

Clonagem do cDNA e sequenciamento parcial do gene que codifica a enzima glutamato desidrogenase hepática de ovino

Cloning of the cDNA and partial sequencing of the gene that codifies the sheep hepatic enzyme glutamate dehydrogenase

Sandra Regina de Mello¹, Kaio César Simiano Tavares¹, Carlos André da Veiga Lima Rosa², Luiz Claudio Miletto^{1*}

Recebido em 14/03/2012; aprovado em 27/03/2013.

RESUMO

A enzima mitocondrial glutamato desidrogenase (GDH: EC 1.4.1.2) catalisa a desaminação reversível do L-glutamato para 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato) usando o NAD⁺ e NADP⁺ como coenzimas. É uma das mais importantes enzimas hepáticas encontradas em hepatócitos de bovinos, ovinos e caprinos. Infecções por *Fasciola* spp., intoxicação grave aguda por toxinas de plantas, tais como *Xanthium* spp. e *Senecio* spp. e intoxicação por cobre resultam na liberação dessa enzima no sangue. O aumento da GDH indica danos ou necrose hepática em bovinos e ovinos. Esta é a enzima de escolha para avaliar a função hepática dos ruminantes. No presente trabalho o cDNA que codifica a enzima GDH do hepatócito de ovino foi sintetizado por meio de RT-PCR utilizando mRNA extraído do fígado de ovino. Parte da região de codificação do cDNA da GDH de ovino foi amplificada por PCR usando oligonucleotídeos iniciadores sintetizados a partir do alinhamento de sequências de ORFs de *Ovis aries*, *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* disponíveis em banco de dados. O cDNA foi clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega) e inserido em células cálcio-competentes de *Escherichia coli* DH10B através de choque térmico. O DNA plasmidial foi purificado e após o sequenciamento a presença de um inserto de 1292 pb foi confirmado.

O alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos com outras espécies revelou alta homologia entre as GDH.

PALAVRAS-CHAVE: glutamato desidrogenase, clonagem do cDNA, sequenciamento.

SUMMARY

The mitochondrial enzyme Glutamate Dehydrogenase (GDH: EC 1.4.1.2) catalyzes the reversible deamination of the L-glutamate for 2-oxoglutarate (α -ketoglutarate) using NAD⁺ and NADP⁺ as coenzymes. It is one of the most important liver enzymes found in hepatocytes of cattle, sheep and goats. Infections by *Fasciola* spp., severe acute intoxication by toxins of plants such as *Xanthium* spp. and *Senecio* spp. as well as intoxication by copper result in the release of this enzyme in blood. The increase of the GDH indicates damage or hepatic necrosis in cattle and sheep. This is an enzyme of choice to evaluate the function of the ruminants. In the present study the cDNA, that codifies the GDH enzyme of the hepatocyte of sheep, was synthesized by means of RT-PCR making use of mRNA extracted from the liver of sheep. Part of the region where the cDNA of the GDH of the ovine is codified was amplified by PCR from primers synthesized through the comparison of the aligned sequences of *Ovis aries*, *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Rattus*

¹ Departamento de Produção Animal e Alimentos, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV/UDESC. Av. Luiz de Camões, 2090, Bairro Conta Dinheiro, CEP 88520-000, Lages, SC, Brasil. Email: miletti@cav.udesc.br. *Autor para correspondência.

² Departamento de Engenharia da Pesca, Centro de Educação Superior da Região Sul, Universidade do Estado de Santa Catarina – CERES/UDESC. Rua Cel. Fernandes Martins, 270, Bairro Progresso, CEP 88790-000, Laguna, SC, Brasil.

norvegicus and *Mus musculus* available in the database. The cDNA was cloned in the vector pGEM®-T Easy (Promega) and inserted in *Escherichia coli* DH10B calcium competent cells by heat shock procedure. The plasmid DNA was purified and after sequencing, the presence of 1292 pb was confirmed. The alignment of the sequence deduced of amino acid with other species revealed high homology among the GDHs.

KEY WORDS: glutamate dehydrogenase, cDNA cloning, sequencing.

INTRODUÇÃO

As enzimas são dispositivos moleculares que determinam padrões em transformações químicas e participam na transformação de um tipo de energia em outro. São extremamente específicas e possuem um grande poder catalítico (BERG et al., 2008). As enzimas em sua maioria são proteínas, algumas catalisam reações em presença de determinadas moléculas denominadas de cofatores iônicos metálicos ou coenzimas orgânicas que funcionam como cosubstratos ligados de modo reversível. São exemplos de cosubstratos, os nucleotídeos pirimídicos NAD⁺ e NADP⁺ (VOET et al., 2008). O estudo das enzimas tem imensa importância prática e clínica, pois em condições anormais pode ocorrer a deficiência ou ausência de uma ou mais enzimas assim como outras condições patológicas podem ser causadas pelo excesso de atividade de uma enzima específica (NELSON e COX, 2006). A utilidade diagnóstica da mensuração das enzimas plasmáticas consiste no fato de que as alterações na sua atividade podem fornecer indicadores sensíveis de lesão ou proliferação celular. Essas modificações auxiliam na detecção e às vezes podem localizar a lesão tecidual e monitorar o tratamento e a progressão da patologia (MOTTA, 2009).

A Glutamato Desidrogenase (GDH : EC 1.4.1.2) catalisa a desaminação reversível do L-glutamato para 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato) usando o NAD⁺ e NADP⁺ como coenzimas

(FISHER, 1985). Esta é uma das mais importantes enzimas hepáticas encontradas em hepatócitos de bovinos, ovinos e caprinos.

A determinação dos níveis séricos das enzimas hepáticas é usada comumente para a detecção e avaliação de doenças hepáticas. A determinação da atividade sérica da enzima glutamato desidrogenase (GDH) é indicada para avaliar necrose hepática em ovinos, caprinos e bovinos (SANTOS et al., 2008).

Na ovinocultura são importantes fatores de lesão hepática, as doenças parasitárias, plantas tóxicas e por intoxicação por metais.

A fasciolose é uma das doenças parasitárias de maior importância em animais de interesse econômico no mundo. Sua importância se deve, principalmente, às perdas associadas com condenações de fígados, mortalidade, redução em produção de carne, lã e leite, às infecções bacterianas secundárias, à interferência com a fertilidade e aos custos com tratamentos anti-helmínticos. O desenvolvimento da infecção por *F. hepatica* em bovinos raramente provoca a morte destes, porém em ovinos a mortalidade pode atingir índices que variam entre 15 e 20%. Justifica estes índices o fato dos bovinos desenvolverem uma gradual resistência às infecções enquanto que os ovinos são altamente sensíveis (ECHEVARRIA, 2004). Cunha et al. (2007) relata que a fasciolose ovina é prevalente no Rio Grande do Sul, acarretando perdas para os produtores, matadouros-frigoríficos e para o Estado. Molina et al. (2006) relata a liberação de enzimas hepáticas, como a glutamato desidrogenase em níveis elevados no caso de infecções por *Fasciola* spp. em ovinos. Raadsma et al. (2006) observaram no seu estudo que no plasma dos grupos infectados por *F. gigantica* os níveis de GDH estavam elevados, comparando com os grupos não infectados e nos grupos infectados por *F. hepatica* encontrou níveis quatro vezes mais elevados de GDH em relação aos grupos infectados por *F. gigantica*.

As principais plantas que apresentam toxinas hepáticas e que causam intoxicação em ovinos são *Xanthium* spp. e *Senecio* spp. (PUGH, 2004). Os principais fatores determinantes para indicar a

frequência e ocorrência dos casos de intoxicação por plantas tóxicas em animais, entre eles os ovinos são: a palatabilidade, disponibilidade da espécie tóxica e a fome (BARBOSA et al., 2007; COSTA et al., 2009).

Ilha et al. (2001) descreveram a ocorrência de um surto de intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* em ovinos no município de Mata, região central do Rio Grande do Sul, em meados de janeiro de 1997. O rebanho consistia de um total de 94 ovinos, onde permaneceram durante 7 meses (de junho de 1996 a janeiro de 1997) em piquetes de pastagem nativa onde havia uma grande quantidade de *S. brasiliensis*, dos quais 51 (54,25%) animais adoeceram e 50 (53,2%) morreram.

Segundo Haraguchi (2003), “no Brasil, devido à carência de dados sobre a frequência das causas de mortalidade em diversos estados, é difícil estimar as perdas por morte dos animais ocasionadas pelas plantas tóxicas”. Porém, dados obtidos do Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas mostraram que, no Rio Grande do Sul, as mortes de ovinos por plantas tóxicas representaram 7,2% das mortes nesta espécie.

Segundo Ávila et al. (2006), a intoxicação por cobre ocorre principalmente quando os animais pastam em locais cujos vegetais e terrenos foram tratados com sulfato de cobre ou pelo consumo de plantas retentoras de cobre (*Heliotropum europeu*, *Senecio* spp., *Echium plantagineum*), ou drogas antiparasitárias ou substâncias que contém cobre usadas para erradicação de caracóis. Riet-Correa et al. (1989) relataram que no Rio Grande do Sul foi observada a intoxicação crônica por cobre em ovinos confinados e alimentados com rações que apresentavam quantidades excessivas de cobre.

Os ovinos afetados demonstram características clínicas associadas com insuficiência hepática e a intoxicação por cobre pode ser avaliada por métodos laboratoriais específicos (HEADLEY, 2008).

Este trabalho teve por objetivo completar a sequência do gene *gdh* de ovinos e comparar a sequência de aminoácidos da GDH deduzida para avaliar a homologia com a GDH de outras

espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores do Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC.

Foram coletados fragmentos de fígado de ovino após abate em frigorífico. As amostras foram acondicionadas em criotubos e transportadas e armazenadas em nitrogênio líquido para posterior extração do RNA. As soluções foram preparadas com água Milli-Q previamente tratada com DEPC 0,1%. Para a extração de RNA total, fragmento do fígado de aproximadamente 100 mg de tecido foi homogeneizado vigorosamente com 1 mL do reagente Trizol® (Invitrogen). Após a lise das células, o RNA foi extraído com 200 µL de clorofórmio sendo as amostras agitadas por 15 segundos, incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente e a seguir centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos. À fase aquosa resultante foram adicionados 500 µL de isopropanol 98%, e a fase orgânica desprezada. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 g e o sobrenadante descartado, o sedimento lavado com 1ml de etanol 75% e centrifugado a 7.500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e inverteu-se o tubo sobre papel absorvente à temperatura ambiente para evaporação do etanol. O RNA foi eluído em 100 µl de água ultrapura tratada com DEPC, livre de RNase. Os estoques de RNA foram mantidos a -80°C. A qualidade do RNA foi analisada com base na relação da absorbância 260/280 nm e na visualização do RNA após eletroforese em gel de agarose 1% em TBE livre de RNase. A partir deste produto foi utilizada a técnica de RT-PCR com o kit Proto Script® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis® (BioLabs) para obtenção do DNA complementar (cDNA). A região de codificação do gene *gdh* de ovinos foi amplificada por PCR a partir do cDNA obtido anteriormente, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos sintetizados a partir do alinhamento múltiplo entre a sequência de *Ovis aries*

(GeneBank- acesso número AY102935) presente no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), e as sequências de *gdh* de *Bos taurus* (GeneBank-NM182652), *Homo sapiens* (GeneBank-M20867), *Rattus norvegicus* (GeneBank-X14044) e *Mus musculus* (GeneBank-BC057347). Pela análise verificou-se a ocorrência de regiões bastante conservadas e regiões variáveis, o que possibilitou a construção de três conjuntos de oligonucleotídeos a seguir P1 (F1 5' CCG CTT GTG GCC ATG TAC CGC 3') e (R1 5'TAC CTC CCT TGC AGG GCG TGC 3') P2 (F2 5'GGA AGT CAT TGA GGG CTA CCG 3') e (R2 5'CCT CCA AGA TGC TYCC TTC ATA 3') P3 (F3 5' CCC AAA GGA ACT GGA AGA CTTC 3') e (R3 5' CTA TGT GAA GGT CAAC RCC AGC 3') que foram utilizados na amplificação de parte do gene de interesse. Os parâmetros para as reações de amplificação foram: um ciclo de 94° por 5 min., 35 ciclos de 94° por 1 min., 58° por 1 min. e 72° por 1 min., um ciclo de 72° por 10 min. Os produtos de PCR correspondentes aos fragmentos P2 e P3 foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e visualizados com luz UV. O produto de PCR foi clonado com o emprego do pGem®-T Easy Vector System (Promega). O produto da ligação foi utilizado para a transformação de bactérias cálcio-competentes *E.coli* DH10B através de choque térmico e a seguir as bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina, IPTG e X-gal e incubadas a 37° durante 12-18 horas. Para os clones que apresentaram o inserto foi feita a purificação do DNA plasmidial utilizando o kit QIAquick Gel Extraction® (Qiagen) a partir de culturas bacterianas crescidas em 4 mL de meio LB contendo ampicilina (100µg/mL) e incubadas a 37° por 14 horas. Para confirmar o procedimento, realizou-se eletroforese em gel de agarose a 1% com o produto de extração do plasmídeo. Com o produto de extração contendo o fragmento de interesse, a amostra foi sequenciada através do equipamento MegaBace 1000® DNA Analysis System® (GE/Amersham Biosciences) realizadas na presença de 5,0 pmol dos iniciadores pGEM-F e EXCEL-R e 800 ng de DNA plasmidial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O RNA total do fígado de ovino, *Ovis aries*, foi extraído e apresentando um padrão esperado quando da sua análise em gel de agarose a 1%, isto é, a presença de duas bandas correspondente ao RNA ribossomal 28S e 18S e uma “nuvem” correspondente ao RNA mensageiro (Figura 1). A banda 28S rRNA aparece mais abundante que a banda 18S rRNA, indicando assim que pouca ou nenhuma degradação do RNA ocorreu durante a extração.

A análise obtida do produto da amplificação para o gene *gdh* por PCR foi resolvida por eletroforese em gel de agarose 1% e correspondeu ao tamanho de aproximadamente de 734 pb para o fragmento P2 e 646 pb para o fragmento P3 (Figura 2). Para a amplificação do fragmento P1, foram realizadas várias reações de PCR utilizando concentrações variáveis de MgCl₂ (1,5 a 3,5 mM) e diferentes temperaturas de anelamento (56, 58, 59, 61 e 65°C), mas não foi possível obter o produto da amplificação que deveria apresentar um tamanho de 509 pb.

As bandas correspondentes aos fragmentos de interesse (P2 e P3) foram recortadas do gel, purificadas com o Kit QIAquick Gel Extraction® (Qiagen) e em seguida clonadas com o kit pGem®-T Easy Vector System (Promega). As células transformadas foram selecionadas, adicionadas

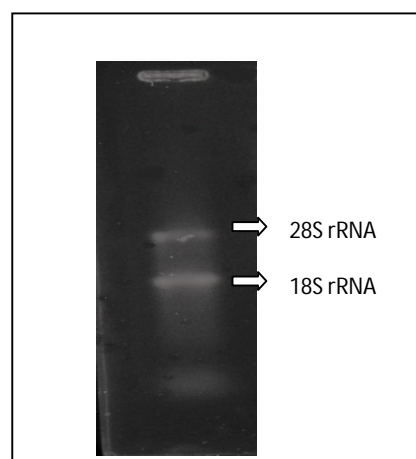


Figura 1 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do RNA total. Presença das bandas 28S e 18S rRNA .

à reação de PCR. O produto da amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas visualizadas pelo brometo de etídeo. Na figura 3 observa-se o resultado obtido após reação de PCR realizada a partir de colônia selecionada proveniente da clonagem. Nota-se um fragmento de aproximadamente 934pb (P2) que indica a presença do inserto no plasmídeo e o fragmento de 200 pb que está relacionado à ausência do inserto de interesse e corresponde à amplificação da região flanqueadora do plasmídeo.

Na figura 4 observa-se o fragmento P3 de aproximadamente 846 pb com o inserto inserido no plasmídeo e o fragmento de 200 pb que corresponde a amplificação da região flanqueadora do plasmídeo.

Três clones de cada fragmento que apresentaram sucesso na transformação foram selecionados para a extração de DNA plasmidial e posterior sequenciamento. Foi obtida uma sequência de nucleotídeos correspondente ao fragmento P2 com 734 pb e P3 com 648 pb. A sequência dos fragmentos P2 e P3 foram unidas, sendo a parte sobreposta entre os dois fragmentos retirada. Portanto, obteve-se um fragmento de 1292 pb. Timmerman et al. (2003) descreveram uma sequência de nucleotídeos parcial de 443 pb. Desta sequência, os 189 pb iniciais foram acrescentados aos 1292 pb obtendo uma

sequência parcial de nucleotídeos 1481 pb. Esta sequência tem um tamanho próximo da sequência de bovinos que apresenta 1689 pb, conforme descrito na figura 5.

Para determinação da sequência deduzida de aminoácidos do gene da enzima GDH de ovino foi utilizada o programa “ProtParam” do Instituto Suíço de Bioinformática (disponível em <http://expasy.org/tools/protparam.html>). Uma análise comparativa das sequências de aminoácidos foi realizada através do programa Clustal W (versão CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignment) entre as sequências de aminoácidos da GDH de algumas espécies como *Homo sapiens* (gi|25303963), *Mus musculus* (gi|30931187) e *Bos taurus* (gi|32880221). Como pode ser observado na figura 6, utilizamos para a comparação uma proteína truncada que foi resultada da tradução em um dos frames dos nucleotídeos obtido anteriormente e observa-se no alinhamento a falta de resíduos iniciais.

A análise da identidade da sequência de aminoácidos foi realizada utilizando-se o programa BLAST. O alinhamento múltiplo mostra um alto grau de similaridade com as sequências de aminoácidos da GDH das espécies: *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Bos taurus*. Com *Bos taurus* apresentou uma similaridade de 97%, e 96% com *Homo sapiens* e *Mus musculus*.

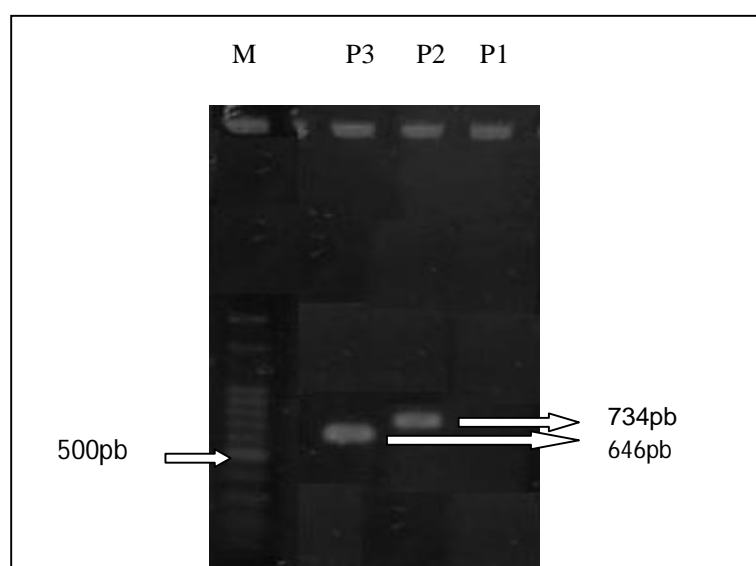


Figura 2 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do gene *gdh* de fígado de ovino com iniciadores específicos (P1, P2 e P3). M-marcador de tamanho molecular (Ladder 100 pb).

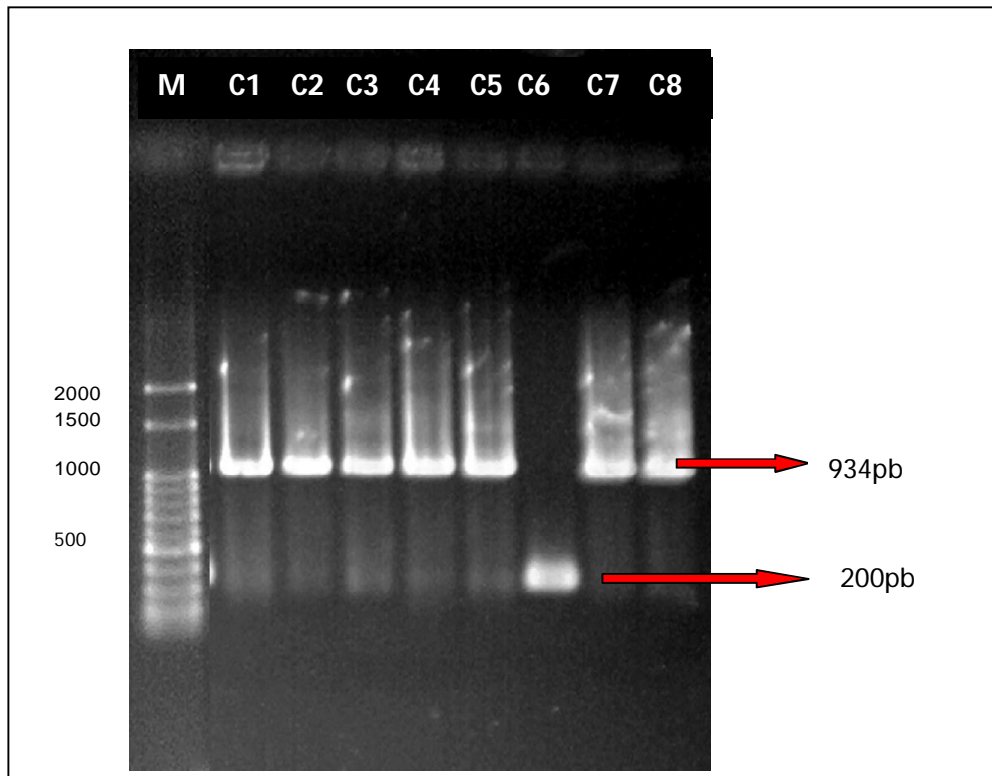


Figura 3 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação dos clones transformantes. M-marcador de tamanho molecular (Ladder 100 pb), C6 representa o plasmídeo sem o inserto. C1 a C5 e C7 e C8 representam o fragmento P2 de 934 pb inserido no plasmídeo.

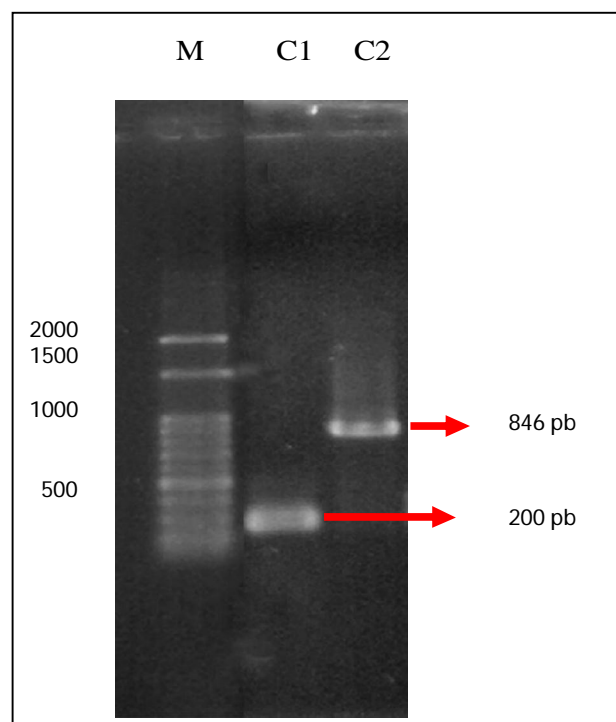


Figura 4 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação dos clones transformantes. M-marcador de tamanho molecular (Ladder 100 pb), C1 representa o plasmídeo sem o inserto. C2 representa o fragmento P3 de 846 pb inserido no plasmídeo.



Figura 5 – Alinhamento usando Clustal W da sequência do gene *gdh* de bovino (gi|32880220) com a sequência parcial de nucleotídeos da região que codifica o gene enzima GDH de ovino com 1481 pb (seq. ovino). As sequências realçadas correspondem aos 189 pb iniciais acrescido aos 1292 pb. O * representam regiões de similaridade entre os nucleotídeos. (Continua....)

| | | |
|-------------|---|------|
| gi 32880220 | CCAGGGTTGGAGATAAAACATTTGTTGTTTTCAGGGATTGGTAATGTGGGCTTACACTCT | 960 |
| seq.ovino | CCAGGATTGGAGATAAAACATTTGCGGTTTCAGGGATTGGTAATGTGGGCTTGCCTACTCT | 751 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | ATGAGATATTTACATCGTTTTGGTGCTAAATGTATGCTGTTGGTGAGTCTGATGGGAGT | 1020 |
| seq.ovino | ATGAGATATTTACATCGTTTTGGTGCTAAATGTGTTGCTGTTGGTGAGTCTGATGGCAGC | 811 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | ATATGGAATCCAGATGGTATTGACCCAAAGGAAGTGAAGACTTCAAATTGCAACATGGA | 1080 |
| seq.ovino | ATATGGAATCCAGATGGTATTGACCCAAAGGAAGTGAAGACTTCAAATTGCAACATGGA | 871 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | ACAATCCTGGGCTTTCCCAAAGCAAAGATCTATGAAGGGAGCATCTTGAGGTTGACTGT | 1140 |
| seq.ovino | ACAATCCTGGGCTTTCCCAAAGCAAAGATCTATGAAGGAAGCATCTTGAGGTTGACTGT | 931 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | GACATACTAATCCCTGCTGCCAGCGAGAAGCAGCTGCCCAAGTCCAATGCACCCCGAGTC | 1200 |
| seq.ovino | GACATACTGATCCCTGCCAGCGAGAAGCAGCTGACCAGGTCCAACGCGCCAGAGTG | 991 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | AAAGCCAAGATCATTGCTGAAGTGCCAACGACCGACAACCTCCAGAAGCTGATAAGATT | 1260 |
| seq.ovino | AAAGCCAAGATCATTGCTGAAGTGCCAACGACCAACAACCTCCAGAAGCTGATAAGATT | 1051 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | TTCTTAGAGAGGAACATTATGGTTATTCCAGATCTCTACCTGAATGCTGGAGGAGTGACA | 1320 |
| seq.ovino | TTCTTAGAGCGGAACATCATGGTTATCCAGACCTCTACTTGAATGCTGGGGAGTGACA | 1111 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | GTGTCTTACTTTGAGTGGCTGAATAATCTAATCATGTACAGTACGGTCGTTTGACCTTC | 1380 |
| seq.ovino | GTGTCTTACTTTGAGTGGCTGAAGAATCTGAATCAGTACAGTATGGTCGTTTGACCTTC | 1171 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | AAATATGAAAGGGATTCTAACTACCACTTGCTTATGTCTGTTCAAGAGAGTTGGAAAGG | 1440 |
| seq.ovino | AAATATGAAAGGGATTCTAACTACCACTTGCTTATGTCTGTTCAAGAGAGTTGGAAAGG | 1231 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | AAATTTGAAAACATGGTGGAACTATTCCTATTGTACCCACAGCAGAGTTCCAAGACAGG | 1500 |
| seq.ovino | AAATTTGAAAACATGGTGGAACTATTCCTATTGTACCCACAGCAGAGTTCCAAGACAGG | 1291 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | ATATCGGGTGCTCTGAGAAAGACATCGTGCCTCTGGTTTAGCTTACACCATGGAGCGC | 1560 |
| seq.ovino | ATATCGGGTGCTCTGAGAAAGACATCGTGCCTCTGGTTTAGCTTACACCATGGAGCGC | 1351 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | TCTGC-CAGGCAAATCATGCGCACGGCCATGAAGTATAACCTGGGGCTGGACCTGAGAAC | 1619 |
| seq.ovino | TCTGCCTCAGGCAAATCATGCGCACGGCCATGAAGTATAACCTGGGGCTGGACCTGAGAAC | 1411 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | GGCCGCTACGTCAACGCCATCGAGAAGGTCTTCAGGGTGTAACAACGAGGCTGGCGTGAC | 1679 |
| seq.ovino | GGCCGCTACGTCAACGCCATCGAGAAGGTCTTCAGGGTGTAACAATGAAGCTGGGTGTGAC | 1471 |
| | *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***** | |
| gi 32880220 | CTTCACATAG | 1689 |
| seq.ovino | CTTCACATAG | 1481 |
| | ***** | |

Figura 5 – Alinhamento usando Clustal W da sequência do gene *gdh* de bovino (gi|32880220) com a sequência parcial de nucleotídeos da região que codifica o gene enzima GDH de ovino com 1481 pb (seq. ovino). As sequências realçadas correspondem aos 189 pb iniciais acrescido aos 1292 pb. O * representam regiões de similaridade entre os nucleotídeos.

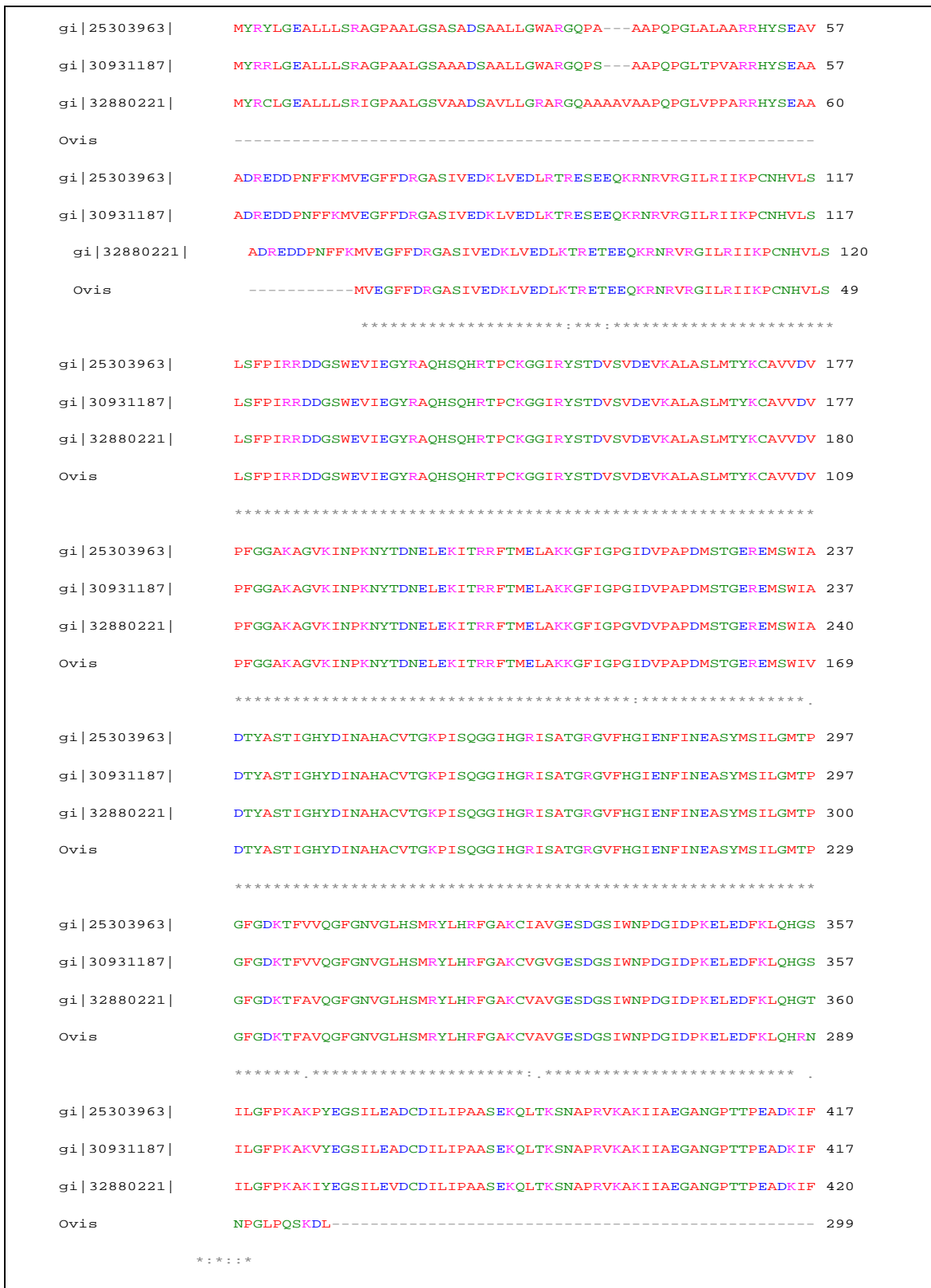


Figura 6 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima GDH de *Homo sapiens* (gi|25303963) *Mus musculus* (gi|30931187), *Bos taurus* (gi|32880221) com a sequência parcial de ovino. “*” indica que os resíduos de aminoácidos são idênticos nas quatro sequências alinhadas, “.” indica existência de substituições conservativas, “.” indica existência de substituições semi-conservativas.

CONCLUSÕES

A amplificação do produto de RT-PCR do gene GDH gerou os dois fragmentos. A ligação do produto de amplificação de PCR ao plasmídeo kit pGem[®]-T Easy Vector System (Promega) e a transformação em células competentes permitiu obter clones contendo cDNA para a GDH. Os clones que apresentaram sucesso na transformação foram sequenciados. O resultado obtido foi uma sequência de nucleotídeos correspondente ao fragmento P2 (734 pb) e o P3 (648 pb), as sequências foram unidas e a parte sobreposta entre os fragmentos retirada. É importante destacar que neste trabalho foi obtida uma sequência de 1292 pb, e destes, 1038 pb correspondem a nova sequência determinada, que apresenta tamanho maior que a descrita na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, V.S. de. et al. **Saúde ovina em Santa Catarina-prevenção e controle**. Florianópolis: Epagri, 2006. 94p.
- BARBOSA, R.R. et al. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.1, p.1-7, 2007.
- BERG, J.M. et al. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1114p.
- COSTA, F.M. et al. Riscos de Intoxicação de Animais na Pecuária, por Plantas Tóxicas: uma revisão bibliográfica. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9., 2009, São Lourenço, **Anais...** São Lourenço, 2009.
- CUNHA, F.O.V. et al. Prevalence of slaughter and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 2000 and 2005. **Parasitologia latinoamericana**, Santiago, v.62, p.188-191, 2007.
- ECHEVARRIA, F.A.M. Fasciolose. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13, p. 100-102, 2004.
- FISHER, H. F.L.- Glutamate Dehydrogenase from Bovine Liver. **Methods in Enzymology**, v.113, p.16-27, 1985.
- HARAGUCHI, M. Plantas Tóxicas de Interesse na Pecuária. **Instituto Biológico**. São Paulo, v.65, p.37-39, 2003.
- HEADLEY, S.A., et al. Chronic copper poisoning in sheep from Northern Paraná, Brazil: case report. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, p.179-184, 2008.
- ILHA, M.R.S. et al. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.21, p.123-138, 2001.
- MOLINA, E. C. et al. The relationship between haematological indices, serum gamma-glutamyl transferase and glutamate dehydrogenase, visual hepatic damage and worm burden in cattle infected with *Fasciola gigantica*. **Journal of Helminthology**, London, v.80, p.277-279, 2006.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009. 382p.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios da bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.
- PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. 513p.
- RAADSMA, H.W. et al. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.143, p.275-286, 2007.
- RIET - CORREA, F. et al. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.9, p.51-54, 1989.
- SANTOS, J.C.A. et al. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.28, p.1-14, jan. 2008.
- TIMMERMAN, M. et al. Induction of Glutamate Dehydrogenase in the Ovine Fetal Liver by Dexamethasone Infusion during Late Gestation. **Society for Experimental Biology and Medicine**, n.228, p.100-105, 2003.
- VOET, D.; et al. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 1264p.