

USO DO DIFFERENTIAL DISPLAY NÃO RADIOATIVO PARA ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA NA DIVISÃO DE TRABALHO DE *Apis mellifera*

USE OF NON RADIOACTIVE DIFFERENTIAL DISPLAY FOR THE STUDY OF WORK DIVISION GENE EXPRESSION IN *Apis mellifera*

Waldesse Piragé de OLIVEIRA-JUNIOR¹; Jaqueline DIAS-OLIVEIRA¹; Luiz Ricardo GOULART¹; Malcon Antônio Manfred BRANDEBURGO¹

RESUMO: A técnica Differential Display (DD), descrita primeiramente em 1992, promoveu um grande avanço nos estudos de expressão gênica em eucariotos, permitindo análises comparativas, isolamento e caracterização de novos genes relacionados aos mais variados processos biológicos. A larga aplicação do DD se deve, principalmente, ao fato de ser uma técnica rápida, fácil e necessitar de pequena quantidade de RNA total. Entretanto, o uso de radioisótopos em uma determinada etapa do DD restringe esse método a laboratórios que tenham áreas específicas para manipular esses reagentes e o torna inviável à grande maioria dos centros de pesquisa existentes no país. Assim, esse trabalho busca adaptar a coloração por nitrato de prata, não radioativa, à técnica do DD; utilizando como modelo biológico a espécie *Apis mellifera* (abelha africanizada). Os resultados têm sido promissores e mostram que a coloração por nitrato de prata é eficiente no DD e pode tornar a técnica mais difundida nos laboratórios nacionais, inclusive aplicada aos estudos de câncer.

UNITERMOS: DDRT-PCR, Expressão gênica, Differential Display, Método não radioativo.

Todos os organismos vivos possuem de milhares a centenas de genes diferentes. Entretanto, paenas uma pequena fração, em torno de 15%, é expressa em uma determinada célula. Portanto, a regulação temporal e espacial da expressão gênica controla os processos vitais como o desenvolvimento; a homeostase, a regulação celular e outros. Assim, uma metodologia capaz identificar e isolar genes expressos diferencialmente, deve permitir: (1) visualizar a grande parte dos RNAs mensageiros (mRNAs) expressos; (2) ter alta reprodutibilidade; (3) permitir a comparação de mRNA de diferentes fontes; (4) gerar informações úteis para identificar e isolar os genes correspondentes, mRNA ou cDNAs; (5) ser rápida e fácil. A técnica “Differential Display”, descrita por Liang e Pardee (1992) Liang et al. (1992, 1993) e posteriormente nomeada DDRT-PCR por Bauer et al. (1993), atende a tais critérios. A estratégia do método consiste em: 1- transcrição reversa usando um grupo de “primers”, oligo d(T), 3' ancorados T₁₂MN (onde M = A, C, ou G e N = A, C, G ou T) que se anelam na cauda poli(A) do mRNA (porção 3'); 2- amplificação das espécies de cDNA de

cada fração, combinando “primers” 5' arbitrários (20 a 26 diferentes) e “primers” 3' ancorados; 3- separação por eletroforese dos fragmentos resultantes; 4- reamplificação, clonagem e sequenciamento dos mesmos; 5- confirmação da expressão diferencial por uma técnica de análise de RNA (*Northern ou slot blotting*). A sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade e baixa necessidade de RNA tornam a técnica muito utilizada (BAUER et al., 1993; LIANG et al., 1992). A partir de todos esses conhecimentos, este trabalho visou otimizar a técnica de *Differential Display* para analisar a expressão gênica diferencial na divisão de trabalho de *Apis mellifera*, com enfoque na utilização da marcação não radioativa por nitrato de prata. Primeiramente, o RNA total foi extraído (Figura 1) e, a partir desse, sintetizou-se o cDNA por transcrição reversa (RT) na presença da enzima transcriptase reversa MMLV-RT, deoxinucleotídios trifosfatos (dNTPs), “primer” 3' ancorado T₁₂MN e inibidor de Rnase. Após a síntese do cDNA realizou-se a amplificação do mesmo por PCR, onde foi definida a combinação de 1 “primer” curto de 10

¹ Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Genética Molecular, Universidade Federal de Uberlândia

Received: 27/11/02 Accept: 06/02/03

pb de seqüências arbitrárias (50 a 60% de bases G e C) e o “primer” oligo d(T) utilizado na RT. Após a amplificação, os produtos foram separados por eletroforese em gel de poli(acrilamida) (19:1–Acrilamida:Bis) 6%, não desnaturante, a 80 Volts por 12 horas. O gel foi então corado conforme Bassam et al. (1991), utilizando solução composta por nitrato de prata, formaldeído e revelado em solução gelada de carbonato de cálcio, formaldeído, tiosulfato de sódio e água. Os fragmentos corados por nitrato de prata e com padrão qualificado para análise, no geral, estavam entre 100 a 900 pares de bases. Algumas alterações na expressão gênica das abelhas, de acordo com sua faixa etária e tipo de trabalho desenvolvido na colméia, puderam ser detectadas (Figura 2). As bandas correspondentes (setas) foram isoladas, clonadas e sequenciadas para caracterizar sua função e relação biológica. O DD associado à coloração por nitrato de prata mostrou-se eficaz em detectar fragmentos diferenciados de cDNA evidenciando

ser uma técnica aplicável em estudos com abelhas ou qualquer material biológico. Atualmente, a técnica DDRT-PCR está sendo utilizada no Laboratório de Genética Molecular-UFU, para a caracterização de alterações no desenvolvimento do câncer de próstata (CaP), podendo, assim, ser utilizada como um método alternativo ao uso de radioisótopos. O *Differential Display* apesar de ser uma técnica rápida e confiável, requer atenção a alguns detalhes. A combinação de “primers” oligo d(T), por exemplo, têm de ser otimizada de acordo com o material biológico utilizado. Já a coloração por nitrato de prata é prática e fácil de utilizar, além de ser mais barata e de menor risco que os radioisótopos, mostrando também bons resultados no CaP. Para compreender e entender melhor a Biologia Molecular faz-se necessária a busca e a descoberta de novas alternativas, que ajudam a difundir o conhecimento. Assim, a técnica do DD / DDRT-PCR pode ser agilizada com “kits” comerciais, mas deve ser adaptada a cada tipo de estudo.

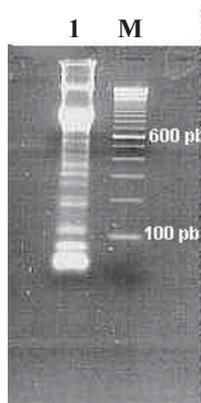


Figura 1 – Padrão RNA total extraído (1). M = marcador 100 pb.

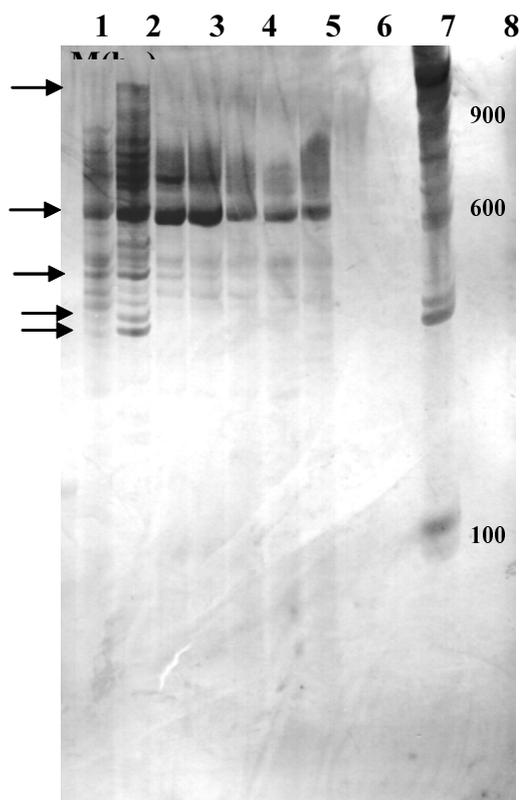


Figura 2. Perfil eletroforético de Differential display com primer oligo-dT (T12GC) e arbitrário OPA 17 (1 a 8). 1 = abelha de 1 dia de vida, 2 = 5 dias, 3 = 10 dias, 4 = 15 dias, 5 = 20 dias, 6 = 25 dias, 7 = 30 dias, 8 = controle negativo. M = marcador de 100bp. Setas indicam fragmentos diferencialmente expressos.

ABSTRACT: Differential Display (DD), described in 1992, promoted a great progress in eukaryotic gene expression studies, allowing comparative analyses, isolation and characterization of new genes related to the most varied biological processes. The wide application of DD is due, mainly, to the fact of being a fast and easy technique and to the small amount of total RNA required. However, the radioisotope use in DD restricts this method to laboratories that have specific areas to manipulate those reagents and makes it unviable to the majority of the research centers in our country. Thus, this work adapted the silver nitrate staining (non radioactive) to the technique of DD using the *Apis mellifera* (africanized honeybee) as a biological model. The results were promising and they showed that the silver nitrate staining is efficient in DD and it can turn the technique more applied the national laboratories.

UNITERMS: DDRT-PCR, Gene expression, Differential Display, Non-radioactive method.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLEES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, New York, v. 196, n. 1, p. 80-83, Jul. 1991.

BAUER, D.; MÜLLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHOF, P.; STRAUSS, M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 4272-4280, Sept. 1993.

LIANG, P.; AVERBOUKH, L.; KEYOMARSI, K.; SAGER, R.; PARDEE, A. B. Differential Display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 52, 24 p. 6966-6968, Dec. 1992.

LIANG, P.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 21, n. 14, p. 3269-3275, July 1993.

LIANG, P.; PARDEE, A. P. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, n. 5072, p. 967-971, Aug. 1992.