**, Salt Lake City, v.30, n.10, p.47, 2002.

O'CALLAGHAN, NJ e FENECH, M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. **Biol Proceed Online**, Biol Proceed Online, v. 13, n. 3, 2011.

ZEE, RY. Association of Shorter Mean Telomere Length with Risk of Incident Myocardial Infarction: A Prospective, Nested Case-Control Approach. **Clinica Chimica Acta**, v. 403, n. 1-2, p. 139-141, 2009.