

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

SANDRA REGINA DE MELLO

**CLONAGEM DO cDNA E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO
GENE QUE CODIFICA A ENZIMA GLUTAMATO DESIDROGENASE
HEPÁTICA DE OVINO**

LAGES, SC

2011

SANDRA REGINA DE MELLO

**CLONAGEM DO cDNA E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO
GENE QUE CODIFICA A ENZIMA GLUTAMATO DESIDROGENASE
HEPÁTICA DE OVINO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Profº: Dr. Luiz Cláudio Miletti.

LAGES, SC

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Mello, Sandra Regina de
Clonagem do cDNA e sequenciamento parcial do gene que codifica a
enzima glutamato desidrogenase hepática de ovino / Sandra Regina de
Mello ; orientador: Luiz Claudio Miletto. – Lages, 2011.
51f.

Inclui referências.
Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias /
UDESC.

1. Glutamato desidrogenase. 2. Clonagem do cDNA.
3. Sequenciamento. I. Título.

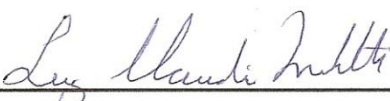
CDD – 636.0821

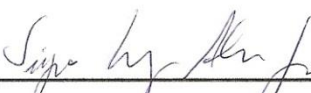
SANDRA REGINA DE MELLO

CLONAGEM DO cDNA E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA GLUTAMATO DESIDROGENASE HEPÁTICA DE OVINO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

BANCA EXAMINADORA

Orientador: 
Profº :Dr. Luiz Cláudio Miletto
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro: 
Profº: Dr. Sérgio Luiz Alves Junior
Universidade Federal da Fronteira Sul

Membro: 
Profº:Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, SC, 01 de junho de 2011

À minha família: meu esposo
Angelo e meus filhos Lucas e
Rafael, por todo apoio, amor,
carinho e compreensão...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

É bom fazer alguma vez uma pausa no meio da caminhada. Repensar à distância percorrida. Debruçar-se sobre o horizonte que se descortina à nossa frente.

Ao olharmos essa longa caminhada, podemos exclamar com gratidão: “até aqui nos conduziu o SENHOR!” Não chegamos a uma meta, mas ao fim de uma etapa. As seguintes deverão ser traçadas, como até agora, no diálogo constante com os amigos e professores. Eles são os verdadeiros inspiradores de nosso trabalho.

Agradeço a Deus por ter dado-me esta oportunidade e por nos mostrar que só realizamos aquilo que ele deseja.

Em especial à minha família, por ter me ajudado no que foi possível, dando seu apoio, muitas vezes em detrimento de seus afazeres.

Aos meus pais, por todo apoio e por sempre terem sido um exemplo de trabalho e dedicação para alcançar os objetivos.

Ao prof^o. Dr. Luiz Cláudio Miletto, agradeço pela orientação para realização deste trabalho, pela confiança, amizade, apoio e pela oportunidade de crescimento profissional.

Agradeço ao prof^o. Carlos André da Veiga Lima Rosa, por suas sugestões e ensinamentos.

Ao Kaio César Simiano Tavares pela sua disponibilidade e competência na realização de procedimentos que facilitaram a realização deste trabalho.

Agradeço também, aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica, que sempre estiveram prontos a me ajudar e compartilharam desta jornada.

A todos em enfim, que direta ou indiretamente contribuíram no meu trabalho, o meu agradecimento sincero.

RESUMO

MELLO, Sandra Regina. **Clonagem do cDNA e sequenciamento parcial do gene que codifica a enzima Glutamato Desidrogenase hepática de ovino**. 2011. 52 f Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2011.

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 enzima alostérica complexa que consiste em seis subunidades idênticas sendo sua atividade influenciada tanto pelo ADP, seu modelador positivo, como pelo GTP, seu modelador negativo. É uma das mais importantes enzimas hepáticas encontradas em hepatócitos de bovinos, ovinos e caprinos. Infecções por *Fasciola spp* ou 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 a partir de oligonucleotídeos iniciadores sintetizados através da comparação das sequências alinhadas de *Ovis aries* com de *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* disponíveis em banco de dados, onde foram identificadas regiões bastante conservadas e regiões variáveis. O cDNA foi clonado no vetor pGEM[®]-T Easy Vector Systems e inserido em células 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.

ABSTRACT

MELLO, Sandra Regina. **Cloning of the cDNA and partial sequencing of the gene that codifies the sheep hepatic enzyme Glutamate Dehydrogenase**. 2011. 51 f Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2011.

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 a complex allosteric enzyme that consists of six identical subunits being its activity influenced by both, the ADP its positive modulator, and by the GTP, its negative modulator. It is one of the most important liver enzymes found in hepatocytes of cattle, sheep and goats. Infections by *Fasciola spp* or 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 the 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* with those of the *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* and *Mus musculus* available in the database, where highly conserved regions, as well as variable regions were identified. The cDNA was cloned in the vector pGEM[®]-T Easy Vector Systems and inserted in competent cells of the *Escherichia coli* DH10B by means heat shock. The plasmid DNA was purified and after sequencing, the presence of an insert of 1292 pb was confirmed. The alignment of the sequence deduced of amino acid with other species revealed high homology among the GDH.

Key-words: Glutamate dehydrogenase. cDNA cloning. Sequencing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Reação catalisada pela glutamato desidrogenase. Empregando o NAD^+ e NADP^+ como cofatores e regulada alostericamente por GTP e ADP. Adaptado: Lehninger,1995.22
- Figura 2 - Plasmídeo pGEM-T Easy® (Promega). Mapa do vetor utilizado para clonagem dos fragmentos de cDNA30
- Figura 3 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do RNA total. Presença das bandas 28S e 18S rRNA35
- Figura 4 - Alinhamento usando Clustal W de sequências do gene *gdh* de várias espécies de animais. As sequências realçadas correspondem à localização dos iniciadores desenhados. O * representam regiões de similaridade entre os nucleotídeos.36
- Figura 5 - 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 100pb).....39
- Figura 6 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação dos clones transformantes. M-marcador de tamanho molecular (Ladder 100pb), C6 representa o plasmídeo sem o inserto. C1 a C5 e C7 e C8 representam o fragmento P2 de 934pb inserido no plasmídeo.41
- Figura 7 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1%.do produto de amplificação dos clones transformantes. M-marcador de tamanho molecular (Ladder 100pb), C1 representa o plasmídeo sem o inserto. C2 representa o fragmento P3 de 846 pb inserido no plasmídeo.42
- Figura 8 – 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.43
- Figura 9 - 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-conservativas45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes da reação de síntese de cDNA	27
Tabela 2 - Oligonucleotídeos senso e anti-senso utilizados nas reações de PCR....	27
Tabela 3 - Componentes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	28
Tabela 4 - Programa da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).	29
Tabela 5 - Componentes da ligação dos fragmentos de DNA no Vetor.	30
Tabela 6 - Programa da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).	32
Tabela 7 - Programa da Reação de Sequenciamento.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP,dTTP)
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
GDH	Glutamato Desdrogenase
GTP	Guanosina trifosfato
kDa	Kilodaltons
kV	Quilovolts
LB	Lúria-Bertani
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo(forma oxidada)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase

pmol	Picomol
q.s.p	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
Tm	Temperatura média de desnaturação de fitas de DNA
TBE	Tris-Borato-EDTA
U	Unidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro
UV	Ultra violeta
V	Volt
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1 ENZIMAS.....	13
1.2 APLICAÇÕES CLÍNICAS DAS ENZIMAS.....	14
1.3 FUNÇÃO HEPÁTICA.....	15
1.3.1 Lesões hepáticas e avaliação da função hepática.....	17
1.3.1.1 Intoxicação por cobre.....	17
1.3.1.2 Plantas tóxicas.....	18
1.3.1.3 Parasitoses.....	19
1.4 ENZIMAS HEPATO-ESPECÍFICAS.....	20
1.5 GLUTAMATO DESIDROGENASE.....	22
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL.....	25

3.2 QUANTIFICAÇÃO DE RNA.....	26
3.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	26
3.4 SÍNTESE DE cDNA	26
3.5 AMPLIFICAÇÕES DO GENE <i>gdh</i> POR PCR	27
3.6 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR	29
3.7 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA.....	29
3.7.1 Ligação no vetor.....	29
3.7.2 Transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	31
3.7.3 Análise por PCR das colônias transformantes	31
3.8 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL	32
3.9 SEQUENCIAMENTO	33
3.9.1 Análise da Qualidade das Sequências.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	35
4.2 ANÁLISE DA SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR POR PCR	35
4.3 ANÁLISE DE COLÔNIAS TRANSFORMANTES POR PCR.....	41
4.4 SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL	42
4.5 SIMILARIDADE ENTRE AS GDH DE ALGUMAS ESPÉCIES DE ANIMAIS.....	45
5 PERSPECTIVAS.....	48
6 REFERÊNCIAS.....	49

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ENZIMAS

Catalisadores em sistemas biológicos, as enzimas, são dispositivos moleculares que determinam padrões em transformações químicas e participam na transformação de um tipo de energia em outro. As enzimas aceleram a velocidade das reações, diminuindo a energia livre de ativação das reações químicas e conseqüentemente facilitam a formação do estado de transição. (BERG et al., 2008).

As enzimas em sua maioria são proteínas. Somente algumas moléculas de ácidos ribonucléicos (RNA), conhecidas como as ribozimas, possuem atividade enzimática e entre essas, o RNA ribossomal que catalisa a formação de ligações peptídicas entre os aminoácidos (VOET et al., 2008)

As enzimas são extremamente específicas e possuem um grande poder catalítico. A eficiência da catálise ocorre pela formação de um complexo enzima-substrato (ES). Os substratos são ligados a uma região específica da enzima denominada de centro ativo ou sítio ativo. O centro ativo é uma fenda tridimensional formada por grupamentos de diferentes partes da sequência de aminoácidos que participam na geração e na quebra de ligações (BERG et al., 2008).

Algumas enzimas catalisam reações em presença de determinadas moléculas denominadas de co-fatores iônicos metálicos ou coenzimas orgânicas que funcionam como co-substratos ligados de modo reversível. São exemplos de co-substratos, os nucleotídeos pirimídicos NAD^+ e NADP^+ . Outros co-fatores, como grupos prostéticos estão associados permanentemente as suas proteínas por meio de ligações covalentes (VOET et al., 2008).

As coenzimas não podem ser sintetizadas pelas células animais, seus precursores são derivados das vitaminas. Atuam como transportadoras intermediárias de grupos funcionais, átomos ou elétrons. Os nucleotídeos pirimídicos NAD^+ e NADP^+ são coenzimas das reações óxido-redução (desidrogenases). Nas suas formas oxidadas (NAD^+ e NADP^+) sofrem redução reversível devido à oxidação

do substrato e o nucleotídeo oxidado recebe íon hidreto (H^-) e transformando-os em formas reduzidas, NADH e NADPH (DÍAZ GONZÁLEZ, 2006).

Algumas das enzimas que participam do metabolismo são reguladoras, denominadas de alostéricas. São reguladas por modificações não-covalentes (ligação de efetadores alostéricos positivos ou negativos) e apresentam estruturas oligoméricas, compostas de várias cadeias polipeptídicas cada uma com sítio ativo (MARZZOCO e TORRES, 2007; DEVLIN, 2002). Em função da ação das enzimas reguladoras, os sistemas enzimáticos são altamente organizados de forma a produzir uma atuação harmoniosa das atividades metabólicas, necessárias para manter a vida (NELSON e COX, 2006).

1.2 APLICAÇÕES CLÍNICAS DAS ENZIMAS

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 maior parte das enzimas é sintetizada e funciona intracelularmente, de forma que elas são encontradas em concentrações mais altas no interior das células (DÍAZ GONZÁLEZ 2006). Níveis baixos de enzimas normalmente aparecem no plasma, refletindo o equilíbrio entre a liberação das mesmas durante a renovação celular normal e seu catabolismo (KERR, 2003). Danos celulares, tais como lesão, ruptura ou necrose das células pode levar a aumentos significativos da atividade das enzimas, o que torna possível inferir a localização e o grau do dano celular. Assim, em lesões tissulares severas ocorre a elevação da atividade de enzimas mitocondriais e em lesões menores aparece atividade de enzimas citoplasmáticas ou de membranas. Em uma extensão menor, a ocorrência de proliferação celular também pode levar ao aumento plasmático das enzimas.

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).

1.3 FUNÇÃO HEPÁTICA

O fígado é o maior órgão interno, sendo complexo em estrutura, função e patologia (HENDRIX, 2005). O fígado corresponde a 2- 5 % do peso corporal sendo que as numerosas e variadas funções hepáticas são desempenhadas por dois tipos celulares: o hepatócito e a célula de Kupffer (LOPES et al., 2007).

As funções hepáticas incluem metabolismo de aminoácidos, carboidratos e lipídeos.

O fígado desempenha papel essencial no metabolismo dos aminoácidos presentes nas células animais. Os aminoácidos originam-se das proteínas exógenas e das proteínas endógenas. O conjunto de aminoácidos é utilizado para síntese de proteínas ou outras moléculas que contenham nitrogênio (MARZZOCO e TORRES, 2007). Muitos aminoácidos são sintetizados por vias metabólicas presentes somente em plantas e em microrganismos. Os mamíferos obtêm aminoácidos através da dieta, chamados de aminoácidos essenciais. Os outros aminoácidos podem ser sintetizados a partir de intermediários comuns, sendo denominados aminoácidos não-essenciais (VOET et al., 2008). A primeira etapa na degradação dos aminoácidos é a remoção de α -amina a um α -cetoácido por reação de transaminação que têm como coenzima o piridoxal fosfato. A amina α de muitos aminoácidos é canalizada para o α -cetoglutarato, formando o glutamato que sofre a desaminação oxidativa gerando um íon amônio. Parte deste íon é consumida na biossíntese de compostos nitrogenados e o excesso é convertido em uréia, pelo ciclo da uréia nos animais ureotélicos (BERG et al., 2008). A formação de uréia nos hepatócitos é o meio pelo qual o organismo excreta os produtos residuais nitrogenados. A produção de α -cetoácidos é importante na síntese de lipídios a partir de aminoácidos cetogênicos e na síntese de carboidratos de aminoácidos glicogênicos (LOPES et al., 2007). A cadeia carbônica dos aminoácidos é oxidada em piruvato, acetil-CoA ou um intermediário do ciclo do ácido cítrico (BERG et al., 2008).

No metabolismo de carboidratos, o fígado remove dois terços da glicose do sangue, que é absorvida e transformada em glicose 6-fosfato pela glicoquinase específica do fígado. A maior parte a glicose 6-fosfato é convertida a glicogênio e armazenada no fígado, o excesso de glicose 6-fosfato, segue a via glicolítica e é metabolizado em acetil CoA que é utilizada para formar ácidos graxos, colesterol e

sais biliares (BERG et al., 2008). A glicólise é uma sequência de reações enzimáticas na qual uma molécula de glicose é convertida em moléculas de piruvato com produção concomitante de ATP (VOET et al., 2008). O fígado pode produzir glicose pela degradação das reservas de glicogênio e por executar a gliconeogênese, sendo seus precursores o lactato e alanina a partir do músculo, glicerol a partir do tecido adiposo e aminoácidos glicogênicos da alimentação (BERG et al., 2008).

O fígado desempenha um papel central na regulação do metabolismo lipídico. Os ácidos graxos derivados da dieta ou sintetizados pelo fígado são esterificados ao glicerol fosfato formando o triacilglicerol, sendo transportado ao tecido adiposo por lipoproteínas. Os triacilgliceróis são mobilizados pela ação hidrolítica de lipases sob o controle hormonal do glucagon e adrenalina. Os ácidos graxos são ativados a acil CoA e transportados através da membrana mitocondrial interna pela carnitina e degradadas na matriz mitocondrial por uma sequência de reações chamada de via de β - oxidação (BERG et al., 2008). O acetil-CoA formado durante a β - oxidação pode entrar no ciclo do ácido cítrico ou ser convertido em corpos cetônicos. A produção e a exportação dos corpos cetônicos para tecidos extra-hepáticos liberam a coenzima A permitindo a oxidação dos ácidos graxos (NELSON e COX, 2006). A biossíntese dos ácidos graxos ocorre por processo inverso ao da β -oxidação, que ocorre na mitocôndria e a reação de biossíntese ocorre no citossol (VOET et al., 2008).

São funções também relacionadas aos hepatócitos: a síntese de albumina, colesterol, proteínas plasmáticas, fatores de coagulação, a digestão e absorção de nutrientes relacionados à formação de bile, a secreção de bilirrubina ou bile e a detoxificação de toxinas e o catabolismo de determinadas drogas (HENDRIX, 2005).

Os sistemas enzimáticos de detoxificação hepática, como a citocromo P450, atuam de forma rápida e têm ampla especificidade, dando ao animal a capacidade de suportar uma grande variedade de desafios causados por toxinas naturais e sintéticas (SANTOS et al., 2008). O citocromo P450 constitui uma superfamília de heme-enzimas que ocorre praticamente em todos os organismos vivos que detoxifica xenobióticos, participa no metabolismo de drogas convertendo estes em substâncias solúveis em água o que ajuda na excreção pelos rins (VOET et al., 2008).

1.3.1 Lesões hepáticas e avaliação da função hepática

Uma doença hepática pode ser definida como qualquer distúrbio que acarrete uma lesão dos hepatócitos, uma colestase ou ambas, como por exemplo, hipóxia, intoxicações, neoplasias, inflamações, distúrbios metabólicos, traumatismos e obstrução do ducto biliar intra ou extra-hepático (THRALL, 2007).

As doenças hepáticas podem ser primárias ou secundárias. Na doença primária hepática, as manifestações clínicas são causadas pelas lesões no fígado, ao passo que no envolvimento secundário, podem-se incluir sinais clínicos não-relacionados às lesões hepáticas. Na doença hepática aproximadamente três quartos do seu parênquima devem ser inativos, antes que os sinais de disfunção apareçam (RADOSTITS, 2002).

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

1.3.1.1 Intoxicação por cobre

O cobre é um mineral que é estocado no fígado. Excesso de cobre na dieta pode levar a um acúmulo deste mineral, causando hepatotoxicidade com lesão ou necrose dos hepatócitos (KERR, 2003). Os ovinos afetados demonstram características clínicas associadas com insuficiência hepática e a intoxicação por cobre pode ser avaliada por métodos laboratoriais específicos (HEADLEY, 2008). Riet-Correa et al.(1989) relatou 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, geralmente mais que 15 mg/kg.

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.

1.3.1.2 Plantas tóxicas

Os principais fatores determinantes para indicar a frequência e ocorrência dos casos de intoxicação em animais entre eles os ovinos são: a palatabilidade, disponibilidade da espécie tóxica e a fome. As espécies pouco palatáveis, normalmente são ingeridas em condições especiais, principalmente em períodos de estiagem e de secas prolongadas em que algumas espécies permanecem verdes e disponíveis no pasto (COSTA et al., 2009; BARBOSA et al., 2007). As plantas tóxicas de interesse pecuário são classificadas como as espécies que promovem, sob condições naturais, intoxicações nos animais (BARBOSA et al., 2007) . E de acordo com Tokarnia et al.(2000) é encontrada na natureza um grande número de espécies vegetais que contém princípios ativos capazes de promover distúrbios em animais.

As principais plantas que apresentam toxinas hepáticas e que causam intoxicação em ovinos são *Xanthium spp* e *Senecio spp* (PUGH, 2004).

O princípio ativo de *Xanthium* é um glicosídeo triterpenóide carboxiatractilosídeo (CAT) que atua inibindo o transporte de ADP e ATP através da membrana da mitocôndria e altera o processo de fosforilação oxidativa, ocorrendo redução na respiração celular, e reservas de ATP (MÉNDEZ, 2001). Santos et al. (2008) destaca a presença dos alcalóides pirrolizidínicos na planta *Senecio spp* e provocam lesões nas células hepáticas com inibição da mitose, causando megalocitose, necrose e redução no número de hepatócitos, que são substituídos por tecido fibroso.

Ilha et al.(2001) descreveu 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. E considerando que a mortalidade de ovinos no estado é de 15% a 20% em uma população de cinco milhões de ovinos, as mortes por plantas tóxicas podem ser estimadas em 54.000 a 72.000 animais (RIET-CORREA et al., 2001).

1.3.1.3 Parasitoses

As parasitoses ovinas estão entre as principais preocupações dos produtores, sendo apontadas como limitantes para o desenvolvimento dos sistemas de produção e correspondendo a severos prejuízos (NETO, 2004).

Ramos (2006) destaca que as parasitoses que acometem os ovinos são divididas em endoparasitoses e ectoparasitoses. As endoparasitoses são representadas pelos helmintos pertencentes às classes nematoda, cestoda e trematoda. Destaca-se a classe trematoda por tratar-se de uma verminose hepática causada por um trematódeo da família Fasciolidae (*Fasciola hepatica*). Este trematódeo parasita os canais biliares de ovinos, bovinos, caprinos, suínos e outros animais, inclusive o homem.

Segundo Echevarria (2004), 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).

No Brasil, a maior área enzoótica está situada no Sul e vem se expandindo pela Região Sudeste, principalmente o Vale do Rio Paraíba (SERRA-FREIRE et al., 1995). 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.

O diagnóstico de uma doença hepática com base em achados clínicos é difícil, neste caso é necessário o uso de testes laboratoriais que abrange a determinação da atividade sérica de enzimas que indicam a lesão dos hepatócitos (THRALL, 2007). No entanto, os resultados e a interpretação de tais testes dependem da natureza da lesão e intensidade da doença, além das variações entre as espécies. Testes específicos que identifiquem a natureza exata da lesão não são disponíveis e uma combinação de testes geralmente é necessária para estabelecer um diagnóstico (RADOSTITS, 2002).

1.4 ENZIMAS HEPATO-ESPECÍFICAS

A determinação dos níveis séricos das enzimas hepáticas é usada comumente para a detecção e avaliação de doenças hepáticas. A interpretação dos valores elevados das enzimas no plasma depende, não somente do tecido e local de origem, mas também da meia-vida da depuração da enzima. (RADOSTITS, 2002).

O aumento da atividade sérica pode decorrer do extravasamento celular de enzimas presentes no citossol ou em organelas provocado por lesões da membrana celular ou de organelas. As lesões podem ser tão graves que ocasionam a morte celular (necrose) ou uma lesão que provoque somente o extravasamento das enzimas (THRALL, 2007).

Segundo Hendrix (2005), as principais enzimas hepáticas associadas a danos hepatocelulares nas diferentes espécies são: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), sorbitol desidrogenase (SD) e glutamato desidrogenase (GDH). As enzimas associadas à colestase (obstrução de duto biliar) e defeito metabólico em hepatócitos são: gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA).

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima que está presente no fígado e em menor concentração no rim e nos músculos. É considerada enzima hepato-específica para cães, gatos e primatas. Nos equinos, suínos e ruminantes a ALT representa pouco valor de diagnóstico devido à atividade sérica nestas espécies apresentar-se diminuída (DÍAZ GONZÁLEZ, 2006).

A aspartato aminotransferase (AST) está presente nos hepatócitos, mas também é encontrada em quantidade significativa em outros tecidos, nos eritrócitos, músculos esquelético e cardíaco, rins e pâncreas (HENDRIX, 2005). A análise desta enzima geralmente é feita para diagnosticar doenças musculares, pois ela não é considerada uma enzima hepato-específica (TRALL, 2007).

A sorbitol desidrogenase (SD) é especialmente útil para avaliar danos hepáticos em grandes animais, como ovinos, caprinos, suínos, equinos e bovinos. O nível plasmático de SD aumenta com danos ou necrose hepatocelular, portanto o ensaio de SD pode ser usado em todas as espécies como teste diagnóstico hepato-específico. A desvantagem da análise desta enzima é a sua instabilidade no soro e sua atividade diminuída depois de obtida a amostra (HENDRIX, 2005).

A glutamato desidrogenase (GDH) é uma enzima de extravasamento está presente em altas concentrações no fígado de cães, gatos, ruminantes e equinos e em outros tecidos sua concentração é baixa (THRALL, 2007). A determinação da atividade sérica da enzima glutamato desidrogenase (GDH) é indicada para avaliar necrose hepática em ovinos, caprinos e bovinos. Também pode estar elevada no período do parto e associada a obstruções dos ductos biliares (SANTOS et al., 2008). Os níveis plasmáticos das enzimas glutamato desidrogenase apresentam-se aumentados entre 7-14 dias pós-infecção, pela destruição dos hepatócitos (MÜLLER, 2001).

Por isso é considerada a enzima hepato-específica mais estável no soro em comparação à sorbitol desidrogenase (KERR, 2003). Entretanto, a determinação da atividade de GDH é difícil e o seu teste não é facilmente encontrado no comércio (THRALL, 2007). 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) comenta no seu estudo que ocorrem alterações bioquímicas no plasma quando comparou a resposta imune do hospedeiro em relação ao parasita (*Fasciola gigantica* e *Fasciola hepatica*) em ovinos durante 10 semanas. A infecção por *F. hepatica* evolui mais rapidamente do que por *F. gigantica*, resultando em aumento dos níveis plasmáticos de GDH, indicando maior prejuízo para o parênquima hepático. Também observou que no plasma dos grupos infectados por *F. gigantica* os níveis de GDH estavam elevados, comparando com os grupos não infectados. Nos grupos infectados por *F. hepatica* encontrou níveis

quatro vezes mais elevados de GDH em relação aos grupos infectados por *F. gigantea*.

1.5 GLUTAMATO DESIDROGENASE

A enzima mitocondrial Glutamato Desidrogenase (GDH : EC 1.4.1.2) catalisa a reação de desaminação reversível do L- glutamato para 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato) usando o NAD^+ e NADP^+ como coenzimas (FISHER,1985) (Fig.1).

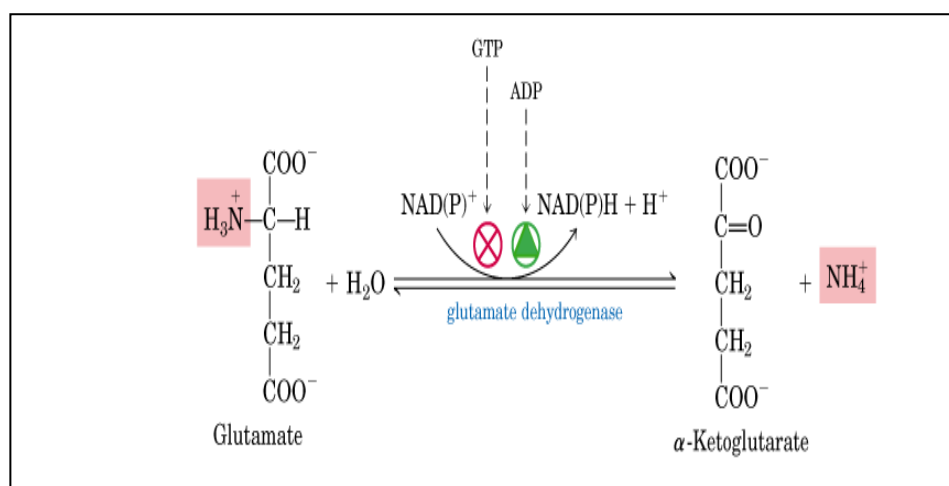


Figura 1 - Reação catalisada pela glutamato desidrogenase. Empregando o NAD^+ e NADP^+ como cofatores e regulada alostericamente por GTP e ADP. Adaptado: Lehninger,1995.

O grupo amino da maioria dos aminoácidos é retirado por um processo que consiste na transferência deste grupo para o α -cetoglutarato formando o glutamato, e a cadeia carbônica do aminoácido é convertida ao α -cetoácido. Esta reação é catalisada por aminotransferases e ocorre no citosol dos hepatócitos. O glutamato é transportado para o interior da mitocôndria onde seu grupo amino é removido (NELSON E COX, 2006). A oxidação ocorre com a transferência de um íon hidreto a partir do C_α (carbono alfa) do aminoácido glutamato para o NAD(P)^+ e forma-se o α -iminoglutarato que em seguida é hidrolisado a α -cetoglutarato e amônia (VOET et al., 2008). Esta reação é catalisada pela glutamato desidrogenase, uma enzima mitocondrial encontrada principalmente no fígado, um exemplo raro de enzima que utiliza o NAD^+ e NADP^+ como o receptor dos equivalentes redutores. A glutamato desidrogenase é específica para glutamato e não se conhecem desidrogenases

análogas para qualquer outro aminoácido (MARZZOCO e TORRES, 2007). A enzima glutamato desidrogenase é uma molécula que consiste em seis subunidades idênticas e sua atividade é influenciada por um complexo de efetores alostéricos, o ADP, seu modelador positivo, como pelo GTP, seu modelador negativo. Quando o hepatócito necessita de combustível para o ciclo do ácido cítrico, aumenta a atividade da glutamato desidrogenase, tornando o α -cetoglutarato disponível para o ciclo do ácido cítrico e liberando amônia para excreção. Mas, sempre que o GTP se acumula na mitocôndria, como resultado de alta atividade do ciclo do ácido cítrico, a desaminação oxidativa é inibida (NELSON e COX, 2006).

O presente trabalho justifica-se para o conhecimento básico da sequência e caracterização do gene da enzima Glutamato Desidrogenase de ovinos visando posteriormente resolver a estrutura tridimensional da proteína. Pretende-se utilizar o anticorpo produzido contra a enzima como biomarcador no diagnóstico de lesões hepáticas em ovinos causadas por infecções parasitárias, por plantas hepatotóxicas ou intoxicação pelo cobre.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Obter a sequência do gene *gdh* de ovinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar a região codificante da enzima glutamato desidrogenase hepática de ovino;
- Sequenciar do gene *gdh* a partir do DNA plasmidial;
- Comparar a sequência de aminoácidos da GDH deduzida para avaliar a homologia com a GDH de outras espécies.

3 MATERIAL E MÉTODOS

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

3.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Foram coletados pequenos 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. Todos os materiais e soluções foram preparados em condições *RNase free*. Os materiais plásticos foram autoclavados e a vidraria cuidadosamente lavada com água tratada com Dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC) e posteriormente autoclavada. As soluções foram preparadas com água Milli-Q previamente tratada com DEPC 0,1%, deixada por uma noite à temperatura ambiente e em seguida autoclavada para esterilização e inativação do DEPC.

Para a extração de RNA total, um fragmento do fígado de aproximadamente 100 mg de tecido foi homogeneizado vigorosamente com 1 mL do reagente Trizol[®] (Invitrogen) e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a lise das células, o RNA foi extraído com 200µL 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. A fase aquosa resultante foi transferida para um novo tubo e adicionado 500µl de isopropanol 98%, sendo a fase orgânica desprezada. Após 10 minutos as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 g, sendo então o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com 1ml de etanol 75% e centrifugado a 7.500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e inverteu-se o tubo sobre papel absorvente por aproximadamente 10 minutos à temperatura ambiente para evaporação de todo etanol. O RNA foi eluído em 100 µl de água ultrapura tratada com DEPC, livre de RNase, e incubado a 55°C

por 10 minutos. Os estoques de RNA foram mantidos a – 80°C.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DE RNA

A quantificação das amostras de RNA foi feita em espectrofotômetro (BioPhotometer - Eppendorf, Germany), observando-se a absorvância a 260 e 280nm. A qualidade do RNA foi analisada com base na relação da absorvância 260/280nm e na visualização do RNA após eletroforese em gel de agarose 1% em TBE livre de RNase.

3.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%, segundo descrito por Sambrook et al. (1989). Para a preparação de géis, a agarose foi adicionada ao tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0), e a mistura aquecida em forno micro-ondas até formar uma solução homogênea. A solução foi resfriada até aproximadamente 60°C e foi adicionada ao suporte para a solidificação. As amostras foram diluídas em tampão de amostra 6X (azul de bromofenol a 0,25%; xilenocianol a 0,25% e glicerol a 30%) e aplicadas no gel. O tampão de corrida utilizado foi TBE e a separação eletroforética foi feita sob tensão de 80 V até a separação dos corantes, e em seguida aumentada para 100 V por cerca de 1 hora. A seguir o gel foi imerso em solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL por meia hora sob agitação lenta, para permitir a visualização das bandas sob luz ultravioleta.

3.4 SÍNTESE DE cDNA

Para obtenção do DNA complementar (cDNA) foi utilizada a técnica de RT-PCR com o kit Proto Script® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis (BioLabs). Para cada reação utilizou-se um tubo de microcentrífuga estéril. As reações de transcrição reversa (RT) foram feitas seguindo o protocolo da Tabela 1.

Tabela 1 - Componentes da reação de síntese de cDNA

Componentes	Volume
RNA total	3µL
d(T) ₂₃ VN(50µM)	2µL
H ₂ O nuclease-free	3 µL
Volume Total	8 µL

Esta reação foi incubada a 70°C por 15 minutos, centrifugada rapidamente e colocada no gelo. Em seguida foram adicionados ao microtubo 10 µl de M-MuLV Reaction Mix e 2 µl M-MuLV Enzyme Mix, obtendo um volume final de 20 µl.

Essa mistura foi incubada a 42°C por uma hora para que ocorresse a síntese do cDNA e depois a 80°C por 5 minutos para inativação da transcriptase. A reação final foi diluída em q.s.p 50µL com água livre de nuclease e armazenada a – 20°C até o momento da amplificação do gene por PCR.

3.5 AMPLIFICAÇÕES DO GENE *gdh* POR PCR

A região de codificação do gene *gdh* de ovinos foi amplificada por PCR a partir do cDNA obtido anteriormente, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 2).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos senso e anti-senso utilizados nas reações de PCR

Oligonucleotídeos	Sequências
P1	F1 Sense 5' CCG CTT GTG GCC ATG TAC CGC 3'
	R1 Anti – sense 5' TAC CTC CCT TGC AGG GCG TGC 3'
P2	F2 Sense 5' GGA AGT CAT TGA GGG CTA CCG 3'
	R2 Anti – sense 5' CCT CCA AGA TGC TYCC TTC ATA 3'
P3	F3 Sense 5' CCC AAA GGA ACT GGA AGA CTTC 3'
	R3 Anti – sense 5' CTA TGT GAA GGT CAAC RCC AGC 3'

Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados a partir do alinhamento das sequências da *gdh* presente no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) de *Ovis aries*, *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*, possibilitando a construção de três conjuntos de oligonucleotídeos denominados de P1, P2 e P3 que foram utilizados na amplificação de parte do gene de interesse.

Foram otimizadas técnicas de PCR, e para cada reação utilizou-se os reagentes presente na Tabela 3.

Tabela 3 - Componentes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Componentes	µL /Tubo	Concentração Final
Água	11,2	
Tampão 10x(Invitrogen)	2,0	1x
MgCl ₂ 50mM(Invitrogen)	0,6	1,5mM
dNTPs 10mM	2,0	1,0mM
Oligonucleotídeo <i>Sense</i> 20 pmol/ µL	1,0	10pmol
Oligonucleotídeo <i>Anti-Sense</i> 20 pmol/ µL	1,0	10pmol
Taq DNA pol U/µL (Invitrogen)	0,2	1,0 U
DNA	2,0	
Volume final	20,0	

Foram realizadas três reações distintas, com a utilização dos oligonucleotídeos P1, P2 e P3. A concentração ótima de MgCl₂ na mistura de reação foi estabelecida em experimentos utilizando concentrações variáveis de MgCl₂ (1,5 - 3,5 mM).

As reações de amplificação foram realizadas com os seguintes parâmetros para o termociclador Biocycler (Tabela 4).

Tabela 4 - Programa da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Temperaturas	Tempos	
94°C	5 min	} 35 ciclos
94°C	1 min	
58°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

3.6 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de amplificação obtidos pelas reações de PCR para os fragmentos P1, P2 e P3 foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, sob tensão de 80 V a 100V por cerca de 1 hora e corados pelo brometo de etídio (0,5 µg/mL) para confirmação dos tamanhos das bandas do DNA. Estas foram determinadas por comparação de suas mobilidades com as dos marcadores de tamanho molecular (Ladder 100pb - Ludwig Biotec), introduzido no gel no momento da corrida. O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema vídeo-imagem (DNR Bio- Imaging Systems)

3.7 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA

3.7.1 Ligação no vetor

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. Após a separação eletroforética dos fragmentos de DNA, a banda correspondente ao fragmento de interesse foi cortada do gel com um estilete estéril e purificada com o uso do Kit QIAquick Gel Extraction[®] (Qiagen[®]), de acordo

com as especificações do fabricante. Após essas etapas deu-se a reação de ligação dos fragmentos de DNA de interesse ao vetor pGEM[®]-T Easy (Figura 2),

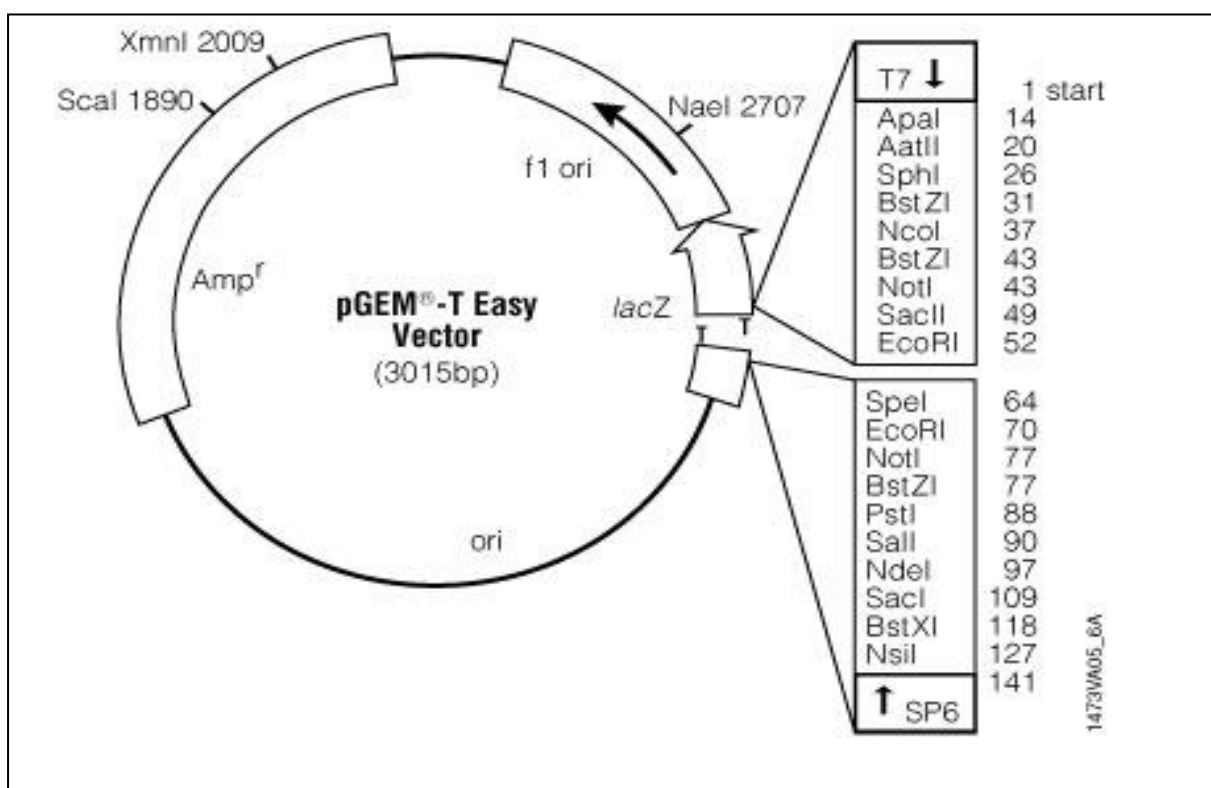


Figura 2 - Plasmídeo pGEM-T Easy[®] (Promega). Mapa do vetor utilizado para clonagem dos fragmentos de cDNA

Para as ligações dos fragmentos de DNA ao vetor, utilizou-se o kit pGem-T Easy Vector System[®] (Promega) e empregou-se os seguintes reagentes (Tabela 5):

Tabela 5 - Componentes da ligação dos fragmentos de DNA no Vetor.

Componentes	Volume
Rapid Ligation Buffer 2x	5 µL
Vetor pGEM-T Easy (50ng)	1 µL
Inserto (produto de PCR purificado)	3 µL
T4 DNA ligase (1U)	1 µL
Volume Total	10 µL

As reações foram incubadas a 4°C por 18 horas.

3.7.2 Transformação de células competentes de *Escherichia coli*

Bactérias *E. coli* DH 10B previamente cálcio-competentes (Sambrook et al., 1989) foram utilizadas para a transformação. Alíquotas de 50 µL de células competentes foram descongeladas em gelo e a elas adicionado 5 µL da solução de reação de ligação de cada gene. As misturas foram mantidas em gelo por 30 minutos e em seguida submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 segundos e voltando para banho de gelo por 1,5 minutos. Em seguida foram adicionados 300 µL de meio de cultura SOC (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10 mM, glicose 20mM)em cada tubo e estes incubados a 37°C por uma hora sob agitação de 120 rpm. Após esse período, 200 µL de cada suspensão foram plaqueadas em placas contendo meio LB-ágar com 100 µg/mL de ampicilina, Xgal e IPTG para seleção de colônias azuis (não contêm inserto ligado ao vetor) ou colônias brancas (contêm o inserto ligado ao vetor). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

3.7.3 Análise por PCR das colônias transformantes

A análise das colônias transformantes foi realizada por PCR, utilizando uma colônia branca de bactérias juntamente com os iniciadores específicos para o vetor pGEM-T Easy[®], pGEM-F (5'- ACG CCA AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA -3') e EXCEL-R (5'- GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG AAT- 3'). Uma colônia foi adicionado à reação de PCR com auxílio de um palito estéril. As reações de amplificação foram realizadas com os seguintes parâmetros para o termociclador (Tabela 6):

Tabela 6 - Programa da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Temperaturas	Tempos	
95°C	5 min	} Repetição de 35 ciclos
95°C	20 seg	
55°C	30 seg	
72°C	3 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

O produto de PCR (10 µL de cada reação) foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas visualizadas pela coloração de brometo de etídio (0,5 µg/mL) sob luz ultravioleta, sendo que três colônias de cada fragmento que apresentaram sucesso na transformação foram selecionadas para a extração de DNA plasmidial.

3.8 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Para as colônias que apresentaram o inserto foi realizado a purificação do DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Quiagen®), de acordo com as especificações do fabricante. Uma colônia contendo o produto de amplificação referente ao gene de interesse foi utilizada como inóculo em 4 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/ mL), sendo mantida sob agitação a 200 rpm, a 37°C por 14 horas. 250µL do caldo foram transferidos para um microtubo com 750 µL de glicerol 50% e armazenado em freezer – 80°C. Em seguida o restante da suspensão bacteriana foi centrifugada a 4.000 xg, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células bacterianas foi utilizado para a extração do DNA plasmidial. Para confirmar o procedimento foi realizado eletroforese em gel de agarose a 1% com o produto de extração do plasmídeo e as bandas visualizadas pela coloração de brometo de etídio (0,5 µg/mL) sob luz ultravioleta.

3.9 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Protozoologia da UFSC, através do equipamento *MegaBace 1000[®] DNA Analysis System[®]* (GE/Amersham Biosciences[®], Buckinghamshire). As reações de sequenciamento dos clones foram preparadas a partir do DNA plasmidial e o Kit *DYEnamic[®] ET Dye Terminator* (GE/Amersham Biosciences[®], Buckinghamshire) conforme especificações do fabricante. As reações foram realizadas na presença de 5,0 pmol dos iniciadores pGEM-F e EXCEL-R e 800 ng de DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas (Tabela 7):

Tabela 7 - Programa da Reação de Sequenciamento.

Temperaturas	Tempos
95°C	25 seg
95°C	15 seg
55°C	30 seg
60°C	80 seg
4°C	∞

} Repetição de 35 ciclos

Em seguida os produtos marcados foram precipitados com isopropanol 70% e etanol absoluto para retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos purificados foram então eletroinjetados a 2kV por 100 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 7kV.

3.9.1 Análise da Qualidade das Sequências

As sequências foram submetidas à avaliação quanto ao tamanho e qualidade pelos softwares utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (www.phrap.org) sendo consideradas somente as sequências com qualidade Phred>20.

A confirmação da identidade dos fragmentos realizou-se utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e as sequências dos clones obtidos para um mesmo gene foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W para formação de uma sequência consenso.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

O RNA total do fígado de ovino, *Ovis aries*, foi extraído conforme item 3.1, 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 3). 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.

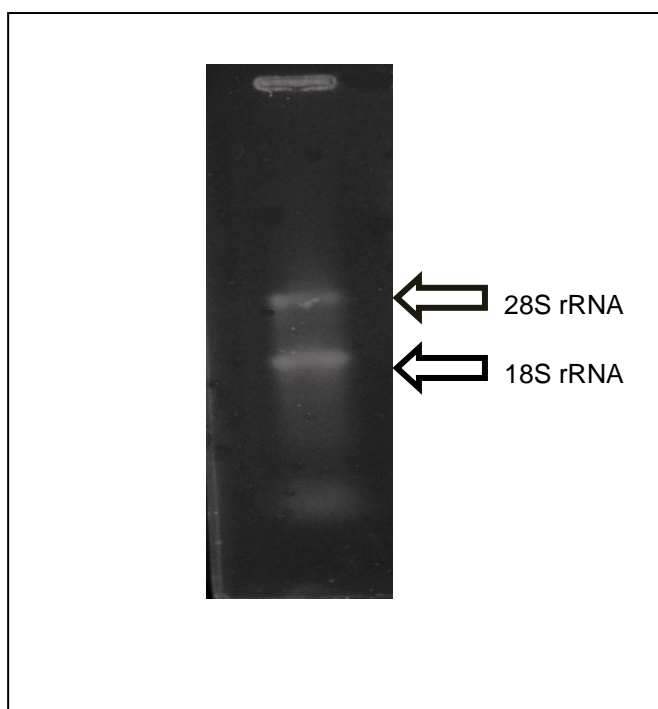


Figura 3 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do RNA total. Presença das bandas 28S e 18S rRNA .

4.2 ANÁLISE DA SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR POR PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas a partir do RNA total extraído de fragmento de fígado de ovino. Para a obtenção dos fragmentos P1, P2 e P3 utilizaram-se iniciadores específicos que foram definidos com auxílio do programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/>), através do alinhamento de sequências do gene *gdh* de várias espécies de animais. Para a construção dos iniciadores específicos utilizou-se o programa Primer 3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) verificou-se a viabilidade destes iniciadores relacionando a porcentagem de C/G, temperatura de anelamento (T_m) e ausência de auto complementariedade.

Com a sequência de *Ovis aries* (GeneBank- acesso número AY102935) presente no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), foi realizado o alinhamento múltiplo com as sequências de *gdh* de *Bos taurus* (GeneBank-NM182652), *Homo sapiens* (GeneBank-M20867), *Rattus norvegicus* (GeneBank-X14044) e *Mus musculus* (GeneBank-BC057347) (Figura 4). Pela análise verificou-se a ocorrência de regiões bastante conservadas e regiões variáveis, o que possibilitou a construção de três conjuntos de oligonucleotídeos denominados de P1, P2 e P3 e que foram utilizados na amplificação do gene de interesse.

bos	-----		
homo	GGGCAACCCGCGCGGGACCCCTTCTCCCTAGTCGCGGGGAGTCTGAGAAAAGCGCGCTGT	60	
Ovis	-----		
rattus	-----GTCCAGGCCTGCAAGCTCTGATCTTCTGTG	30	
mus	-----GCTCCCCGCGTCCAGGCCTGCGAGCTCCGGTCTTTACAG	40	
bos			
homo	F1 -----CCGCTTGCGCCATGTACCGCTACCTGGGCGAAGC	35	
Ovis	TTTCGCGACCATCAGCACCTCCCTCCGCTTGTGGCCATGTACCGCTACCTGGGCGAAGC	120	
rattus	CTCCCGCCGCTCTCGCCTCAGCCCGCCGCC-----ATGTACCGCCGCTGGGCGAAGT	83	
mus	CTCCCGCCGCACTCGCCTCAGCCCGCCGCC-GCCGCCATGTACCGCCGCTGGGCGAAGC	99	
bos			
homo	GCTGTTGCTGTCCCGGGCCGGGCCCGCTGCCCTGGGCTCGGCGTCCGCCACTCGGCCGC	95	
Ovis	GCTGTTGCTGTCCCGGGCCGGGCCCGCTGCCCTGGGCTCGGCGTCCGCCACTCGGCCGC	180	
rattus	GCTGCTACTGTCCCGCGCCGGGCCCGCTGCCCTGGGCTCTGCGGCTGCAGACTCAGCCGC	143	
mus	GCTGCTGCTGTCCCGCGCCGGGCCCGCTGCCCTGGGCTCTGCGGCTGCAGACTCAGCCGC	159	
bos			
homo	GTTGCTGGGCTGGGCCCGGGACAGCCCGCCGCCCGCCCGCAGCCGGGGCTTGTGCCACC	155	
Ovis	GTTGCTGGGCTGGGCCCGGGACAGCCCGCCGCCCGCCCGCAGCCGGGGCTGGCATTGGC	240	
rattus	ACTGCTGGGCTGGGCTGCGGACAACCCTCTGCTGTCCCGCAACCCGGGCTCAGCCGGT	203	
mus	GCTGCTGGGCTGGGCCCGGGACAGCCCTCCGCCCGCCCGCAACCCGGGCTCAGCCGGT	219	

Figura 4 - Alinhamento usando Clustal W de sequências do gene *gdh* de várias espécies de animais. As sequências realçadas correspondem à localização dos iniciadores desenhados. O * representam regiões de similaridade entre os nucleotídeos.

bos	CGCTCGGCGACACTACAGCGAGGCGGCGGCCGACCGGAGGACACCCCAACTTCTTCAA	215
homo	CGCCCGGCGCCACTACAGCGAGGCGGTGGCCGACCGGAGGACACCCCAACTTCTTCAA	300
Ovis	-----CTTCAA	6
rattus	CGCCAGGCGCCACTACAGCGAAGCGGCCACCGACCGAAGACGACCCCAACTTCTTCAA	263
mus	CGCCCGACGCCACTACAGCGAAGCGGCCGCGCCGACCGGAGGACACCCCAACTTCTTCAA	279

bos	GATGGTGGAGGGCTTCTTTGACCGCGGTGCCAGCATCGTGGAGGACAAGCTGGTGGAGGA	275
homo	GATGGTGGAGGGCTTCTTCGATCGCGGCCAGCATCGTGGAGGACAAGCTGGTGGAGGA	360
Ovis	GATGGTGGAGGGCTTCTTTGACCGCGGTGCCAGCATCGTGGAGGACAAGCTGGTGGAGGA	66
rattus	GATGGTGGAGGGCTTCTTCGACCGCGGCCAGCATCGTGGAGGACAAGCTGGTGGAGGA	323
mus	GATGGTGGAGGGCTTCTTCGACCGCGGCCAGCATCGTGGAGGACAAGCTGGTGGAGGA	339

bos	CCTCAAGACCCGGGAGACCGAGGAGCAGAAGCGGAACCGGGTGCCTAGCATCTTGC GGAT	335
homo	CCTGAGGACCCGGGAGAGCGAGGAGCAGAAGCGGAACCGGGTGC CGGGATCCTGCGGAT	420
Ovis	CCTCAAGACCCGGGAGACCGAGGAGCAGAAGCGGAACCGGGTGCCTAGCATCTTGC GGAT	126
rattus	CCTGAAGACCCGGGAGAACCGAGGAGCAGAAGCGGAACCGAGTGC CGGGATCCTGCGGAT	383
mus	CCTGAAGACCCGGGAGAGCGAGGAGCAGAAGCGGAACCGGGTGC CGGGATCCTGCGGAT	399
	*** * *****	
bos	CATCAAGCCCTGCAACCATGTGCTGAGCCTGTCTTCCCATCCGGCGGACGACGGCTC	395
homo	CATCAAGCCCTGCAACCATGTGCTGAGTCTCTCTTCCCATCCGGCGGACGACGGCTC	480
Ovis	CATCAAGCCCTGCAACCATGTGCTGAGCCTGTCTTCCCATCCGGCGGACGACGGCTC	186
rattus	CATCAAGCCCTGCAACCATGTGTTGAGCCTCTCTTCCCATCCGGCGGACGACGGCTC	443
mus	CATCAAGCCCTGCAACCATGTGTTGAGCCTCTCTTCCCATCCGGCGGACGACGGCTC	459

bos	CTGGGAAAGTCATCGAGGGTACCGGGCCAGCACAGCCAGCACCGCACGCCCTGCAAGGG	455
homo	CTGGGAGGTCATCGAAGGCTACCGGGCCAGCACAGCCAGCACCGCACGCCCTGCAAGGG	540
Ovis	F2 CTGGGAAAGTCATCGAAGGCTACCGGGCCAGCACAGCCAGCACCGCACGCCCTGCAAGGG	246
rattus	CTGGGAGGTCATCGAAGGCTACCGGGCCAGCACAGCCAGCACCGCACGCCCTGCAAGGG	503
mus	CTGGGAGGTCATCGAAGGCTACCGGGCCAGCACAGCCAGCACCGCACGCCCTGCAAGGG	519

bos	AGGTATCCGTTACAGCACTGATGTGAGTGTAGATGAAGTAAAAGCTTGGCTTCTCTGAT	515
homo	AGGTATCCGTTACAGCACTGATGTGAGTGTAGATGAAGTAAAAGCTTGGCTTCTCTGAT	600
Ovis	R1 AGGTA TCCGTTACAGCACTGATGTGAGTGTAGACGAAGTAAAAGCTTGGCTTCTCTGAT	306
rattus	AGGTATCCGTTACAGCACTGACGTGAGTGTGGATGAGGTGAAGGCGCTGGCTCCCTAAT	563
mus	AGGTATCCGTTACAGCACTGACGTGAGTGTGGATGAAGTAAAAGCTTGGCTTCTCTAAT	579

bos	GACATATAAGTGTGCAGTGGTTGATGTGCCATTTGGGGGTGCCAAAGCTGGTGTGAAGAT	575
homo	GACATACAAGTGTGCAGTGGTTGATGTGCCATTTGGGGGTGCTAAAAGCTGGTGTGAAGAT	660
Ovis	GACGTATAAGTGTGCAGTGGTTGATGTGCCATTTGGGGGTGCCAAAGCTGGTGTGAAGAT	366
rattus	GACCTACAAGTGTGCAGTGGTTGATGTGCCATTTGGAGGTGCTAAAAGCAGGCGTTAAGAT	623
mus	GACATACAAGTGTGCAGTGGTTGATGTGCCATTTGGAGGTGCTAAAAGCAGGCGTTAAGAT	639
	*** * *****	
bos	CAATCCCAAGAACTACACTGATAATGAATTGAAAAAGATCACAAGGAGGTTACCATTGGA	635
homo	CAATCCCAAGAACTATACTGATAATGAATTGAAAAAGATCACAAGGAGGTTACCATTGGA	720
Ovis	CAATCCCAAGAACTATACTGATAACGAATTGAAAAAGATCACAAGGAGGTTACCATTGGA	426
rattus	CAATCCCAAGAACTATAACAGATAATGAATTGAAAAAGATTACACGAAGATTACCATTGGA	683
mus	CAACCCCAAGAACTATAACAGATAATGAATTGAAAAAATTACACGAGGTTACTATTGGA	699
	*** *****	
bos	GCTGGCCAAGAAGGGCTTTATTGGCCTGGCGTCGATGTGCCGCCCCGACATGAGCAC	695
homo	GCTAGCAAAAAGGGCTTTATTGGTCTGGCATGTGATGTGCCGCTCCAGACATGAGCAC	780
Ovis	GCTGGCAAAGAAGGGCT-----	443
rattus	GCTGGCAAAGAAGGGCTTTATTGGTCTGGCATGTGATGTGCCGCTCCCCAGACATGAGCAC	743
mus	GCTGGCAAAGAAGGGCTTTATTGGTCTGGCATGTGATGTGCCGCTCCCCAGACATGAGCAC	759
	*** * * ***** *	
bos	CGGCGAGCGGGAGATGTCNTGGATCGCCGACACCTACGCCAGCACCATAGGCACTATGA	755
homo	AGGTGAGCGGGAGATGTCCTGGATCGCTGATACCTATGCCAGCACCATAGGGCACTATGA	840
Ovis	-----	
rattus	GGGCGAGCGGGAGATGTCCTGGATCGCTGACACCTATGCCAGCACCATAGGGCACTATGA	803
mus	GGGTGAGCGGGAGATGTCCTGGATCGCTGACACCTATGCCAGCACCATAGGGCACTATGA	819
bos	TATTAATGCCACGCCTGTGTTACTGGTAAAGCCCATCAGTCAGGGGGGAATTCATGGACG	815
homo	TATTAATGCACACGCCTGTGTTACTGGTAAACCCATCAGCCAAGGGGGGAATTCATGGACG	900
Ovis	-----	
rattus	TATCAATGCACACGCCTGTGTCACCTGGTAAACCCATCAGCCAAGGAGGCATCCACGGACG	863
mus	TATCAATGCGCATGCCTGTGTTACTGGGAAACCCATCAGTCAAGGAGGCATCCACGGGCG	879

Figura 4 - Continuação

bos		CATCTCTGCTACTGGCCGTGGTGTCTTCCATGGGATTGAAAATTCATCAATGAGGCTTC	875	
homo		CATCTCTGCTACTGGCCGTGGTGTCTTCCATGGGATTGAAAATTCATCAATGAAGCTTC	960	
Ovis		-----		
rattus		CATCTCCGCTACTGGCCGGGTGTTTTTCATGGGATTGAGAACTTCATCAATGAAGCTTC	923	
mus		CATCTCCGCTACTGGCCGGGTGTTTTTCATGGAATTGAAAACCTTCATCAATGAGGCTTC	939	
bos		TTACATGAGCATTTTAGGAATGACACCAGGGTTTGGAGATAAAACATTTGTTGTTGAGGG	935	
homo		TTACATGAGCATTTTAGGAATGACACCAGGGTTTGGAGATAAAACATTTGTTGTTGAGGG	1020	
Ovis		-----		
rattus		CTACATGAGCATCTTAGGGATGACCCCGGGCTTGGCGATAAGACGTTTGTGTTGAGGG	983	
mus		TTACATGAGCATTTTAGGAATGACACCAGGCTTTGGCGATAAGACATTTGTTGTTGAGGG	999	
bos		ATTTGGTAATGTGGCCCTACACTCTATGAGATATTTACATCGTTTTGGTGCTAAATGTAT	995	
homo		ATTTGGTAATGTGGCCCTACACTCTATGAGATATTTACATCGTTTTGGTGCTAAATGTAT	1080	
Ovis		-----		
rattus		ATTTGGTAATGTGGCCCTGCACTCTATGAGATATTTACATCGTTTTGGTGCTAAGTGTGT	1043	
mus		ATTTGGTAATGTGGCCCTGCACTCTATGAGATATTTACATCGTTTTGGTGCTAAATGTGT	1059	
bos		TGCTGTTGGTGTGAGTCTGATGGGAGTATATGGAATCCAGATGGTATTGACCCAAAGGA	1055	F3
homo		TGCTGTTGGTGTGAGTCTGATGGGAGTATATGGAATCCAGATGGTATTGACCCAAAGGA	1140	
Ovis		-----		
rattus		TGGTGTGGGAGAACTGATGGGAGTATATGGAATCCAGATGGTATTGACCCAAAGAA	1103	
mus		TGGTGTGGGAGTCTGATGGGAGTATATGGAATCCGGATGGGATTGACCCAAAGAA	1119	
bos	F3	GGAAGACTTC AAATTGCAACATGGAACAATCCTGGGCTTCCCAAAGCAAAGAT CTATGA	1115	R2
homo		GGAAGACTTCAAATTGCAACATGGGTCCATTCTGGGCTTCCCAAAGCAAAGCCCTATGA	1200	
Ovis		-----		
rattus		GGAAGATTTCAAGTTGCAACATGGATCAATTCTGGGCTTCCCAAAGCAAAGGCTATGA	1163	
mus		GGAAGACTTCAAAGTTGCAACATGGATCAATTCTGGGCTTCCCAAAGCAAAGGCTATGA	1179	
bos	R2	AGGAGCATCTTGGAGG TTGACTGTGACATACTAATCCCTGCTGCCAGCAGAGAAGCAGCT	1175	
homo		AGGAAGCATCTTGGAGGCCGACTGTGACATACTGATCCCAGCTGCCAGTGAGAAGCAGTT	1260	
Ovis		-----		
rattus		AGGAAGCATCTTGGAGGCTGACTGCGACATTTAATTCCTGCAGCCAGCAGAGAAGCAGTT	1223	
mus		AGGAAGCATCTTGGAGGCTGACTGTGACATTTCTGATTCCTGCTGCCAGCAGAGAAGCAGTT	1239	
bos		GCCCAAGTCCAATGCACCCGAGTCAAAGCCAAGATCATTGCTGAAGGTGCCAACGGACC	1235	
homo		GACCAATCCAACGCACCCAGAGTCAAAGCCAAGATCATTGCTGAAGGTGCCAAATGGGCC	1320	
Ovis		-----		
rattus		GACCAATCCAATGCACCCAGAGTCAAAGCCAAGATCATTGCTGAAGGAGCCAATGGGCC	1283	
mus		GACCAATCCAATGCACCCAGAGTCAAAGCCAAGATCATTGCTGAAGGTGCCAAATGGGCC	1299	
bos		GACAACTCCAGAAGCTGATAAGATTTTCTAGAGAGGAACATTATGGTTATTCAGATCT	1295	
homo		AACAACCTCCAGAAGCTGACAAGATCTTCTGGAGAGAAACATTATGGTTATTCAGATCT	1380	
Ovis		-----		
rattus		AACCACTCCAGAGGCCGATAAGATTTTCTAGAAAGAAACATCATGGTTATTCAGATCT	1343	
mus		AACCACTCCAGAGGCTGATAAGATTTTCTGGAAAGAAACATCATGGTTATTCAGATCT	1359	
bos		CTACCTGAATGCTGGAGGAGTGACAGTGTCTTACTTTGAGTGGCTGAATAATCTAAATCA	1355	
homo		CTACTTGAATGCTGGAGGAGTGACAGTATCTTACTTTGAGTGGCTGAAGAATCTAAATCA	1440	
Ovis		-----		
rattus		CTACCTGAATGCTGGAGGAGTGACAGTATCTTACTTTGAGTGGCTAAAGAATCTAAATCA	1403	
mus		CTACTTAAATGCTGGAGGAGTAACAGTGTCTTACTTTGAGTGGCTAAAGAATCTAAATCA	1419	
bos		TGTCAGCTACGGTCGTTTACCTTCAAATATGAAAGGGATTCTAACTACCCTTGCTTAT	1415	
homo		TGTCAGCTATGGCCGTTTACCTTCAAATATGAAAGGGATTCTAACTACCCTTGCTCAT	1500	
Ovis		-----		
rattus		CGTCAGCTATGGCCGATTGACCTTCAAATATGAAAGGGACTCGAACTACCCTTGCTCAT	1463	
mus		TGTCAGCTACGGCCGATTGACCTTCAAATATGAAAGGGACTCTAACTACCCTTGCTCAT	1479	
bos		GTCTGTTCAAGAGAGTTTGGAAAGGAAATTTGGAAAACATGGTGAACATTTCCCATTTG	1475	
homo		GTCTGTTCAAGAGAGTTTAGAAAAGAAATTTGGAAAGCATGGTGAACATTTCCCATTTG	1560	
Ovis		-----		
rattus		GTCCGTTCAAGAGAGTTTAGAGAGAAAGTTTGGAAAGCACGGCGGACTATCCCTGTGGT	1523	
mus		GTCTGTTCAAGAGAGTTTAGAGAGAAAGTTTGGAAAGCATGGTGAACATTTCTGTGGT	1539	

Figura 4 - Continuação

bos	ACCCACAGCAGAGTTCCAAGACAGGATATCGGGTGCCTCTGAGAAAGACATCGTGCCTC	1535
homo	ACCCACGGCAGAGTTCCAAGACAGGATATCGGGTGCATCTGAGAAAGACATCGTGCCTC	1620
Ovis	-----	
rattus	CCCCACAGCAGAGTTCCAGGACAGAATATCGGGTGCATCTGAGAAAGACATCGTGCCTC	1583
mus	CCCCACAGCAGAGTTCCAGGACAGGATATCGGGTGCATCTGAGAAAGACATCGTGCCTC	1599
bos	TGGTTTAGCTTACACCATGGAGCGCTCTGCCAGGCAAATCATGCGCACGGCCATGAAGTA	1595
homo	TGGCTTGGCATAACCAATGGAGCGTTCTGCCAGGCAAATCATGCGCACAGCCATGAAGTA	1680
Ovis	-----	
rattus	TGGCTTGGCCTACACAATGGAGCGATCTGCCAGGCAAATCATGCGCACAGCCATGAAGTA	1643
mus	TGGCTTGGCCTACACAATGGAGAGATCTGCCAGGCAAATCATGCGCACAGCCATGAAGTA	1659
bos	TAACCTGGGGCTGGACCTGAGAACGGCCGCTACGTCAACGCCATCGAGAAGGTCTTCAG	1655
homo	TAACCTGGGATTTGGACCTGAGAACAGCTGCCTATGTTAATGCCATTGAGAAAGTCTTCAA	1740
Ovis	-----	
rattus	TAACCTGGGATTTGGACCTGAGAACAGCTGCCTACGTCAATGCCATTGAGAAAGTCTTCAA	1703
mus	TAACCTGGGATTTGGACCTGAGAACAGCTGCCTATGTCAATGCTATCGAGAAGTCTTCAA	1719
bos	R3 GGTGTACAACGAG GCTGGCGTGACCTTCACATAG -----	1689 R3
homo	AGTGTACAATGAAGCTGGTGTGACCTTCACATAGATGGATCATGGCTGACTTCCTCACTA	1800
Ovis	-----	
rattus	GGTGTACAATGAGCTGGCGTGACCTTCACATAGACAGGTCACAGCTGACTTCTTTACCA	1763
mus	GGTGTACAATGAAGCTGGTGTGACCTTCACATAGACAGCTCACAGCCGACTTCTTTACCA	1779

Figura 4 - Conclusão

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 5).

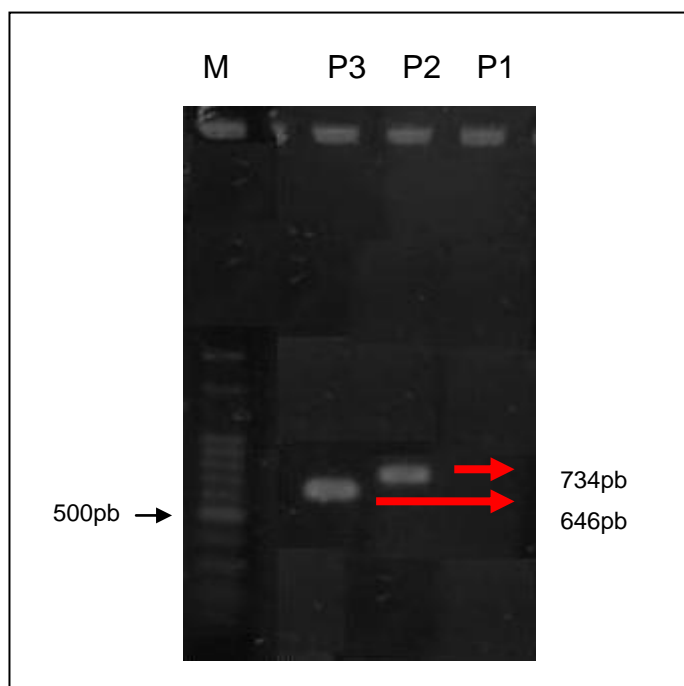


Figura 5 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do gene *gdh* de fígado de ovino com iniciadores específicos (P1, P2 e P3). M-marcador de tamanho molecular (Ladder 100pb).

Para a amplificação do fragmento P1, foram realizadas várias reações de PCR utilizando concentrações variáveis de $MgCl_2$ (1,5 a 3,5 mM) e diferentes temperaturas de anelamento (56,58,59,61,65°C), mas não foi possível obter o produto da amplificação que deveria apresentar um tamanho de 509 pb. Este fato permite inferir que talvez a sequência de nucleotídeos que corresponda ao fragmento P1 não esteja presente no gene do ovino ou que não tenhamos conseguido otimizar a técnica de PCR.

4.3 ANÁLISE DE COLÔNIAS TRANSFORMANTES POR PCR

As bandas correspondente 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, e utilizando uma colônia branca de bactéria, com os iniciadores específicos para o vetor pGEM[®]-T Easy adicionadas à reação de PCR. O produto da amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e as banda visualizadas pelo brometo de etídio.

Na Figura 6 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 plasmídio e o fragmento de 200pb que está relacionado à ausência do inserto de interesse e corresponde à amplificação da região flanqueadora do plasmídeo.

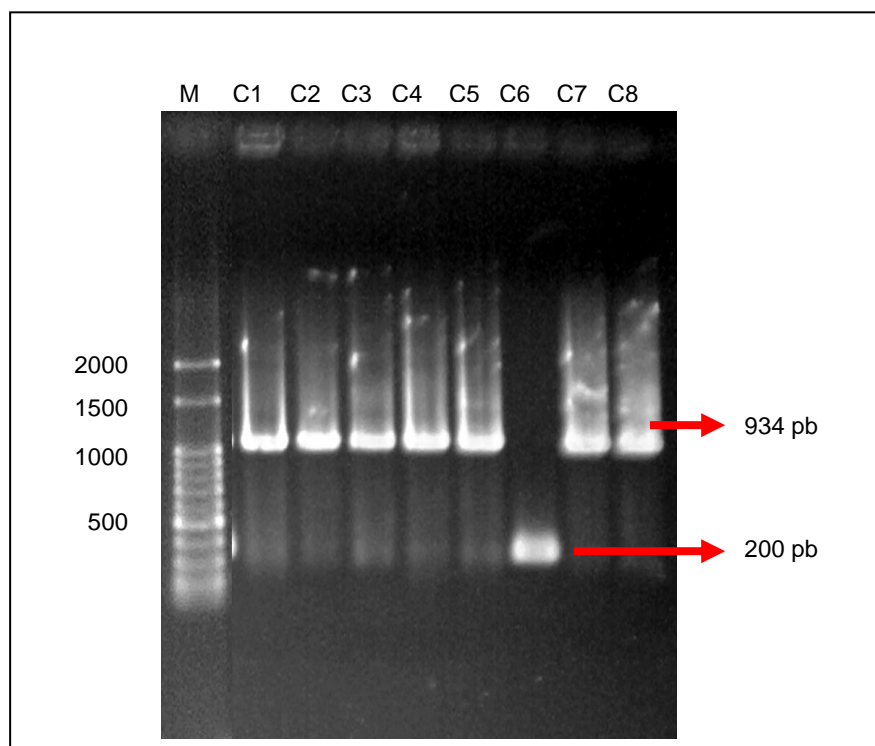


Figura 6 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação dos clones transformantes. M-marcador de tamanho molecular (Ladder 100pb), C6 representa o plasmídio sem o inserto. C1 a C5 e C7 e C8 representam o fragmento P2 de 934 pb inserido no plasmídeo.

Na figura 7 observa-se o fragmento P3 de aproximadamente 846 pb com o inserto inserido no plasmídio e o fragmento de 200 pb que corresponde a amplificação da região flanqueadora do plasmídio.

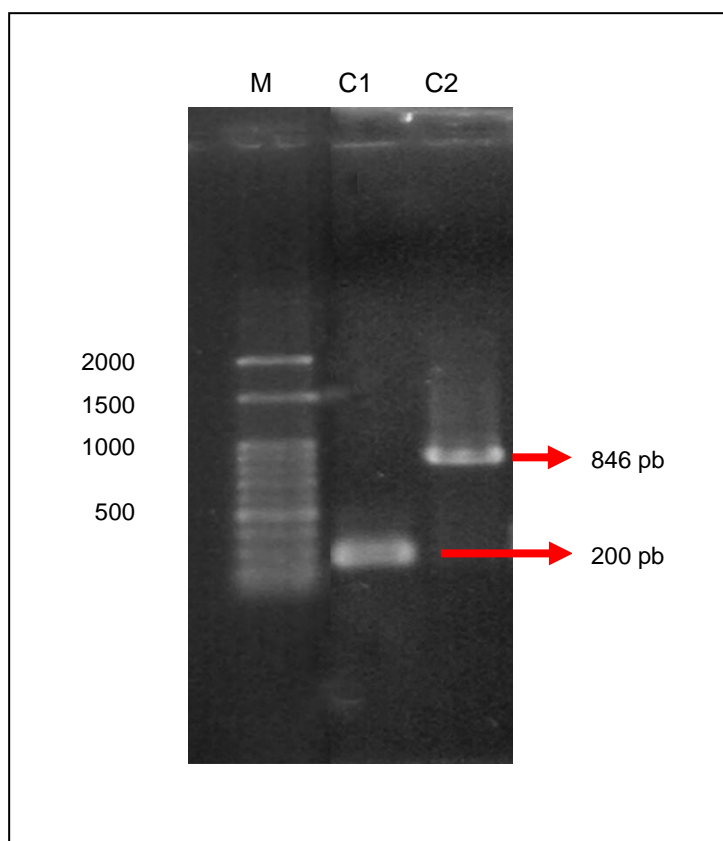


Figura 7 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação dos clones transformantes. M-marcador de tamanho molecular (Ladder 100pb), C1 representa o plasmídio sem o inserto. C2 representa o fragmento P3 de 846 pb inserido no plasmídio.

4.4 SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL

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) descreve 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 8.

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 por Timmerman (2003).

gi 32880220 seq.ovino	CCGCTTGTGGCCATGTACCGCTACCTGGGCGAAGCGCTGTTGCTGTCCC	GGGCCGGGCC 60
gi 32880220 seq.ovino	GCTGCCCTGGGCTCGGCGTCCGCCACTCGGCCGCGTTGCTGGGCTGGGCCGGGGACAG	120
gi 32880220 seq.ovino	CCC	CGCCGCCCCGAGCCGGGCTTGTGCCACCCGCTCGGCGACTACAGCGAGGCG 180
gi 32880220 seq.ovino	GCGGCCGACCGCGAGGACGACCCCAACTTCTTCAAGATGGTGGAGGGCTTCTTTGACCGC	240
	-----CTTCAAGATGGTGGAGGGCTTCTTTGACCGC	31

gi 32880220 seq.ovino	GGTGCCAGCATCGTGGAGGACAAGCTGGTGGAGGACCTCAAGACCCGGGAGACCGGAGGAG	300
	GGTGCCAGCATCGTGGAGGACAAGCTGGTGGAGGACCTCAAGACCCGGGAGACCGGAGGAG	91

gi 32880220 seq.ovino	CAGAAGCGGAACCGGTCGCTAGCATCTTGGGATCATCAAGCCCTGCAACCATGTGCTG	360
	CAGAAGCGGAACCGGTCGCTAGCATCTTGGGATCATCAAGCCCTGCAACCATGTGCTG	151

gi 32880220 seq.ovino	AGCCTGTCTTCCCATCCGCGCGACGACGGCTCCTGGGAAGTCATCGAGGGCTACCGG	420
	AGCCTGTCTTCCCATCCGCGCGACGACGGCTCCTGGGAAGTCATCGAGGGCTACCGG	211

gi 32880220 seq.ovino	GCCCAGCACAGCCAGCACCCGACGCGCTGCAAGGGAGGTATCCGTTACAGCACTGATGTG	480
	GCCCAGCACAGCCAGCACCCGACGCGCTGCAAGGGAGGTATCCGTTACAGCACTGATGTG	271

gi 32880220 seq.ovino	AGTGTAGATGAAGTAAAAGCTCTGGCTTCTCTGATGACATATAAGTGTGCAGTGGTTGAT	540
	AGTGTAGACGAAGTTAAAGCTCTGGCTTCTCTGATGACATATAAGTGTGCAGTGGTTGAT	331

gi 32880220 seq.ovino	GTGCCATTTGGGGGTGCCAAAGCTGGTGTGAAGATCAATCCCAAGAACTACACTGATAAT	600
	GTGCCATTTGGGGGTGCCAAAGCTGGTGTGAAGATCAATCCCAAGAACTATACTGATAAC	391

gi 32880220 seq.ovino	GAATTGAAAAGATACAAGGAGGTTACCATGGAGCTGGCCAAGAAGGGCTTTATTGGC	660
	GAATTGAAAAGATACAAGGAGGTTACCATGGAGCTGGCCAAGAAGGGCTTTATTGGC	451

gi 32880220 seq.ovino	CCTGGCGTCGATGTGCCCGCCCGACATGAGCACCGGCGAGCGGGAGATGTCNTGGATC	720
	CCTGGCATTGACGTGCCCGCCCGACATGAGCACAGGCGAGCGGGAGATGTCCTGGATT	511

gi 32880220 seq.ovino	GCCGACACCTACGCCAGCACCATAGGACACTATGATATTAATGCCACGCCTGTGTTACT	780
	GTGGACACCTACGCTAGCACCATAGGACACTATGATATTAATGCCACGCCTGTGTTACT	571
	* *****	

Figura 8 – 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.

gi 32880220 seq.ovino	GGTAAGCCCATCAGTCAGGGGGGAATTCATGGACGCATCTCTGCTACTGGCCGTGGTGTCT 840 GGTAAGCCCATCAGTCAGGGTGGAAATCCATGGACGCATCTCTGCTACTGGCCGGGAGTTC 631 *****
gi 32880220 seq.ovino	TTCCATGGGATTGAAAATTTTCATCAATGAGGCTTCTTACATGAGCATTTTAGGAATGACA 900 TTCCATGGGATTGAAAATTTTCATCAATGAGGCTTCTTACATGAGTATTTTAGGAATGACA 691 *****
gi 32880220 seq.ovino	CCAGGGTTTGGAGATAAAACATTTGTTGTTTCAGGGATTTGGTAATGTGGCCCTACACTCT 960 CCAGGATTTGGAGATAAAACATTTGCGGTTTCAGGGATTTGGTAATGTGGCCCTGCACTCT 751 *****
gi 32880220 seq.ovino	ATGAGATATTTACATCGTTTTGGTGCTAAATGTATTGCTGTGGTGAGTCTGATGGGAGT 1020 ATGAGATATTTACATCGTTTTGGTGCTAAATGTATTGCTGTGGTGAGTCTGATGGCAGT 811 *****
gi 32880220 seq.ovino	ATATGGAATCCAGATGGTATTGACCCAAAGGAAGTGAAGACTTCAAATGCAACATGGA 1080 ATATGGAATCCAGATGGTATTGACCCAAAGGAAGTGAAGACTTCAAATGCAACATGGA 871 *****
gi 32880220 seq.ovino	ACAATCCTGGGCTTTCCCAAAGCAAAGATCTATGAAGGGAGCATCTTGGAGGTTGACTGT 1140 ACAATCCTGGGCTTTCCCAAAGCAAAGATCTATGAAGGAAGCATCTTGGAGGTCGATTGT 931 *****
gi 32880220 seq.ovino	GACATACTAATCCCTGCTGCCAGCGAGAAGCAGCTGCCCAAGTCCAATGCACCCCGAGTC 1200 GACATACTGATCCCTGCCCGCAGCGAGAAGCAGCTGACCAGTCCAACGCGCCAGAGTG 991 *****
gi 32880220 seq.ovino	AAAGCCAAGATCATTGCTGAAGGTGCCAACGGACCGACAACCTCCAGAAGCTGATAAGATT 1260 AAAGCCAAGATCATTGCTGAAGGTGCCAACGGACCAACAACCTCCAGAAGCTGATAAGATT 1051 *****
gi 32880220 seq.ovino	TTCTAGAGAGGAACATTATGGTTATTCAGATCTCTACTGAATGCTGGAGGAGTGACA 1320 TTCTAGAGCGGAACATCATGGTTATCCAGACCTCTACTGAATGCTGGGGGAGTGACA 1111 *****
gi 32880220 seq.ovino	GTGTCTTACTTTGAGTGGCTGAATAATCTAAATCATGTGACGTACGGTCGTTGACCTTC 1380 GTGTCTTACTTTGAGTGGCTGAAGAATCTGAATCACGTGACGTATGGTCGTTGACCTTC 1171 *****
gi 32880220 seq.ovino	AAATATGAAAGGGATTCTAACTACCCTTGCTTATGTCTGTTCAAGAGAGTTTGGAAAGG 1440 AAATATGAAAGGGATTCTAACTACCCTTGCTTATGTCTGTTCAAGAGAGTTTGGAAAGG 1231 *****
gi 32880220 seq.ovino	AAATTTGGAAAACATGGTGGAACTATTCCTATTGTACCCACAGCAGAGTTCCAAGACAGG 1500 AAATTTGGAAAACATGGTGGAACTATTCCTATTGTACCCACAGCAGAGTTCCAAGACAGG 1291 *****
gi 32880220 seq.ovino	ATATCGGGTGCCTCTGAGAAAGACATCGTGCACCTCTGGTTTAGCTTACACCATGGAGCGC 1560 ATATCGGGTGCCTCTGAGAAAGACATCGTGCATCTCTGGTCTAGCTTACACCATGGAGCGC 1351 *****
gi 32880220 seq.ovino	TCTGC-CAGGCAAATCATGCGCACGCCATGAAGTATAACCTGGGGCTGGACCTGAGAAC 1619 TCTGCTCAGGCAAATCATGCGCACGCCATGAAGTATAACCTGGGACTGGACCTGAGAAC 1411 *****
gi 32880220 seq.ovino	GGCCGCCTACGTCAACGCCATCGAGAAGGTCTTCAGGGTGTACAACGAGGCTGGCGTGAC 1679 GGCCGCCTACGTCAACGCCATCGAGAAGGTCTTCAGGGTGTACAATGAAGCTGGTGTGAC 1471 *****
gi 32880220 seq.ovino	CTTCACATAG 1689 CTTCACATAG 1481 *****

Figura 8 - Conclusão

4.5 SIMILARIDADE ENTRE AS GDH DE ALGUMAS ESPÉCIES DE ANIMAIS

Através de buscas em bancos de dados genéticos do NCBI foi possível obter uma relação entre espécies, cujos genes que codificam a enzima GDH já foram sequenciados como, por exemplo, em bovinos e no homem. Observa-se que este gene é encontrado em vários organismos desde bactérias até mamíferos e inclusive em vegetais.

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 9, 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.

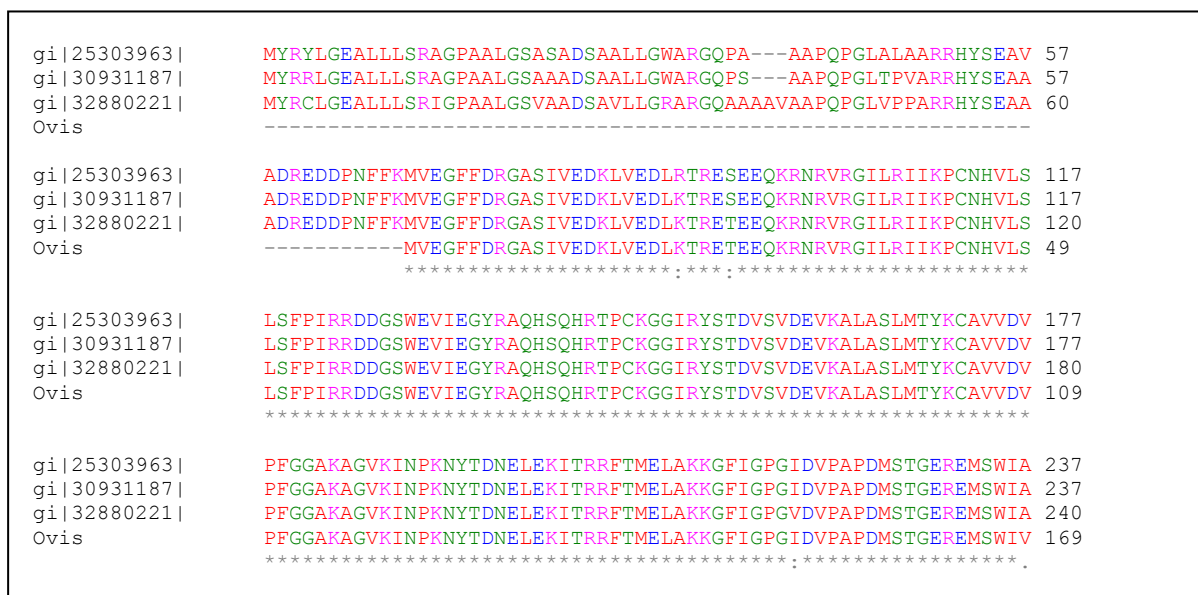


Figura 9 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima GDH de *Homo sapiens* (gi|25303963) *Mus musculus* (gi|30931187), *Bos taurus* (gi|32880221) com a sequência parcial de ovino. “*” indica que os resíduos de aminoácidos são idênticos nas quatro sequências alinhadas, “:” indica existência de substituições conservativas, “.” indica existência de substituições semi-conservativas

```

gi|25303963|      DTYASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHGRISATGRGVFHGIENFINEASYMSILGMT 297
gi|30931187|      DTYASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHGRISATGRGVFHGIENFINEASYMSILGMT 297
gi|32880221|      DTYASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHGRISATGRGVFHGIENFINEASYMSILGMT 300
Ovis              DTYASTIGHYDINAHACVTGKPISQGGIHGRISATGRGVFHGIENFINEASYMSILGMT 229
*****

gi|25303963|      GFGDKTFVQQGFNVGLHSMRYLHRFGAKCIAVGESDGSIWNPDGIDPKELEDFKLQHGS 357
gi|30931187|      GFGDKTFVQQGFNVGLHSMRYLHRFGAKCVGVGESDGSIWNPDGIDPKELEDFKLQHGS 357
gi|32880221|      GFGDKTFVQQGFNVGLHSMRYLHRFGAKCVAVGESDGSIWNPDGIDPKELEDFKLQHGT 360
Ovis              GFGDKTFVQQGFNVGLHSMRYLHRFGAKCVAVGESDGSIWNPDGIDPKELEDFKLQHRN 289
*****

gi|25303963|      ILGFPPKAKPYEGSILEADCILIPAASEKQLTKSNAPRVKAKIIAEGANGPTTPEADKIF 417
gi|30931187|      ILGFPPKAKVYEGSILEADCILIPAASEKQLTKSNAPRVKAKIIAEGANGPTTPEADKIF 417
gi|32880221|      ILGFPPKAKIYEGSILEVDCILIPAASEKQLTKSNAPRVKAKIIAEGANGPTTPEADKIF 420
Ovis              NPGLPQSKDL-----
                  *:::*

```

Figura 9 - Conclusão

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*.

Para avaliar os danos no fígado, normalmente avalia-se os parâmetros bioquímicos séricos antes da confirmação pelo exame histopatológico. E com o advento de novos métodos, como a genômica e a proteômica, há um maior interesse em gerar novos marcadores para detecção de patologias no fígado, mesmo antes das alterações nos parâmetros clínicos e histológicos (RAMAIAH, 2007).

No estudo dos parâmetros bioquímicos sanguíneos a atividade das enzimas AST, ALT, GGT, SD, GDH e FA são consideradas biomarcadores de grande valor para avaliar o estado funcional de órgãos como o fígado. O'Brien et al.(2002) , relata que a ALT e outras enzimas usadas como biomarcadores preferenciais do plasma para indicar hepatotoxicidade apresentaram-se ineficazes na detecção de lesões hepáticas, principalmente por serem comprometidas por indução de algumas substâncias, como a dexametasona, ciproterona, nitrato e isoniazida, e serem encontradas em outros tecidos podendo expressar resultados falsos positivos.

No trabalho proposto por O'Brien et al.(2002), a GDH foi considerada a enzima de escolha para avaliação de um dano hepatocelular, com base no aumento da concentração da enzima após as lesões, pela constante e alta sensibilidade no

tecido afetado e por apresentar menor suscetibilidade à indução ou inibição quando exposta a determinadas substâncias.

O desenvolvimento do presente trabalho tinha como objetivo inicial obter a sequência completa do gene *gdh* de ovinos, porém, a sequência completa do gene não foi obtida, pois não sabemos se a sequência inicial do bovino corresponde com a do ovino, ou se esta sequência existe no ovino, ou ainda se não conseguimos otimizar a técnica de PCR.

5 PERSPECTIVAS

Como proposta para continuidade deste trabalho, sugere-se investir na obtenção da sequência completa do gene *gdh* de ovinos, aprimorando as condições necessárias da técnica de PCR, como também implementar um sistema para analisar a estrutura protéica e compará-la com a de outras espécies.

E conseqüentemente a expressão do gene e posterior produção de anticorpos policlonais específicos para a enzima GDH.

Os anticorpos policlonais poderiam ser utilizados para desenvolver um ensaio imunocromatográfico para detectar a presença da enzima GDH em concentrações elevadas no sangue. Segundo Luquetti et al.(2003), este tipo de ensaio é utilizado no diagnóstico de infecções por *T.cruzi* e os resultados obtidos demonstraram uma alta eficiência e sensibilidade apresentando vantagens como a simplicidade, tempo de execução e pode ser usado com mínimo de treinamento.

Portanto este ensaio apresenta potencial de ser um novo método de diagnóstico de lesões hepáticas em ruminantes na rotina a campo, podendo ser utilizado como marcador biomolecular de hepatotoxicidade durante terapias com drogas ou em estudos clínicos.

6 REFERÊNCIAS

ÁVILA, V.S.de; COUTINHO,G.C.; RAMOS,C.I. **Saúde ovina em Santa Catarina-** prevenção e controle. Florianópolis: Epagri, 2006. 94 p.

BARBOSA,R.R.,et al. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. **Acta Veterinária Brasileira**, v.1, n.1, p.1-7, 2007.

BERG, J. M.; TYMOCZKO,J.L.; STRYER,L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.1114 p.

COSTA,F.M. et al. Riscos de Intoxicação de Animais na Pecuária, por Plantas Tóxicas: uma revisão bibliográfica. IN: **ANAIS DO IX CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL**, São Lourenço, MG,Brasil, 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** v.62, p. 188 -191, 2007.

DEVLIN,T.M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2002. 1084 p.

DÍAZ GONZÁLEZ, Félix H. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. 358 p.

ECHEVARRIA, F.A.M. Fasciolose. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. v. 13, suplemento 1, 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, n.1,2, p.37-39, jan/dez, 2003.

HEADLEY,S.A., et al. **Chronic copper poisoning in sheep from Northern Paraná, Brazil: case report** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 29, n. 1, p. 179-184, 2008.

HENDRIX, C. M. **Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2005. 556 p.

ILHA, M.R.S.et al. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.21, n.3, p.123-138, 2001.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003. 436 p.

LOPES, S.T.A.;BIONDO,A.W.;SANTOS,A,P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3. ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 107 p.

LUQUETTI,A. O.et al. Chagas' disease diagnosis:a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay whith recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.46, p. 265 – 271, 2003

MARZZOCO, A.;TORRES,B.B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386 p.

MÉNDEZ, M.C.I ntoxicação por Plantas e Micotoxinas. In: RIET- CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e equinos**. São Paulo: Varela, 2001 v. 2, cap.3, p.219-222.

MOLINA, E. C.; LOZANO, S. P.; BARRACA, A. P. The relationship between haematological indices, serum gamma-glutamyl transferase and glutamate dehydrogenase, visual hepatic damage and worn burden in cattle infected with *Fasciola gigantica*. **Journal of Helminthology**. v.80, p. 277 – 279, 2006.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório**: princípios e interpretações. 5.ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009. 382 p.

MÜLLER, G. Fasciolose. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e equinos**.São Paulo: Varela, 2001. v.2, cap.1, p.118-130.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios da bioquímica** 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

NETO, O.A.P. **Práticas em ovinocultura**:ferramentas para o sucesso. Porto Alegre, SENAR-RS, 2004. 146 p.

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**. v. 143, n. 3-4, p.275-286, 2007.

RADOSTITS, O. M. **Clínica veterinária**: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

RAMOS, C.I. Parasitoses dos ovinos IN:ÁVILA,V.S. et al. **Saúde ovina em Santa Catarina**- prevenção e controle. Florianópolis: Epagri, 2006. 94 p.

RAMAIAH, S.K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p. 1551–1557, 2007

RIET -CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.1, p.38-42, 2001.

RIET -CORREA ,F. et al. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. v.2, 574 p.

RIET -CORREA ,F. et al.Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 9, n.3/4, p.51-54,1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: A Laboratory Manual, 2. ed . New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, J.C.A. et al. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n.1, p.1-14, jan. 2008

SERRA-FREIRE, N.M. et al .Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. **A Hora Veterinária**. V. 1, p. 19-21, 1995.

TIMMERMAN,M.; WILKENING, R. B. REGNAULT, T. R. H.. 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.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320 p.

THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária** 1 ed. Roca: São Paulo, 2007. p. 335-354.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**: a vida em nível molecular. Porto Alegre: Artmed, 2008. 1264 p.