

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos**

**CONSERVAÇÃO DO RNA LEUCOCITÁRIO PARA DETECÇÃO DA
EXPRESSÃO DO GENE MDR1 EM EQUINOS DA RAÇA CRIOULO**

Autora: Marianne Lamberts

PORTO ALEGRE

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos**

**CONSERVAÇÃO DO RNA LEUCOCITÁRIO PARA DETECÇÃO DA
EXPRESSÃO DO GENE MDR1 EM EQUINOS DA RAÇA CRIOULO**

Autora: Marianne Lamberts

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Medicina Animal: Equinos**

Orientador: Prof. Dr. Cláudio C. Natalini

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Lamberts, Marianne

Conservação do RNA leucocitário para detecção da expressão do gene MDR1 em equinos da raça Crioulo / Marianne Lamberts. -- 2013.

37 f.

Orientador: Cláudio Corrêa Natalini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. PAXgene. 2. mRNA. 3. MDR1. 4. equino. 5. sangue conservado. I. Natalini, Cláudio Corrêa, orient. II. Título.

Marianne Lamberts

CONSERVAÇÃO DO RNA LEUCOCITÁRIO PARA DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE MDR1 EM EQUINOS DA RAÇA CRIOULO

Aprovada em 18/07/20013

APROVADO POR:

Prof. Dr. Cláudio Corrêa Natalini
Orientador e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim
Membro da Comissão

Prof^ª. Dra. Petra Garbade
Membro da Comissão

Dra. Caroline Antoniazzi Wolf
Membro da Comissão

Dr. Alexandre da Silva Polydoro
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

A Hugo dos Anjos, representando a família Equalis, pelo eterno incentivo e sempre acreditar em meu potencial.

A minha filha Vicky, pela parceria e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Diretor e Vice-diretor do HCV-UFRGS, nas pessoas de Prof. Dr. Marcelo Alievi e Prof. Dr. Carlos Afonso Beck, respectivamente, pela oportunidade de conhecer novas áreas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio Corrêa Natalini, pela oportunidade, credibilidade, qualidade e presença na orientação, bem como sua constante dedicação.

À doutoranda Priscila Serpa, pelos constantes ensinamentos e paciência no LAFA.

A todos os demais colegas do LAFA, Nandinha, Taynor, Ruben, Amaro, sem vocês não seríamos uma grande família.

À doutoranda Monalyza, minha grande amiga e incentivadora nas boas e más horas, meu eterno muito obrigada. Sem você não teria sido possível!

À amiga Teka, pelo incentivo e por me ensinar que para tudo no mundo existe uma explicação física!

RESUMO

O estudo da expressão gênica é de grande aplicabilidade nas áreas de pesquisa científica e clínica. Por ser um método pouco invasivo e permitir coletas seriadas, a utilização de amostras sanguíneas facilita a análise da transcrição gênica. O maior desafio para a precisão nos ensaios moleculares é manter uma amostra com qualidade desde a coleta, armazenamento e transporte até o momento de sua análise. Este estudo utilizou um sistema de conservação de RNA sanguíneo que manteve amostras de qualidade após a coleta, transporte e armazenamento, permitindo extração de RNA e identificação da expressão do gene MDR1 em cavalos da raça Crioulo. Foram coletadas amostras sanguíneas de 27 cavalos a campo em tubos PAXgene® Blood RNA, que após o transporte e armazenamento a -20°C por 90 dias foram processadas em laboratório. A extração do RNA sanguíneo foi realizada com o *kit* Nucleo Spin® RNA II, a conversão em cDNA foi com o *kit* High-Capacity cDNA Reverse Transcription, utilizando a fluorimetria para as avaliações. A identificação da expressão do gene MDR1 em sangue conservado utilizou *primer* específico para cDNA e PCR em tempo real. Houve extração de RNA em todas as amostras coletadas, sendo que as leituras das concentrações de RNA das amostras com DNA contaminante não tiveram diferença estatística das amostras sem DNA contaminante. Ocorreu amplificação do gene MDR1 a partir do RNA das amostras, independente de contaminação de DNA. A coleta de sangue venoso dos cavalos a campo com os tubos PAXgene foi realizada sem complicações. A amplificação do mRNA com *primer* específico para transcrito do gene MDR1, de amostras submetidas aos métodos de coleta, armazenamento e processamento executados neste trabalho, confirma que o mRNA extraído, com a metodologia descrita, é viável, sendo sua expressão identificada em leucócitos sanguíneos de equinos da raça Crioulo.

Palavras chaves: PAXgene, mRNA, MDR1, equino, sangue conservado.

ABSTRACT

PRESERVATION OF LEUCOCYTE RNA FOR DETECTION OF MDR1 GENE EXPRESSION IN CRIOULO HORSES

Efficient nucleic acid extraction methods are paramount for gene expression studies and applications in the scientific and clinical research. Whole blood samples provide material for gene transcription analysis allowing serial trials with a not much invasive procedure. Still, a major challenge for molecular assays accuracy and reliability is to maintain RNA stability during sample collection and storage. A whole blood collection system for RNA preservation was used during collection, transport and storage of samples intended for RNA extraction and identification of the MDR1 gene in Crioulo horses. The blood samples were obtained from 27 horses in the field using the PAXgene[®] Blood RNA tubes. After 2h transport at room temperature, the samples were stored at -20°C for 90 days before processing. RNA extraction was performed with the Nucleo Spin[®] RNA II kit and cDNA conversion carried out with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit. RNA concentration was determined by fluorometry. MDR1 gene expression was assessed using real time polymerase chain reaction (PCR) with a specific primer for cDNA. RNA was successfully extracted from all samples. Total RNA yield from DNA contaminated samples was not statistically different from those without DNA contamination. MDR1 gene amplification occurred regardless of DNA contamination. There were no complications during horse handling and blood sampling direct into PAXgene tubes in the field. Successful amplification of MDR1 gene transcript with a specific primer showed that blood samples collected, stored and processed under the described methodology provided viable mRNA for down-stream applications of molecular analyses. This study allowed the identification of the gene MDR1 in blood leucocytes of Crioulo horses.

Key-words: PAXgene, mRNA, MDR1, horse, preserved blood.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Tubo para coleta das amostras sanguíneas. (a) Tubo PAXgene[®] Blood RNA. (b) Representação esquemática da proporção 2,76:1 de aditivo estabilizante e sangue..... 18
- Figura 2 - Posicionamento vertical do tubo PAXgene[®] Blood RNA para a coleta de sangue do equino em estação..... 19
- Figura 3 - Gráfico comparativo entre as médias das concentrações de RNA e cDNA, entre as amostras com e sem DNA contaminante do sangue de equinos coletados em tubo PAXgene..... 26
- Figura 4 - Gráfico da amplificação, através da PCR em tempo real, do fragmento (690 pb) do mRNA do gene MDR1 extraídos de equinos da raça Crioulo..... 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Programação do termociclador para a transcrição reversa do RNA em cDNA com o <i>kit</i> High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil).....	23
Tabela 2 -	Desenho dos <i>primers Forward</i> e <i>Reverse</i> (GenBank AY968084).....	24
Tabela 3 -	Concentrações de RNA, DNA contaminante e cDNA após a extração de RNA das amostras de sangue de equinos coletadas em tubo PAXgene, lidas em fluorímetro.....	25
Tabela 4 -	Concentrações de RNA e cDNA, sem DNA contaminante, após a extração de RNA das amostras de sangue de equinos coletadas em tubo PAXgene, lidas em fluorímetro.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
G	<i>Gauge</i>
Gp-P	Glicoproteína-P
LAFA	Laboratório de Farmacogenética Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
MDR1	Multiple Drug Resistance Gene – gene de resistência múltipla a drogas
mL	mililitro
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanograma
nM	nanomolar
nm	nanometro
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
rDNase	desoxirribonuclease recombinante
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
RT-PCR	<i>Reveserse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> -transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SD	desvio padrão
x g	vezes a aceleração da gravidade (unidade de medida da força centrífuga relativa - FCR)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Estudos de transcrição gênica em amostras sanguíneas	13
2.2	PAXgene® Blood RNA System	14
2.3	MDR1	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Coleta do sangue	18
3.2	Conservação e transporte das mostras	19
3.3	Preparo das amostras	19
3.4	Extração do RNA total	20
3.4.1	Lise celular.....	20
3.4.2	Filtragem do lisado.....	20
3.4.3	Ajuste das condições para ligação do RNA à membrana de sílica.....	20
3.4.4	Ligação do RNA à membrana de sílica.....	20
3.4.5	Dessanilização da membrana de sílica.....	21
3.4.6	Digestão do DNA.....	21
3.4.7	Lavagem e secagem da membrana de sílica.....	21
3.4.8	Eluição do RNA.....	21
3.5	Leitura da concentração de RNA total extraído da amostra	22
3.6	Leitura da concentração de DNA residual na amostra	22
3.7	Conversão do RNA em cDNA	22
3.8	Leitura da concentração de cDNA na amostra	23
3.9	Descarte de resíduos	23
3.10	Detecção da expressão do gene MDR1 no sangue conservado	23
3.10.1	PCR em tempo real.....	24
3.11	Análise estatística	24
4	RESULTADOS	25
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A análise da expressão gênica constitui uma ferramenta de grande importância e aplicabilidade em diferentes áreas da pesquisa clínica e científica. Diferentes tecidos e células são utilizados na identificação e estudo da expressão de genes com diversos objetivos. No entanto, a relevância e implicações da extração e amplificação de RNA dependem de métodos eficientes e resultados confiáveis.

A utilização do sangue para a avaliação da expressão gênica tem como vantagem a coleta amostral simples e pouco invasiva, podendo ainda ser realizada de forma seriada em um mesmo indivíduo. A análise da transcrição gênica de amostras sanguíneas geralmente é realizada em leucócitos extraídos de amostras por flebotomia. No entanto, a quantificação do RNA de sangue total é dificultada pela degradação simultânea dos transcritos e indução dos genes não desejáveis devido à manipulação ou ativação descontrolada da coagulação, resultando em quantidades falsamente diminuídas ou aumentadas de espécies importantes de mRNA. Como os tubos tradicionais de coleta de sangue não conseguem impedir as mudanças no padrão dos transcritos celulares durante o armazenamento da amostra, a demora no processamento exacerba as alterações e compromete a amplificação de RNA específicos.

Tanto em estudos clínicos como científicos, o transporte de animais para coleta de material para análise, como no caso de equinos, é muitas vezes impraticável ou arriscado, limitando a realização das intervenções e a obtenção das amostras necessárias. Assim, a aplicação da análise da expressão gênica de sangue equino, para diferentes finalidades, é dependente da viabilização de métodos que permitam coleta, armazenamento e envio de amostras sanguíneas sem que a qualidade e quantidade de mRNA presente sofram alterações e comprometam a confiabilidade dos resultados.

A coleta e armazenamento de sangue em tubos PAXgene tem demonstrado previamente fornecer RNA em quantidade e qualidade suficiente para análise de genes por transcriptase reversa. Assim, buscou-se avaliar o seu uso para sangue equino, analisando a viabilidade do RNA extraído e identificando a expressão do gene MDR1 na raça Crioulo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estudo da transcrição gênica em amostras sanguíneas

A extração e amplificação de transcritos tem se tornado uma ferramenta com grandes potenciais clínicos e diferentes aplicações científicas. A análise da transcrição gênica tem desempenhado papel importante na pesquisa de causas e manifestação de doenças e em estudos sobre a função celular. A análise quantitativa de mRNA (RNA mensageiro) de genes específicos tem sido utilizada para indicar a presença ou o prognóstico de enfermidades, prever e monitorar resposta à terapia medicamentosa e rastrear a cinética de alterações orgânicas. Em estudos científicos, a relevância da extração e amplificação de ácidos nucleicos envolve diferentes áreas da pesquisa básica, farmacogenética, diagnóstico molecular e biotecnologia (LANGEMEIER *et al.*, 1996; LOCKHART; WINZELER, 2000; KAGEDAL *et al.*, 2005; CARROL *et al.*, 2007; DAVIES *et al.*, 2011).

O sangue é uma fonte rica de potenciais biomarcadores, incluindo informações sobre a atividade gênica. É considerado um tecido acessível para análise da expressão de genes importantes para obtenção de dados biomédicos e estudos dinâmicos, sendo sua coleta fácil e pouco invasiva. Além disso, avaliações seriadas podem ser realizadas a partir de um único indivíduo. A análise dos perfis de expressão gênica de leucócitos sanguíneos possui várias aplicações e tem sido rotineiramente usada para pesquisa e diagnóstico de distúrbios hematológicos, metabólicos e genéticos (NAKAMURA *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 2004; KRAWIEC *et al.*, 2009).

No entanto, as peculiaridades do RNA como material biológico fazem com que a coleta e métodos de preparação de amostras sanguíneas possam comprometer a obtenção de resultados confiáveis. A cinética da expressão gênica e estabilidade do mRNA em amostras sanguíneas após coleta é complexa e não bem entendida para todos os mRNAs clinicamente relevantes (LOCKHART; WINZELER, 2000; KAGEDAL *et al.*, 2005).

O RNA está sujeito à rápida degradação intracelular *ex vivo* por nucleases endógenas específicas ou não. Além disso, a expressão gênica não intencional pode ser induzida pela flebotomia, contato com superfícies estranhas ou exposição a componentes de células lisadas, como a hemoglobina, resultando em quantificações

imprecisas. Amostras cujos transcritos possam ter sido degradados ou falsamente induzidos, não permitem uma análise confiável da expressão gênica (RAINEN *et al.*, 2002). Essas alterações são ainda mais acentuadas quando há demora no processamento das amostras, seja por condições adversas na rotina laboratorial ou por necessidade de transporte e/ou armazenamento do material coletado. O sangue total é coletado em vários anticoagulantes, incluindo citrato, heparina e EDTA. Estes aditivos inibem a coagulação, mas não mantêm os transcritos gênicos e nem controlam outras variáveis acrescidas pelo método de preparação celular. Assim, a extração de RNA de sangue total coletado com estes anticoagulantes necessita de processamento imediato da amostra para minimizar a degradação do RNA. No entanto, estes procedimentos são muitas vezes impraticáveis no ambiente clínico e os tempos típicos de processamento resultam em RNA de baixa qualidade (RAINEN *et al.*, 2002; CHAI *et al.*, 2005; CARROL *et al.*, 2007).

2.2 PAXgene® Blood RNA System

Tubos tradicionais de coleta e armazenamento de amostras sanguíneas, como os de EDTA, podem afetar os resultados da expressão gênica por relatarem quantidades falsamente diminuídas ou aumentadas de espécies importantes de mRNA. Buscando a estabilização do RNA durante a flebotomia e o armazenamento de amostras de sangue, foi desenvolvido o sistema chamado PAXgene® Blood RNA System. O tubo de coleta PAXgene (PAXgene® Blood RNA) contém 6,9 mL de uma solução de lise celular e um aditivo estabilizante com detergente catiônico e sais, em vácuo (RAINEN *et al.*, 2002; PAXGENE....., 2009).

Estudos têm sido realizados avaliando a indução e degradação de transcritos durante o armazenamento de sangue total em tubos PAXgene e em tubos com EDTA, sob diferentes faixas de temperaturas e por períodos distintos (RAINEN *et al.*, 2002; THACH *ET al.*, 2003; CHAI *et al.*, 2005; PAXGENE....., 2009). Nas amostras coletadas e armazenadas em EDTA, em qualquer temperatura, as concentrações de mRNA específico e totais mudaram substancialmente. Nessas amostras, as alterações de mRNA específicos variaram desde 99 % de diminuição até 100 vezes de indução. Já nas amostras armazenadas em PAXgene em temperatura ambiente (22°C), não houve degradação de mRNA para nenhum dos genes avaliados por até 5 dias (CHAI *et al.*, 2005). O fato de o tubo PAXgene permitir que o RNA mantenha sua integridade por

certo período em temperatura ambiente, pode reduzir custos com transporte por acondicionamento especializado e é importante ao se considerar que as condições realistas de envio de material muitas vezes submetem as amostras a trânsito em temperatura ambiente (WANG *et al.*, 2004)

Tem sido demonstrado, ainda, que a estabilidade do RNA total e mRNA específicos em sangue coletado em PAXgene é preservada por até 12 meses em -20°C e -80°C , inclusive após ciclos repetidos de congelamento e descongelamento (RAINEN *et al.*, 2002). Posteriormente (BEEKMAN *et al.*, 2009), foi analisada a viabilidade do uso do sistema PAXgene para extração de RNA de amostras sanguíneas congeladas em tubos de EDTA. Neste estudo, a transferência da amostra sanguínea para tubos PAXgene após descongelamento dos tubos de EDTA permitiu recuperação de RNA suficiente e de qualidade aceitável para análise da expressão gênica. Na pesquisa com animais, muitas vezes há limitações relacionadas à obtenção, armazenamento e manipulação do sangue total durante o curso de um experimento (CHESTERS *et al.*, 1997; BELLONE *et al.*, 2008). A apropriada coleta e armazenamento sanguíneo com a preservação de mRNA permite que a amostragem não fique condicionada ao processamento imediato do material e que seja realizada em diferentes ambientes de pesquisa.

A possibilidade do uso do PAXgene com quantidades menores de sangue também tem sido avaliada. Respeitando a proporção de sangue e estabilizante recomendada pelo fabricante do PAXgene, conseguiu-se extrair mRNA em quantidade e qualidade suficiente para avaliação da expressão de múltiplos genes em estudo clínico com crianças debilitadas (CARROL *et al.*, 2007) e em experimento com camundongos (KRAWIEC *et al.*, 2009). O PAXgene tem sido utilizado com sucesso para o isolamento de RNA de alta integridade em volumes reduzidos de sangue, de até 50 microlitros. A utilidade deste método foi inclusive demonstrada pela confirmação da regulação dose e tempo dependentes de mRNA específicos em resposta à injeção de substâncias (CARROL *et al.*, 2007). A viabilidade de coleta de quantidades menores de sangue pode ser aplicada em situações onde a disponibilidade do material é reduzida, como em pesquisas com animais de pequeno porte e/ou doentes, ou ainda em avaliações seriadas para acompanhamento terapêutico de acordo com o objetivo do estudo científico (BEEKMAN *et al.*, 2009; KRAWIEC *et al.*, 2009).

Para aplicações como análise de expressão gênica por RT-PCR ou RT-PCR em tempo real, é necessária alta qualidade de RNA, pois sequências de DNA contaminante

podem distorcer os resultados e sua subsequente interpretação (BUSTIN, 2002). Não há relatos de que a quantidade total de RNA extraído do sangue seja aumentada utilizando o PAXgene, no entanto, a melhora na integridade do RNA obtido tem sido comprovadamente determinada (CHAI *et al.*, 2005). Isto é importante, pois, uma vez extraídos transcritos de alta qualidade e de forma reproduzível, a atividade gênica específica poderá ser avaliada quanto à relevância clínica e científica (CARROL *et al.*, 2007; KRUHOFFER *et al.*, 2007). Além disso, como o sistema PAXgene simplifica e permite o armazenamento e transporte de amostras, mantendo uma alta qualidade de mRNA, a variabilidade entre amostras coletadas em diferentes locais dentro de um único estudo pode ser minimizada (RAINEN *et al.*, 2002; CHAI *et al.*, 2005).

2.3 MDR1

Além dos fatores descritos na literatura capazes de influenciar a variabilidade interindividual relacionada à farmacocinética e farmacodinâmica de determinados fármacos (MIZUNO *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2004), o gene de resistência múltipla a drogas (MDR1), identificado em várias espécies animais e no homem, também participa dos processos da absorção, distribuição, metabolismo e excreção, alterando a disponibilidade de drogas. O MDR1 expressa uma proteína de membrana denominada glicoproteína-P (Gp-P), considerada um dos maiores determinantes de variação da absorção oral e biodisponibilidade de diversos fármacos (CUMMINS *et al.*, 2003). A influência da presença deste gene MDR1 e da expressão da Gp-P tem sido demonstrada por vários estudos *in vitro* e *in vivo*. (XIE *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2004).

A Gp-P, descoberta por Juliano e Ling em 1976 em células de ovário de hamster chinês, selecionada em cultura de resistência à colchicina (JULIANO e LING, 1976; MARZOLINI *et al.*, 2004; MEALEY, 2004) já foi identificada no genoma de camundongos, ratos, bovinos, cães, macacos, roedores, equinos e do homem (THOMPSON *et al.*, 2000; BRADY *et al.*, 2002; NATALINI e LINARDI, 2006; LINARDI 2010). Esta proteína atua como uma bomba ativa, evitando o acúmulo de substratos no espaço intracelular (XIE *et al.*, 1999; DAGENAIS *et al.*, 2004; FROMM, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). A Gp-P é encontrada em tecidos normais como intestino, fígado, rins, barreira hematoencefálica, placenta, medula espinhal e plexo coróide, atuando na desintoxicação e em mecanismos de defesa contra xenobióticos e metabólitos potencialmente tóxicos. Os leucócitos também expressam a Gp-P, sendo

que alguns linfócitos possuem maior expressão, sugerindo seu envolvimento com citotoxicidade mediada por células (THIEBAUT *et al.*, 1987; FARDEL *et al.*, 1996; MATHENY *et al.*, 2001; LOTSCH *et al.*, 2002; MIZUNO *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2004; CORDON-CARDO *et al.*, 1989; DAGENAIS *et al.*, 2004; TYDÉN *et al.*, 2008).

O impacto clínico da Gp-P como proteína de transporte é amplamente reconhecida em animais (MARTINEZ *et al.*, 2008; ZHOU, 2008) e sua regulação *in vivo* sugere mecanismos espécies específicos (FARDEL *et al.*, 1996). Diferentes fatores podem alterar sua expressão e função, incluindo sinais fisiológicos, compostos endógenos, condições patológicas e fatores externos (ZHOU, 2008).

O interesse clínico nesta proteína tem aumentado devido aos mecanismos de superexpressão relacionados à resistência aos quimioterápicos, analgésicos e outras drogas, influenciando a resposta terapêutica (XIE *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2004; LOSCHER e POTSCHKA, 2005). A inibição farmacológica da função da Gp-P testada em camundongos, homem e cães, demonstrou melhora da biodisponibilidade oral de fármacos substratos desta proteína (THOMPSON *et al.*, 2000; MEALEY, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Em células tumorais a Gp-P é geralmente superexpressa e fortemente correlacionada com falha no tratamento e prognóstico desfavorável em vários tipos de câncer (JULIANO e LING, 1976; FARDEL *et al.*, 1996).

Por outro lado, a função alterada do gene MDR1 e Gp-P também pode ter um impacto clínico negativo. Embora não associada com características fenotípicas, a deficiência, polimorfismo ou mutação do gene MDR1 pode aumentar as concentrações plasmáticas de drogas, causar intoxicação e suscetibilidade a doenças (MARZOLINI *et al.* 2004; MEALEY, 2004). Mesmo que mutações tenham sido identificadas em cães, ainda não se tem nenhum relato de alterações do gene MDR1 e Gp-P em equinos. A expressão do gene MDR1 em equinos tem sido estudada principalmente no sistema digestório, buscando a determinação do impacto da presença da Gp-P na absorção, disponibilidade e efeito de alguns fármacos (LINARDI, 2010). Até o momento, nesta espécie, sua identificação tem sido realizada apenas em algumas raças, incluindo Puro Sangue Inglês, Quarto de Milha, Passo Peruano e *Swedish Standardbred Trotter* (TYDÉN *et al.*, 2008; LINARDI, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

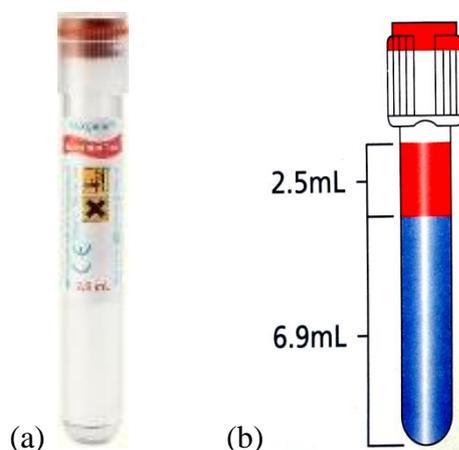
O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Farmacogenética Animal (LAFA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS.

3.1 Coleta do sangue

Foram utilizados 27 equinos da raça Crioulo, clinicamente hígidos, de uma propriedade localizada no município de Triunfo, no estado do Rio Grande do Sul, para a coleta do sangue.

A coleta das amostras foi realizada de acordo com a metodologia a seguir. O sangue foi retirado por punção da veia jugular esquerda com o equino em estação, em brete de contenção, utilizando-se adaptador para agulha 21 G (BD Vacutainer[®], Nova Jersey, EUA) e tubo PAXgene (PAXgene[®] Blood RNA)(Qiagen, Düsseldorf, Alemanha) (Figura 1). Durante a coleta o tubo foi mantido na vertical para que o aditivo estabilizante não refluisse através da agulha (Figura 2). Para garantir que a quantidade adequada de sangue (2,5 mL) fosse completamente aspirada pelo sistema a vácuo, o tubo era retirado do adaptador apenas após cessar completamente o gotejamento sanguíneo. Uma vez desconectado, o tubo era invertido 10 vezes para homogeneização da amostra.

Figura 1 - Tubo para coleta das amostras sanguíneas. (a) Tubo PAXgene[®] Blood RNA. (b) Representação esquemática da proporção 2,76:1 de aditivo estabilizante e sangue.



Fonte: PAXGENE[®] ..., 2010.

Figura 2 - Posicionamento vertical do tubo PAXgene® Blood RNA para a coleta de sangue do equino em estação.



3.2 Conservação e transporte das amostras

Os tubos foram mantidos na posição vertical, em temperatura ambiente (18°C a 25°C) por duas horas enquanto foram transportados, em um automóvel de passeio, ao laboratório. Posteriormente, foram transferidos para o congelador a -20°C, ficando armazenados por 90 dias.

3.3 Preparo das amostras

O descongelamento dos tubos PAXgene foi realizado em temperatura ambiente (22°C) por aproximadamente duas horas. Após o descongelamento, os tubos foram invertidos 10 vezes para homogeneização.

O preparo das amostras baseou-se no protocolo do *kit* PAXgene Blood RNA (PAXGENE® ..., 2009), sendo as amostras centrifugadas a 1.800 x g (Centribio, Modelo 80-2B, China), por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso com 4 mL de água ultrafiltrada livre de RNase e completamente dissolvido por meio do agitador de tubos (Vortex 1, China).

Uma segunda centrifugação, a 1.800 x g, por 10 minutos, foi realizada, sendo novamente o sobrenadante descartado para utilização do sedimento.

3.4 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído do sangue conservado das amostras por meio do *kit* de extração comercial Nucleo Spin[®] RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) utilizando-se o protocolo para amostras de tecidos e culturas celulares, de acordo com a descrição abaixo.

3.4.1 Lise celular

Para promover a lise celular, foram adicionados 350 µL de tampão de lise RA1 e 3,5 µL de β-mercaptoethanol ao sedimento no tubo PAXgene, em capela de exaustão. Foi utilizado o agitador de tubos (de 10 a 12 minutos) para a dissolução completa do sedimento.

3.4.2 Filtragem do lisado

Todo o conteúdo lisado do tubo PAXgene foi transferido para uma coluna Nucleo Spin[®] Filter, inserida em um tubo coletor de 2 mL, para reduzir a viscosidade, limpar e clarear a amostra. O tubo coletor e coluna com filtro foram centrifugados a 8.000 x g, por 60 segundos, em microcentrífuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

3.4.3 Ajuste das condições para ligação do RNA à membrana de sílica

O lisado filtrado foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, seguido de adição de 350 µL de etanol 70 % e homogeneização em agitador de tubos por 5 a 10 segundos.

3.4.4 Ligação do RNA à membrana de sílica

Uma coluna Nucleo Spin[®] RNA II Column foi inserida em outro tubo coletor, onde o lisado ajustado foi transferido, em volumes de 750 µL por vez, e centrifugado a 8.000 x g por 30 segundos, em microcentrífuga. Quando o volume total do lisado era

superior a 750 μL , o filtrado era desprezado e o restante da amostra submetido ao mesmo procedimento.

3.4.5 Dessanilização da membrana de sílica

Na mesma coluna, foram adicionados 350 μL de MDB (*Membrane Desalting Buffer*) para dessanilizar a membrana de sílica do filtro e nova centrifugação foi realizada a 8.000 x g, por 60 segundos, em microcentrífuga.

3.4.6 Digestão do DNA

A mistura da reação de RNase (*Mix*) foi preparada em microtubo com 90 μL de tampão de reação para rDNase e 10 μL de rDNase reconstituído, sendo homogeneizada suavemente com pipeta. Foram aplicados 95 μL do *Mix* diretamente sobre o centro da membrana de sílica, a qual foi incubada em temperatura ambiente (22°C) por 15 minutos, visando digerir todo o DNA, deixando apenas o RNA na membrana de sílica.

3.4.7 Lavagem e secagem da membrana de sílica

Na primeira lavagem da membrana de sílica, foram adicionados 200 μL de tampão de lavagem RA2 para inativação da rDNase. Foi realizada nova centrifugação a 8.000 x g, por 30 segundos em microcentrífuga e a coluna transferida para um novo tubo coletor de 2 mL.

Para a segunda lavagem da membrana de sílica, foram adicionados 600 μL de tampão de lavagem concentrado RA3 e realizada centrifugação a 8.000 x g, por 30 segundos, em microcentrífuga, sendo o filtrado descartado.

Na terceira lavagem da membrana, foram adicionados 250 μL de tampão de lavagem concentrado RA3, repetindo-se a centrifugação a 8.000 x g, por 60 segundos, deixando-a seca por completo. A coluna, com a membrana de sílica seca, foi transferida para um tubo coletor de 1,5 mL livre de nucleases.

3.4.8 Eluição do RNA

Foram colocados 60 μL de água livre de RNase em cima da membrana de sílica

seca, sendo o tubo coletor centrifugado a 8.000 x g, por 60 segundos, deixando o RNA total extraído da amostra no filtrado.

Foram utilizados 4 µL da solução com RNA total extraído para as leituras de concentração de RNA e DNA no fluorímetro (Qubit[®] 2.0, Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 10 µL para a conversão em cDNA, sendo o restante conservado a -20°C.

3.5 Leitura da concentração de RNA total extraído da amostra

A concentração de RNA total extraído da amostra foi determinada por fluorimetria utilizando 2 µL desta solução, por meio do *kit* Qubit[®] RNA Assay (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

3.6 Leitura da concentração de DNA residual na amostra

Em todas as amostras, a concentração de DNA residual foi determinada por fluorimetria com 2 µL da solução do RNA total extraído, utilizando o *kit* Qubit[®] dsDNA BR Assay (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As amostras, em que a leitura foi inferior a 1,00 ng/µL, foram convertidas em cDNA.

3.7 Conversão do RNA em cDNA

A conversão do RNA em cDNA foi realizada com o *kit* High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil).

Para cada amostra, foram preparados 10 µL de solução de transcrição reversa 2X *Master Mix*, através da combinação de reagentes fornecidos pelo *kit*, em microtubo de 200 µL. Adicionou-se 10 µL da solução com o RNA total extraído ao *Mix*, efetuando-se homogeneização cuidadosa. O microtubo foi colocado no termociclador (Veriti[®], Applied Biosystems, Singapura) para promover a transcrição reversa através de quatro ciclos com mudanças de temperatura, conforme tabela 1.

Tabela 1 – Programação do termociclador para a transcrição reversa do RNA em cDNA com o *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil).

	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	4º Ciclo
Temperaturas	25°C	37°C	85°C	4°C
Tempo	10 min.	120 min.	5 min.	Reação concluída

Após a leitura da concentração de cDNA, as amostras foram estocadas a -20°C para utilizações futuras em PCR em tempo real.

3.8 Leitura da concentração de cDNA na amostra

A concentração de cDNA na amostra foi determinada por fluorimetria com 2 µL da solução de cDNA, por meio do *kit* Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

3.9 Descarte de resíduos

Os resíduos da lavagem do sedimento do tubo PAXgene foram acondicionados em vidro com fechamento hermético e depois foram inativados com solução de hipoclorito de sódio a 5 %, na proporção de 9:1 (9 partes de resíduo:1 parte de hipoclorito).

3.10 Detecção da expressão do gene MDR1 no sangue conservado

A verificação da expressão do gene MDR1 no sangue conservado foi realizada através de PCR em tempo real com a amplificação do cDNA por meio de *primer* desenhado especificamente para um *amplicon* (sequência de interesse) de 690 pb (LINARDI, 2010). Os *primers Forward* e *Reverse* específicos para o cDNA do gene MDR1 (Tabela 2), foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA) e utilizados numa concentração final de 25 nM.

Tabela 2 – Desenho dos *primers Forward e Reverse* (GenBank AY968084)

Primers	Sequência	Referência
<i>Forward 5'-3'</i>	AAAGCCAAAGTGTCAGCAGC	Linardi,
<i>Reverse 5'-3'</i>	CACAATGCAGGTGCGGCCTT	2010

3.10.1 PCR em tempo real

Duas amostras de cDNA foram submetidas à PCR em tempo real, utilizando 12,5 µL de *Master Mix*, 2,0 µL de *primer Forward*, 2,0 µL de *primer Reverse*, 3,0 µL de cDNA e 5,5 µL de água ultrafiltrada livre de RNase. A programação do termociclador de PCR em tempo real (Rotor-Gene Q, Quiagen, Düsseldorf, Alemanha) consistiu de 50 ciclos de 95°C por cinco segundos e 60°C por 10 segundos, gerando uma curva de dissociação.

3.11 Análise estatística

A análise estatística para as leituras das concentrações de RNA e cDNA foi realizada através de teste t de *Student* com a utilização do programa Graph Pad Prism 6. Diferenças com valor de $P < 0,05$ foram consideradas significantes.

4 RESULTADOS

As leituras das concentrações do RNA extraído, da contaminação de DNA e conversão em cDNA das amostras de sangue dos equinos coletadas em tubos PAXgene e contendo e convertidos em cDNA, estão compiladas na tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações de RNA, DNA contaminante e cDNA após a extração de RNA das amostras de sangue de equinos coletadas em tubo PAXgene, lidas em fluorímetro.

Amostra	RNA (ng/μL)	DNA (ng/μL)	cDNA (ng/μL)
33	3,28	21,50	4,43
34	3,18	17,60	4,90
35	3,22	11,30	6,97
36	3,98	64,90	8,89
37*	4,98	22,00	7,91
38	3,12	51,30	7,76
39	3,50	48,90	10,2
40	4,24	50,10	7,88
41*	4,74	19,50	6,60
42	2,40	48,60	10,00
43	7,18	30,30	12,10
44	5,16	36,80	10,90
45	8,24	38,10	7,10
46	2,36	62,30	7,75
47	5,34	58,30	13,30
48	3,62	52,70	10,80
49	3,24	66,60	13,50
50	3,38	34,30	7,17
51	1,98	54,70	8,59
52	2,60	154,00	7,32
Média	3,99	47,19	8,70
SD	1,59	30,29	2,50

*Amostras usadas para o PCR em tempo real

Novas extrações de RNA do sangue dos equinos coletados em tubos PAXgene foram realizadas, com especial cuidado na etapa da digestão do DNA. Foram realizadas leituras das concentrações de RNA e DNA contaminante. Somente as amostras em que a concentração de DNA contaminante foi inferior a 1,00 ng/μL foram convertidas em cDNA, e também tiveram suas concentrações lidas em fluorímetro (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentrações de RNA e cDNA, sem DNA contaminante, após a extração de RNA das amostras de sangue de equinos coletadas em tubo PAXgene, lidas em fluorímetro.

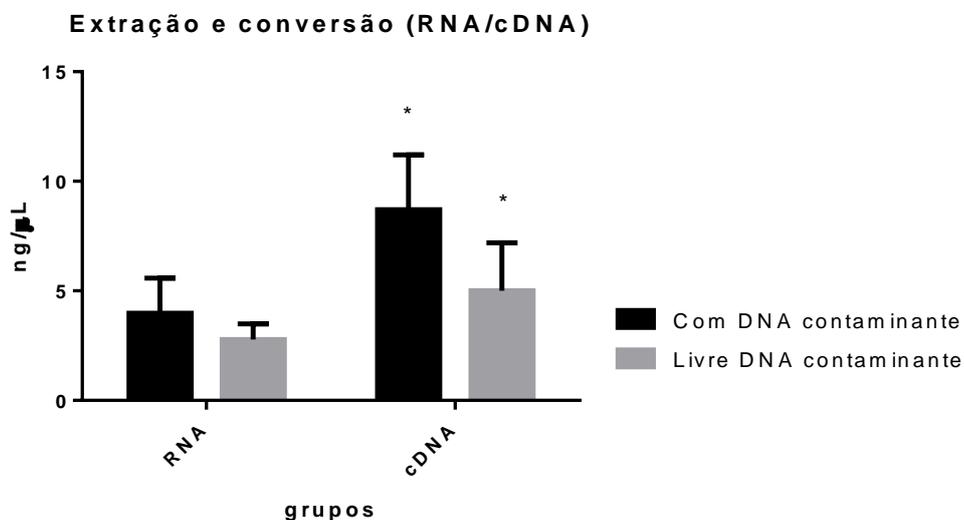
Amostra	RNA (ng/ μ L)	DNA (ng/ μ L)	cDNA (ng/ μ L)
69	2,20	<0,01	0,43
71	3,88	<0,01	4,79
72	3,07	<0,01	4,99
73	3,17	<0,01	7,24
75	2,40	<0,01	6,52
76	<2,00	<0,01	5,42
81	2,00	<0,01	5,65
Média	2,79		5,01
SD	0,71		2,19

As concentrações de RNA das amostras com DNA contaminante não diferiram estatisticamente das amostras sem DNA contaminante (figura 3).

Os valores de cDNA obtidos de amostras livres de DNA contaminante foram significativamente menores ($P=0,002$) que os obtidos a partir de amostras contaminadas (figura 3).

O gráfico da figura 3 representa a análise comparativa das , concentrações de RNA e cDNA, entre as amostras com e sem DNA contaminante do sangue de equinos coletados em tubo PAXgene.

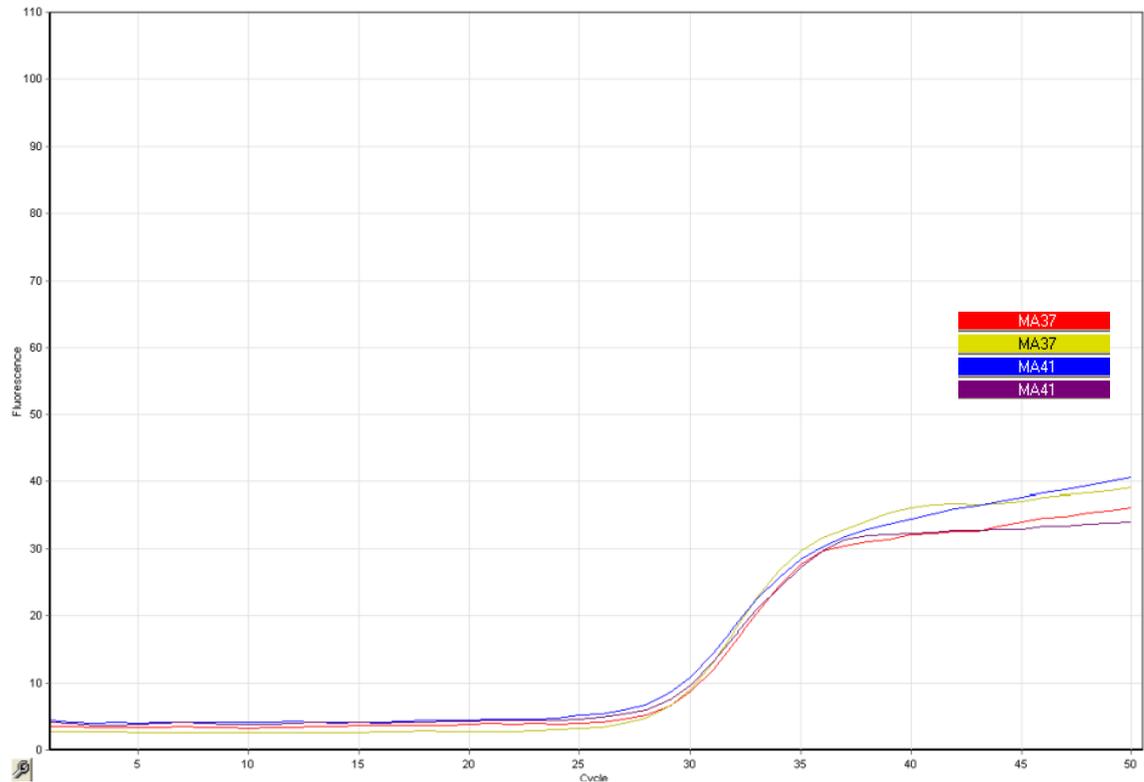
Figura 3 – Gráfico comparativo entre as médias das concentrações de RNA e cDNA, entre as amostras com e sem DNA contaminante do sangue de equinos coletados em tubo PAXgene.



* $P<0,05$

Os cDNA obtidos de duas amostras apresentando DNA contaminante foram submetidos à PCR. A amplificação do fragmento (690 pb) do mRNA do gene MDR1 equino ocorreu entre o 25º e 39º ciclo da PCR em tempo real (Figura 4).

Figura 4 – Gráfico da amplificação, através da PCR em tempo real, do fragmento (690 pb) do mRNA do gene MDR1 extraídos de equinos da raça Crioulo.



MA37: amostra de número 37 amplificada em duplicata (linhas vermelha e amarela).

MA41: amostra de número 41 amplificada em duplicata (linhas azul e roxa).

A coleta de sangue venoso dos equinos a campo com os tubos PAXgene foi realizada sem complicações, sendo o volume sanguíneo obtido na proporção recomendada para o estabilizante.

A utilização de agulha e adaptador para as coletas em tubos PAXgene foi apropriada para uso a campo objetivando a extração de RNA.

5 DISCUSSÃO

A avaliação da expressão gênica através da extração de mRNA de diferentes tecidos permite a realização de estudos clínicos e investigações científicas em vários campos no diagnóstico de enfermidades, acompanhamento da evolução clínica, monitoramento terapêutico e em farmacogenômica. No entanto, além de estar exposto a diferentes ribonucleases endógenas e de fontes contaminantes externas, o fato de o mRNA constituir uma fita única o torna altamente suscetível à degradação, gerando limitações na sua extração e interpretação acurada dos resultados de amplificação (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2012). No sangue, a avaliação da expressão gênica é ainda dificultada pela degradação de mRNA específicos durante o armazenamento e pela indução de genes causada por contato com superfícies externas, manipulação ou ativação da coagulação (RAINEN *et al.*, 2002). Assim, o uso do sangue para estudos da atividade gênica é dependente da viabilização de métodos que permitam coleta, armazenamento e envio de amostras sanguíneas conservando a qualidade e quantidade do RNA presente. Diferentes estudos comprovaram a competência do tubo Paxgene, que contém aditivos específicos para estabilização e conservação de RNA, para análise não só de transcritos gênicos como também de DNA de amostras sanguíneas (RAINEN *et al.*, 2002; CHAI *et al.*, 2005; KRUIHOFFER *et al.*, 2007; BEEKMAN *et al.*, 2009; BAY *et al.*, 2012). Até o momento, não foram encontrados relatos do uso desse sistema para coleta e armazenamento de sangue equino. No presente estudo, a viabilidade de extração do mRNA de sangue equino coletado em tubo PAXgene, foi avaliada por meio da amplificação de gene específico.

A extração do RNA total de sangue equino com o uso do tubo PAXgene foi eficaz em todas as amostras coletadas, conforme demonstradas pelas leituras de fluorimetria. Os valores resultantes foram aproximadamente 10 vezes menores aos obtidos por autores utilizando o PAXgene por meio de espectrofotômetro com absorvância ultravioleta (UV) a 260 nm (RAINEN *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004; CHAI *et al.*, 2005; CARROL *et al.*, 2007). Embora a absorvância UV seja o método mais comumente utilizado para quantificação de DNA ou RNA, sua leitura detecta indiscriminadamente absorção de 260 nm, seja DNA, RNA, proteína, ácidos nucleicos degradados, nucleotídeos livres ou outros contaminantes. A quantificação fluorimétrica

é mais precisa e específica, pois detecta apenas as moléculas de interesse, podendo fornecer valores relativamente menores (BUSTIN *et al.*, 2009; QUBIT..., 2011).

A diferença encontrada nos resultados de RNA total extraídos das amostras sanguíneas entre os animais foi de até quatro vezes. Estudos com humanos saudáveis relataram variação de 2 a 5 vezes entre doadores (RAINEN *et al.*, 2002; CHAI *et al.*, 2005; CARROL *et al.*, 2007). Rainen *et al.* (2002) comentam que embora não se conheça todos os fatores de variabilidade entre indivíduos normais, além da diferença no número de leucócitos nas amostras sanguíneas, a expressão gênica dos reticulócitos também contribui para variações no valor do RNA total. Embora nos equinos não haja liberação de reticulócitos na corrente sanguínea em condições normais, a variação dos valores leucocitários sanguíneos também pode variar consideravelmente entre animais hípidos (GOH *ET al.*, 2007; GONZÁLEZ e SILVA, 2008; PLUMB, 2008).

Além de maior estabilidade do RNA presente no sangue para processamento imediato, o tubo PAXgene foi desenvolvido com o objetivo de permitir o armazenamento da amostra sem que ocorram alterações na degradação ou indução de RNA específicos. No presente estudo, após a coleta do sangue, os tubos permaneceram 2 horas em temperatura ambiente (18°C a 25°C), como tempo mínimo recomendado para a reação de estabilização da amostra, e foram então armazenados por 90 dias a -20°C. Rainen *et al.* (2002) mostraram que a viabilidade do RNA sanguíneo é mantida por até 24h em temperatura ambiente e 12 meses em temperaturas entre -20°C e -80°C. O fato de a amostra coletada poder ser armazenada sem nenhum processamento imediato, mantendo a qualidade do RNA presente, é de importância singular para a espécie utilizada. Animais de grande porte como os equinos, possuem limitações quanto à sua manutenção em centros de pesquisa para estudos *in vivo* e potenciais riscos quanto ao seu transporte até o laboratório, dificultando a realização do processamento das amostras imediatamente após a coleta ou num mesmo momento quando se busca diminuir fatores de variabilidade. A coleta e conservação de amostras de casos clínicos para estudos de afecções genômicas e detecção de características desta ordem, também são vantagens do desenvolvimento de técnicas laboratoriais que permitam tal conservação. Assim, considerando que a distância para envio de amostras sanguíneas desses animais pode representar longo período de transporte, a adequação do tubo PAXgene para o uso em equinos viabiliza futuros estudos de expressão gênica nesta espécie.

Para extração do RNA utilizou-se o *kit* NucleoSpin[®] RNA II. Como o protocolo para processamento de fluidos biológicos não forneceu leituras de RNA total por fluorimetria (resultados não apresentados), utilizou-se a metodologia para tecidos e culturas celulares deste *kit*. Este processo permitiu reduzir a viscosidade, limpar e clarear a amostra para leitura em fluorímetro e se mostrou eficiente para obtenção de mRNA viável para conversão à cDNA. Futuros estudos para adequação e avaliação de protocolos de extração de RNA com *kits* diferentes ao fornecido pelo sistema PAXgene, são necessários para ajuste e validação desta técnica.

Embora 74 % das amostras apresentaram DNA contaminante, o mRNA obtido gerou *amplicons* na PCR em tempo real. A presença de DNA residual é considerada um fator limitante para obtenção de resultados acurados quando buscada a quantificação de transcritos de baixa expressão ou quando utilizado *primer* não específico para amplificação de cDNA (BUSTIN, 2002; CHAI *et al.*, 2005). Chai *et al.* (2005), utilizando o *kit* de extração PAXgene, relatam a presença de DNA contaminante. Estes autores, após submeterem a amostra a um segundo tratamento DNase, obtiveram amostras limpas de DNA residual. No presente trabalho, seguiu-se a recomendação do *kit* utilizado, submetendo as amostras apenas a um tratamento de DNase (TOTAL..., 2010). Os valores de RNA total extraído das amostras com DNA contaminante não apresentaram diferença estatística das concentrações de RNA das amostras livres de DNA. Já os resultados da conversão em cDNA das amostras com DNA residual foram significativamente maiores que aqueles obtidos nas amostras sem contaminação de DNA, corroborando o fato da leitura em fluorímetro com kits para ensaios com DNA (dsDNA HS Assay) não excluïrem fitas duplas de DNA contaminante da amostra (INVITROGEN..., 2010).

Para avaliar a viabilidade do mRNA extraído pela metodologia proposta e a presença do gene MDR1 em equinos da raça Crioulo, duas amostras foram submetidas à PCR em tempo real. Embora o objetivo não tenha sido a quantificação do mRNA amplificado, a formação da curva de amplificação entre o 25° e 39° ciclo demonstrou que o mRNA extraído de sangue equino com o uso do tubo PAXgene é viável para análise de transcritos gênicos. A utilização de *primer* específico para mRNA do gene MDR1 de equinos (LINARDI, 2010) permitiu o uso de amostra com DNA residual para a amplificação do transcrito de interesse. No entanto, Rainen *et al.* (2002) ressaltam que, quando a quantificação da expressão gênica é almejada, estudos controlados para a

determinação da estabilização de genes específicos com o uso do PAXgene são necessários devido a diferentes padrões de comportamento de cada transcrito.

O gene MDR1 tem sido identificado em diferentes tecidos de equinos, incluindo linfócitos sanguíneos (NATALINI E LINARDI, 2006; LINARDI, 2010; TYDÉN *et al.*, 2008). No entanto, a maioria desses estudos utilizou material coletado após eutanásia dos animais. Esta é a primeira vez que sua expressão foi demonstrada em sangue armazenado a partir da extração de células sanguíneas. A importância desse gene na farmacogenética é determinada pela codificação da proteína transmembrana Gp-P, que exerce mecanismo de resistência a drogas através do efluxo de substâncias do meio intracelular. Além do interesse na modulação de sua expressão em relação a variações na farmacocinética de diferentes medicamentos e substâncias químicas, o polimorfismo deste gene, com consequente produção deficiente de Gp-P, tem sido relevante para estudos de intoxicação por fármacos em cães e humanos (MARZOLINI *et al.*, 2004; GEYER *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2008). Embora em equinos não haja relatos de mutação do gene MDR1, poucas raças têm sido estudadas. Considerando que polimorfismos gênicos podem ser raça-específicos, estudos em raças de interesse particular são necessários para identificação de alterações genéticas relevantes. O aparecimento de curva padrão na amplificação de parte do transcrito do gene MDR1 demonstra normalidade gênica deste segmento nos animais avaliados da raça Crioulo.

A coleta das amostras sanguíneas no tubo PAXgene adaptada às condições de manejo comuns aos equinos para flebotomia, mostrou-se simples e de fácil execução para a obtenção das amostras deste trabalho. Em humanos, para permitir que o tubo fique posicionado verticalmente, é indicado que a coleta seja realizada com o uso de escalpe e de um tubo extra para preenchimento prévio deste (PAXGENE..., 2010); no entanto, isto não foi necessário para coleta realizada com o equino em estação.

Dada a crescente expansão da raça Crioulo no Brasil, somando atualmente mais de 300 mil equinos registrados e quase 40 mil criadores (NOTÍCIAS..., 2013), a obtenção de dados genotípicos e a viabilização de metodologias para estudos genéticos favorecerem o aprimoramento de abordagens clínicas e experimentais nesta raça.

6 CONCLUSÕES

O mRNA extraído de amostras submetidas aos métodos de coleta, armazenamento e processamento executados neste trabalho é viável.

A expressão do gene MDR1 pode ser avaliada em sangue armazenado a partir de leucócitos sanguíneos.

O gene MDR1 é expresso em equinos da raça Crioulo.

O uso do PAXgene, descrito neste trabalho, permite que outros estudos possam se beneficiar da análise da expressão gênica a partir de amostras armazenadas de sangue equino.

REFERÊNCIAS

- BAY, V. U. et al. Averaged Differential Expression for the Discovery of Biomarkers in the Blood of Patients with Prostate Cancer. **Journal PLoS ONE**, v. 7, n. 4, e34875, abr. 2012. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0034875>. Acesso em: 04 jul. 2013.
- BEEKMAN, J. M. et al. Recovery of microarray-quality RNA from frozen EDTA blood samples. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 59, n. 1, p. 44-49, 2009. Abstract.
- BELLONE R. R. et al. Differential Gene Expression of TRPM1, the Potential Cause of Congenital Stationary Night Blindness and Coat Spotting Patterns (LP) in the Appaloosa Horse (*Equus caballus*). **Genetics**, v. 179, p. 1861-1870, ago. 2008.
- BRADY, J. M. et al. Tissue distribution and chemical induction of multiple drug resistance genes in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v. 30, n. 7, 2002.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CARROL, E. D. et al. Successful downstream application of the Paxgene blood samples in pediatric patients for quantitative PCR analysis. **BMC Immunology**. v. 8, p. 1-8, set. 2007.
- CHAI, V. et al. Optimization of PAXgene™ blood RNA extraction system for gene expression analysis of clinical samples. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 19, p. 182-188, 2005.
- CHESTERS et al. American Society for Microbiology Detection of Latency-Associated Transcripts of Equid Herpesvirus 1 in Equine Leukocytes but Not in Trigeminal Ganglia. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, n. 5, p. 3437-3443, mai. 1997.
- CORDON-CARDO, C. et al. Multidrug resistance gene is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. **Proceedings National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 86, n. 2, p. 695-698, jan. 1989.
- CUMMINS, C. L. et al. In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: Studies using the rat single-pass intestinal perfusion model. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 305, n. 1, p. 306-314, abr. 2003.

- DAGENAIS, C. et al. Variable modulation of opioid brain uptake by P-glycoprotein in mice. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 67, p. 269-276, 2004.
- DAVIES et al. Diminished Disease Severity in Horses Infected with *Anaplasma phagocytophilum*. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 18, n. 11, p. 1962-1968, nov. 2011.
- FARDEL, O. et al. The P-glycoprotein multidrug transporter. **General Pharmacology**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 1283-1291, 1996.
- FROMM, M. F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 25, n. 8, p. 423-429, aug. 2004.
- GEYER, J. et al. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230 (de14) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. Baltimore, v. 28, p. 95-99, feb. 2005. Abstract.
- GOH, S. et al. The human reticulocyte transcriptome. **Physiological Genomics**, v. 30, p. 172-178, 2007.
- GONZÁLES, F. H. D.; SILVA, S. C. (Ed.). **Patologia clínica veterinária: texto introdutório: texto de apoio ao Curso de Especialização em Análises Clínicas Veterinárias**. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2008. 347 p. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/lacvet/livros/Analises_Clinicas_Vet.pdf>. Acesso em: 14 out. 2013.
- INVITROGEN: Qubit® 2.0 fluorometer: user manual. Carlsbad: Life technologies, 2010. (Catálogo n. Q32866) 40 p.
- JULIANO, R. L., LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 455, n. 1, p. 152-162, nov. 1976.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- KAGEDAL, B. et al. Failure of the PAXgene™ Blood RNA System to maintain mRNA stability in whole blood. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, v. 43, n. 11, p. 1190-1192, out. 2005.
- KRAWIEC, J. A. et al. Modified PAXgene method allows for isolation of high-integrity total RNA from microlitre volumes of mouse whole blood. **Laboratory Animal**, v. 43, n. 4, p. 394-398, out. 2009. Abstract.
- KRUHOFFER et al. Isolation of Microarray-Grade Total RNA, MicroRNA, and DNA from a Single PAXgene Blood RNA Tube. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 9, n. 4, p. 452-458, set. 2007.

LANGEMEIER et al. American Society for Microbiology Detection of Equine Infectious Anemia Viral RNA in Plasma Samples from Recently Infected and Long-Term Inapparent Carrier Animals by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 6, p. 1481-1487, jun. 1996.

LINARDI, R. L. **Role of gastrointestinal multidrug resistance (mdr1) gene and P-glycoprotein (P-gp) in the oral absorption of methadone in horses**. 2010. 156 f. Tese (Doctor of Philosophy) Department of Veterinary Medical Sciences, University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, 2010.

LOCKHART, D. J.; WINZELER E. A. Insight review articles: Genomics, gene expression and DNA arrays. **Nature**, v. 405, jun. 2000.

LOSCHER, W.; POTSCSKA, H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 22-76, 2005. Abstract.

LÖTSCH, J. et al. Drug interactions with patient-controlled analgesia. **Clinical Pharmacokinetics**, New York, v. 41, n. 1, p. 31-57, jan. 2002.

MARTINEZ, M. et al. The pharmacogenomics of Pglycoprotein and its role in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 31, p. 285-300, 2008.

MARZOLINI, C. et al. Polimorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 75, n. 1, p. 13-33, 2004. Abstract.

MATHENY, C. J. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. **Pharmacotherapy**, v. 21, n. 7, p. 778-796, 2001. Abstract.

MEALEY, K. L. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Baltimore, v. 27, p. 257-264, 2004.

MIZUNO, N. et al. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. **Pharmacological Reviews**, St. Louis, v. 55, n. 3, p. 425-461, 2003.

NAKAMURA, Y. et al. Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy horses in Japan. **Vaccine**, Kidlington, v. 13, n. 12, p. 1076-1079, 1995. Abstract.

NATALINI, C. C.; LINARDI, R. L. Influência do gene de resistência múltipla (MDR1) e da P-glicoproteína na farmacocinética e farmacodinâmica de drogas terapêuticas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 298-300, jan.-fev. 2006.

NOTÍCIAS: Cavalo Crioulo é tema de evento em Gramado (RS). Maringá: Instituto de Estudos Pecuários. 19 mar., 2013. Disponível em:

<<http://www.iepec.com/noticia/cavalo-crioulo-e-tema-de-evento-em-gramado-rs>>.

Acesso em 4 jul. 2013.

PAXGENE® Blood RNA: the better the source, the more to explore. Düsseldorf: Qiagen, BD Company, 2010. [16f.]. Disponível em: <www.preanalytix.com>. Acesso em: 20 jun. 2012.

PAXGENE® Blood RNA kit handbook. [Hilden]: Qiagen, 2009. 52p.

PLUMB, C. D. **Plumb's veterinary drug handbook**. 6. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008. 485 p.

QUBIT® 2.0 Fluorometer: accuracy gets you what you're looking for. Carlsbad: Life technologies, 2011. [8 f.]. Disponível em: <www.ebc.uu.se/digitalAssets/120/120354_qubitbrochure.pdf> Acesso em: 03 jul. 2013.

RAINEN, L. et al. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 48, n.11, p. 1883-1890, 2002.

RODRIGUEZ, M. et al. Effects of p-glycoprotein inhibition on methadone analgesia and brain distribution in the rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 56, n. 3, p. 367-374, 2004.

SUN, J. et al. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. **Medical Science Monitor**, Old Westbury, v. 10, n. 1, p. RA5-14, 2004.

THACH et al. Assessment of two methods for handling blood in collection tubes with RNA stabilizing agent for surveillance of gene expression profiles with high density microarrays. **Journal of Immunological Methods**, New York, v. 283, n. 1-2, p. 269-279, out. 2003.

THIEBAUT, F. et al. Cellular localization in normal human tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 84, p. 7735-7738, 1987.

THOMPSON, S. J. et al. Opiate-induced analgesia is increased and prolonged in mice lacking P-glycoprotein. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 92, p. 1392-1399, 2000.

TOTAL RNA isolation: user manual. Düren: Macherey-Nagel, 2010. 46p.

TYDÉN et al. P-glycoprotein in intestines, liver, kidney and lymphocytes in horse. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Baltimore, v. 32, p. 167-176, 2008.

WANG, J. S. et al. Brain penetration of methadone (R)-and(S)-enantiomers is greatly increased by P-glycoprotein deficiency in the blood-brain barrier of Abcb1a gene knockout mice. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 173, n. 1-2, p. 132-138, abr. 2004.

XIE, R. et al. The role of P-glycoprotein in blood-brain barrier transport of morphine: transcortical microdialysis studies in mdr1a (-/-) and mdr1b (+/+) mice. **British Journal of Pharmacology**, Oxford, v. 128, n. 3, p. 563-568, out. 1999.

ZHOU, S.F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. **Xenobiotica**, London, v. 38, n. 7-8, p. 802-832, 2008. Abstract.