

VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA EM *EISENIA ANDREI* EXPOSTOS A SUBSTRATO CONTAMINADO COM COBRE

Nariane de Andrade^{1*}, Zaida I. Antonioli², Caroline B. Bevilacqua³, Valdemir B. Soares¹

1. Estudante de IC do curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria

2. Professora da Universidade Federal de Santa Maria/ Orientadora

3. Estudante de Pós Graduação da Universidade Federal de Santa Maria

Resumo:

Os estudos utilizando bioindicadores da qualidade do solo tem se tornado frequente devido à importância de organismos para determinação da qualidade ambiental. As minhocas são importantes bioindicadores e possuem rapidez e acurácia nos resultados por apresentar altas taxas de crescimento e reprodução. Desta forma, a determinação de genes de referência adequados preconiza estudos de expressão gênica e posteriores avanços no entendimento dos mecanismos de resposta à estresses ambientais. O objetivo deste estudo foi validar genes de referência em *Eisenia andrei* exposta a substratos contaminados com cobre. Do total, 5 pares de primers apresentaram resultado satisfatório quando em PCR convencional. Os 5 previamente selecionados, foram submetidos a análise da Curva de Melt e utilização de programas como o geNorm (versão 3.5), NormFinder (versão 0.953) e BestKeeper (versão 1.0). Desta forma, dois pares de primers de todos os avaliados apresentaram adequada amplificação para genes de referência de minhocas da espécie *Eisenia andrei*.

Palavras-chave: genes normalizadores, bioindicadores, RNA

Apoio financeiro: Programa de Educação Tutorial-PET, PIBIC-CNPq, DOC-FIX - Capes-Fapergs, Departamento de Solos/UFSM.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFSM

Introdução:

As minhocas são grandes agentes da fauna do solo, pois apresentam impactos na atividade de decomposição, mineralização e reciclagem de nutrientes (Bernard et al., 2010). Além disso, são importantes bioindicadores da qualidade do solo, utilizadas em testes ecotoxicológicos como organismos sensíveis à poluição (Chen et al., 2011). A biologia molecular, através da utilização de

biomarcadores, auxilia na avaliação precoce destes impactos ambientais (Wu et al., 2012).

Minhocas são consideradas organismos modelos, por apresentarem alterações moleculares quando expostas a poluentes, são utilizados em estudos de expressão gênica visando avaliar os efeitos de contaminações ambientais (Zheng et al. 2007). A espécie *Eisenia andrei* é alvo deste estudo, por apresentar altas taxas de crescimento e reprodução principalmente em ambientes de vermicultura e vermicompostagem (Dominguez e Pérez-Losada, 2010).

Em estudos de expressão gênica relativa quantitativa, utilizando a técnica de RT-qPCR, o primeiro passo é selecionar e validar genes de referência adequados para normalizar os níveis de expressão de genes alvo. Genes normalizadores necessitam apresentar uma expressão estável, bem como apresentar primers com alta eficiência, na maioria dos tecidos do organismo analisado, assim como durante as fases de desenvolvimento e sob diferentes condições de estresse.

O objetivo deste estudo foi validar genes candidatos a normalizadores para a espécie *Eisenia andrei* exposta a condições de estresse ambiental sob diferentes doses de cobre.

Metodologia:

O cDNA foi obtido a partir da extração de RNA de minhoca (*Eisenia andrei* Bouché) exposta a diferentes doses de cobre: 140 mg de cobre/kg de substrato e 175 mg de cobre/kg de substrato, em duas épocas de coleta das minhocas (14 e 28 dias), após a inoculação no substrato.

O RNA total foi extraído em triplicatas com o auxílio do Kit Direct-zol RNA MiniPrep (*Zymo Research*), sua integridade e concentração foram mensuradas por gel de agarose 1% e em espectrofotômetro Picodrop 260/280 nm, respectivamente. Foi selecionada a melhor amostra dentre as três repetições e a síntese foi feita utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (*Applied Biosystems*).

Todas as amostras passaram por PCR convencional a fim de verificar a contaminação com DNA genômico. Para as reações foi utilizado 1X buffer (500mM, Tris HCl, pH 8,5, 150 mM sulfato de amônio, pH 9,3, 25 mM MgCl₂ e 1% Tween 20), 0,2 mM de cada primer, 0,1 mM de dNTP (*Sigma Aldrich*), 2,5U de Taq DNA Polymerase (*Sigma Aldrich*) e 1 µl de amostra, totalizando um volume final de 25 µl. A qualidade da amplificação de cada par de primer por PCR convencional foi verificada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose 1% a 90V, utilizando tampão TBE 1X (90mM Tris, 90 mM de ácido bórico e mM EDTA, pH 8,0). A qualidade do gel e o tamanho das bandas observadas foram comparadas à um marcador molecular 1Kb (*Sigma-Aldrich*) e foram aplicados no gel com Blue Green Loading Dye I (*LGC Biotechnology*).

Para a PCR quantitativa em tempo real foi utilizado um termociclador StepOne Real Time PCR system (*Applied Biosystems, Life Technologies*). As reações foram feitas com um volume de 20 µL, contendo 2 µL de cDNA, 0,8 µL de cada primer, 6,4 µL de água MilliQ autoclavada e 10 µL Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (*Invitrogen, Life Technologies*).

Foi investigada a eficiência dos primers e averiguado o comportamento das amostras sob cinco pontos de diluição através da Curva de dissociação (Curva de Melt) utilizando o software LinReg e StepOne (*Applied Biosystems*). A Curva de Melting sugere a especificidade da reação para cada seqüência-alvo pesquisada, sendo possível indicar o ponto correspondente à temperatura de dissociação para cada par de primers (Becker et al., 2013).

As condições de amplificação incluíram um ciclo inicial de desnaturação a 105° C por 5 min, seguido de 1 ciclo de 25° C por 5 min (desnaturação), 42° C por 30 min (anelamento) e 85° C por 5 min (alongamento). A contaminação com reagentes foi detectada com um Mix de reação sem amostra (controle negativo). Os dados obtidos foram importados para o Microsoft Excel e analisados utilizando três diferentes aplicativos: geNorm (versão 3.5), NormFinder (versão 0.953) e BestKeeper (versão 1.0). Todas as amostras foram amplificadas em triplicatas biológicas e triplicatas técnicas.

Resultados e Discussão:

Das 3 replicatas de RNA total, foi selecionado para a síntese de cDNA e posterior validação de genes de referência, a amostra que apresentou valores de razão

entre 1.8 e 2.0 (Du et al., 2016) em espectrofotômetro Picodrop, evidenciando que estavam livres de contaminantes como sais, etanol, proteínas e lipídios (Silva et al., 2015).

Com as amostras selecionadas, foram testados em PCR convencional dez pares de primers. No entanto, apenas cinco apresentaram adequada resposta em gel de agarose 1% e desta forma foram submetidos a PCR quantitativa em tempo real (Katherine & Mónica, 2013).

A Curva de Melt e os diferentes softwares citados sugerem que dois dos cinco primers testados em RT-qPCR obtiveram apenas um pico de dissociação. Os genes de referência que apresentaram melhor amplificação foram “Ribossomal Proteína Rpl13” e “β-actina”.

Conclusões:

Os dois pares de primers selecionados pelas técnicas moleculares, obtiveram condições ideais para utilização como gene de referência para minhocas da espécie *Eisenia andrei* em condições de estresse por Cobre.

Referências bibliográficas

Becker CE, Kretzmann NA, Mattos AA de, Veiga ABG da. Melting curve analysis for the screening of hepatitis B virus genotypes A, D and F in patients from a general hospital in southern Brazil. *Arq Gastroenterol.* v. 50.n. 3. 2013.

Bernard F, Brulle F, Douay F, Lemièrre S, Demuyneck S, Vandenbulcke F. Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in *Eisenia fetida*, using an “exposure/depuration” experimental scheme with field soils. *Elsevier: Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 1034-1045. 2010. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.010.

Chen C, Zhou Q, Shuo L, Xiu Z. Acute toxicity, biochemical and gene expression. Responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. *Elsevier: Chemosphere*. 83: 1147-1154. 2011. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.01.006

Domínguez, J. and M. Pérez-Losada. 2010. *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) y *Eisenia andrei* Bouché, 1972 son dos especies diferentes de lombrices de tierra. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, Número Especial 2: 321-331.

Du M, Wang X, Yue YW, Zhou PY, Yao W, Li X, Ding XB, Liu XF, Guo H, Ma WZ. Selection

of reference genes in canine uterine tissues.

Genetics and Molecular Research. 2016. doi:
<http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15028138>

Katherine HGA, Mónica GBM. Comparison of RNA isolation methods for *Potato yellow vein virus* (PYVV) detection by RT-PCR in different organs of *Solanum tuberosum* Group Phureja. **Revista Colombiana de Biotecnología.** Vol. 15. no 1. 2013.

Silva DV, Branco SMJ, Holanda ISA, Royaert S, Motamayor JC, Marelli JP, Corrêa RX. Comparative evaluation of total RNA extraction methods in *Theobroma cacao* using shoot apical meristems. **Genetics and Molecular Research.** 2016. doi:
<http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017364>

Wu S, Zhang H, Zhao S, Wang J, Li H, Chen J. Biomarker responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to phenanthrene and pyrene both singly and combined in microcosms. **Elsevier: Chemosphere.**87: 285-293. 2012. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.11.055