

SAÚDE E AMBIENTE

V.8 • N.2 • 2020 - Fluxo Contínuo

ISSN Digital: 2316-3798

ISSN Impresso: 2316-3313

DOI: 10.17564/2316-3798.2020v8n2



## DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS IN SILICO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DA REGIÃO 16S PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

DEVELOPMENT OF *MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS* PRIMERS IN SILICO OF THE 16S  
REGION FOR TUBERCULOSIS DIAGNOSIS

DESARROLLO DE PRIMERS DE *MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS* IN SILICO DE LA REGIÓN 16S PARA EL  
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

Herison Victor Lima Muniz<sup>1</sup>  
Antonio Fialho da Silva Neto<sup>2</sup>  
Luiz Alfredo Torres Sales<sup>3</sup>  
Thalita Rodrigues Soares<sup>4</sup>  
Matheus Silva Alves<sup>5</sup>

## RESUMO

*Mycobacterium tuberculosis* é uma bactéria agente causadora responsável por grande parte dos casos de tuberculose (TB), mostrando-se como um grande problema de saúde pública. A TB é uma doença infectocontagiosa que atinge principalmente os pulmões, além de outros órgãos como rins, intestinos e meninges. O objetivo deste estudo foi desenhar e analisar primers de *M. tuberculosis* strain H37Rv da região 16S do rDNA para fins de diagnóstico molecular da tuberculose pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi utilizado a plataforma NCBI para obter a sequência completa do gene específico de *M. tuberculosis*, em seguida, cinco primers foram desenhados pela ferramenta BLAST do NCBI e analisados pela IDT *integrated DNA Technologies*, utilizando a ferramenta OligoAnalyzer. A partir da análise e desenho *in silico* dos cinco primers, foi observado que todos eles estavam dentro dos parâmetros estabelecidos. Sendo assim, os primers em teoria são eficientes para amplificar pares de bases e ser útil para o diagnóstico da tuberculose.

## PALAVRAS-CHAVE

Diagnóstico, PCR, Primers, Tuberculose.

## ABSTRACT

*Mycobacterium tuberculosis* is a bacterium which is responsible for the control of tuberculosis cases, proving to be a major public health problem. Tuberculosis is an infectious disease that is mainly concentrated in the lungs, in addition to other organs such as kidneys, intestines and meninges. The objective of this study was to design and analyze primers of *M. tuberculosis* strain H37Rv from the 16S rDNA region for the molecular diagnosis of tuberculosis by Polymerase Chain Reaction (PCR). The NCBI platform was used to obtain the complete sequence of the specific *M. tuberculosis* gene, then five primers were designed by NCBI's BLAST tool and analyzed by IDT integrated DNA Technologies using the OligoAnalyzer tool. From the analysis and in *silico* design of the five primers, it was observed that all of them were within the established parameters. Thus, the primers in theory are efficient to amplify base pairs and be useful for the diagnosis of tuberculosis.

## KEYWORDS

Diagnosis, PCR, Primers, Tuberculosis.

## RESUMEN

*Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria el agente causante responsable de gran parte de los casos de tuberculosis (TB), que se muestra como un gran problema de salud pública. La TB es una enfermedad infectocontagiosa que afecta principalmente a los pulmones, además de otros órganos como riñones, intestinos y meninges. El objetivo de este estudio fue diseñar y analizar primers de *M. tuberculosis* strain H37Rv de la región 16S del rDNA para fines de diagnóstico molecular de la tuberculosis por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se utilizó la plataforma NCBI para obtener la secuencia completa del gen específico de *M. tuberculosis*, luego cinco primers fueron diseñados por la herramienta BLAST del NCBI y analizados por IDT Integrated DNA Technologies, utilizando la herramienta OligoAnalyzer. A partir de análisis y diseño in *silico* de los cinco primers, se observó que todos ellos estaban dentro de los parámetros establecidos. Siendo así, los primers en teoría son eficientes para amplificar pares de bases y ser útil para el diagnóstico de la tuberculosis.

## PALABRAS-CLAVE

Diagnóstico, PCR, Primers, Tuberculosis.

## 1 INTRODUÇÃO

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), produzida em 1983 por Kary B. Mullis, tem evoluído significativamente para a eficiência do diagnóstico molecular diante de agente infeccioso, demonstrando maior sensibilidade na detecção e análise dos resultados (FULLSTON, 2019; CAVALCANTI *et al.*, 2008).

No manuseio da PCR, são requeridos os DNTP (nucleotídeos) que irão estruturar a nova fita de DNA, dentre eles o tampão que irá regular o pH da reação, a Taq polimerase, enzima responsável por promover a amplificação das fitas de DNA, os primers (iniciadores), o cloreto de magnésio, atuando como cofator enzimático e a fita molde de DNA a ser estudado (FULLSTON, 2019).

Com o avanço da bioinformática, foi possível desenvolver ferramentas que auxiliassem nas pesquisas atuais, dentre elas o desenho de primers para PCR diante do *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (MORAIS *et al.*, 2019). Essa plataforma, propicia a sequência genômica necessária para a criação de primers, evidenciando o determinado tipo de microrganismo a ser analisado (seja DNA ou RNA), quanto à região em que se deseja amplificar (genoma completo ou mRNA 16s) (QUEIROZ *et al.*, 2017).

No manuseio do desenho de primers, deve-se atentar aos padrões de qualidade que irão determinar a eficiência de um primer, os quais são efetuados por meio de programas computacionais (BANAGANAPALLI *et al.*, 2019). Para a determinação das estruturas do primer pela sequência desejada, é utilizado a plataforma primer BLAST, oriunda do NCBI. Essa ferramenta determina a sequência dos primers (sense e antisense), o tamanho dos pares de base, a temperatura de *melting* e porcentagem de G:C (YE *et al.*, 2012).

Durante esse processo, utiliza-se majoritariamente a ferramenta OligoAnalyzer para analisar os aspectos termodinâmicos da sequência de primer. Esta técnica evidencia o padrão exergônico da reação, por meio do valor do  $\Delta G$  (Energia Livre de Gibbs). Sendo assim, reações com alto valor exergônico tendem a induzir formações de variáveis conhecidas como dímeros intra ou inter primers (self dimer, hetero dimer), *hairpins* (grampos) e o aparecimento de produtos inespecíficos, os quais interferem na amplificação dos produtos desejados. Desse modo, a etapa de desenho dos primers (primer design) é provavelmente a mais importante para uma boa reação de PCR (BUTLER *et al.*, 2001; VIEIRA, 2011.).

Neste estudo, o patógeno escolhido como modelo para diagnóstico por meio da utilização de primers foi *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador responsável por grande parte dos casos de tuberculose (TB), a bactéria mostra-se como um grande problema de saúde pública, apresentando grande resistência hospitalar dentre as infecções primárias e secundárias (SCHÖN *et al.*, 2017).

Há pacientes que não completam o tratamento e continuam enfermos como fonte de contágio para a família e a população. O abandono do tratamento resulta no desenvolvimento de bactérias multirresistentes (CHIRINOS *et al.*, 2017).

A detecção e identificação do agente não é simples, a sensibilidade e especificidade do teste cutâneo (PPD) e morosidade para confirmação da presença do micro-organismo pelos métodos la-

boratoriais comuns (RORING *et al.*, 2000; ZANINI *et al.*, 2001). O diagnóstico molecular ocorre por detecção de sequências nucleotídicas específicas do micro-organismo, de suma importância para a confirmação da Tuberculose em um período mais baixo e sensibilidade elevada (GARCÍA, 1990).

Nesse sentido o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e avaliação dos parâmetros de um par de primer para identificar o micro-organismo *Mycobacterium tuberculosis* causador da tuberculose.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 SELEÇÃO DO GENE ALVO

A sequência do gene alvo foi retirada do Genbank<sup>6</sup> do *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) disponível no site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. No qual, dentro do campo de pesquisa foi selecionado o buscador “Nucleotide” e, conseqüente, foi encontrado o gene completo de *Mycobacterium tuberculosis* da região 16S, por meio da busca pelo nome científico da bactéria e região ribossômica de estudo, em seguida, a sequência foi colocada no formato FASTA para visualização do gene conservado específico.

### 2.2 DESENHO DO PRIMER E AVALIAÇÃO

Foi adicionada, utilizando o software livre on-line “Primer-BLAST”<sup>7</sup>, a sequência alvo da região 16S e configurada as características dos pares de primers (tamanho do fragmento e temperatura de anelamento), são sugeridos 5 primers.

Os cinco primers que foram desenhados pela ferramenta BLAST do NCBI, foram submetidos a outra ferramenta, disponível no site *Integrated DNA Technologies*, o OligoAnalyzer<sup>8</sup>. Essa ferramenta estabelece padrões de primers ideais, tais características são; temperatura MELT (°C), variando entre 50 a 60 com diferenças de temperaturas que não ultrapassassem 5 °C, quantidade de CG entre 40 a 60%, quantidade de nucleotídeos entre 18 e 25 bases e o tamanho do segmento de DNA entre 150 e 250pb e, em relação aos dímeros, HAIRPIN-DIMER com valores de temperatura *melting* abaixo de 50°C, SELF-DIMER com valores maiores que -10 kcal/mole<sup>-1</sup> HETERO-DIMER, seguindo o mesmo critério do item anterior.

6 GENBANK. Submitting sequence data to GenBank. In: National Center for Biotechnology Information [on line]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 5 maio 2019.

7 Primer-BLAST. Finding primers specific to your PCR template In: Integrated DNA Technologies [on line]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Acesso em: 5 maio 2019.

8 OligoAnalyzer. Your Advocate for the Genomics Age In: Integrated DNA Technologies [on-line]. Disponível em: <https://www.idtdna.com/pages>. Acesso em: 5 maio 2019.

### 3 RESULTADOS

A partir do desenho e análise *in silico* dos cinco primers, foi confirmado o consenso entre as pesquisas científicas semelhantes em relação ao desenvolvimento de pequenas sequências de DNA disponíveis na literatura. Os primers selecionados possuem um tamanho de 20pb, as temperaturas de fusão (*T<sub>melting</sub>*) apresentaram valores de intervalo entre 51.7 °C e 52.5 °C e a concentração de CG%, de 40 a 50% conforme descrito na Tabela 1.

Em relação aos dímeros, o *hairpin* apresentou valores de temperatura de *melting* menores que 50°C em todos os primers analisados, com exceção do primer 1 com 51.6°C no sentido sense, sendo também verificado os valores de Delta G nos quais foram valores maiores que -10. kcal.mole<sup>-1</sup>.

Os valores de *self-dimer* mantiveram uma variação de -4.41 kcal.mole<sup>-1</sup> e -9.75 kcal.mole<sup>-1</sup>, valores maiores que -10 kcal.mole<sup>-1</sup> (TABELA 1). O hetero-dimer apresentou variação de -6.62 kcal.mole<sup>-1</sup> e -8.02 kcal.mole<sup>-1</sup>, juntamente com valores maiores que -10 kcal.mole<sup>-1</sup> (TABELA 1). Dentre os 5 primers desenhados e analisados, observou-se que o primer 3 obteve as melhores características, pois ele está dentro de todos os parâmetros estabelecidos na análise.

Todos os primers obedeceram aos critérios e parâmetros estabelecidos para os seus desenvolvimentos, seguindo uma ordem cronológica, observando-se cada característica termodinâmica individualmente. O primer 1 não é a melhor escolha devido ao aparecimento de três bases nitrogenadas (T) na sua porção 3', garantindo pouca estabilidade mesmo dentro dos parâmetros gerais da pesquisa; o primer 2 apesar de possuir todas as características que garantem um bom funcionamento, foi inespecífico em relação ao complexo de *Mycobacterium*, podendo ser otimizado com futuros experimentos.

Já o primer 3 é a melhor escolha, pois além de possuir todas as características possíveis, demonstrou-se específico para o complexo de bactérias que possuem a capacidade de disseminar tuberculose nos indivíduos; os primers 4 e 5 também não demonstraram ser específicos, sendo que o primer 5 possui três bases nitrogenadas (T) em sua porção 3' no sentido sense, assim como o primer 1.

Tabela 1 – Primers de *M. tuberculosis* desenhados e analisados com os parâmetros estabelecidos.

Primers de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tamanho	Sequência 5' - 3'	Sentido	Temperatura melting (°C)	%CG	HD (°C)/G Kcal.mole <sup>-1</sup>	SD Kcal.mole <sup>-1</sup>	HD Kcal.mole <sup>-1</sup>
Primer 1	20	TTCGGGTTGTAAACCCTCTTT	Sense	51.7	40	51.6/2.63	-6.36	-6.68
	20	ACAGTTAAGCCGTGAGATTT	Anti-Sense	51.8	40	17/0.5	-4.85	-6.68
Primer 2	20	TTTGAGAGTTTGATCCTGG	Sense	52.2	45	32.2/0.69	-4.64	-6.62
	20	GGTATTAGACCCAGTTCC	Anti-Sense	52.3	50	36.1/0.77	-4.41	-6.62
Primer 3	20	AATCCTTAAAAAGCCGGTCTC	Sense	52.5	45	14.6/0.63	-9.75	-8.02
	20	TGTACCAGCTTTCATGACG	Anti-Sense	52.5	45	-0.7/1.13	-8.53	-8.02
Primer 4	20	AAGAACCTTACCCTGGGTTG	Sense	52.4	45	46/-1.52	-6.36	-7.57
	20	ATAAGGGGCATGATGACTG	Anti-Sense	52.4	45	25.7/0.06	-5.38	-7.57
Primer 5	20	GAAGAACCTTACCCTGGGTTT	Sense	52.1	45	46/-1.25	-6.36	-7.57
	20	CATAAGGGGCATGATGACTT	Anti-Sense	52.4	45	21.2/0.32	-5.38	-7.57

Legenda: CG = Citosina e Guanina; HD = Harpin Dimer; SD = Self Dimer; HD = Hetero Dimer.  
 Fonte: Dados da pesquisa.

## 4 DISCUSSÃO

É possível observar, analisando os dados empregados no desenvolvimento da presente pesquisa, de maneira geral, que a avaliação dos parâmetros estabelecidos está de acordo com estudos já realizados na literatura. Quanto ao comprimento, todos os primers permaneceram com o mesmo tamanho de 18 pares de bases, mesmo sua extensão variando entre valores menores e maiores, continua dentro as características essenciais (HACKING; HULL, 2002).

Em relação a concentração da quantidade de CG dos primers desenhados, estão numericamente dentro dos padrões utilizados entre 40 e 60%, sendo semelhante padrão utilizado nos estudos de Kalendar e colaboradores (2011) que estudaram as ferramentas para desenho de primer *in silico*.

A temperatura de *melting* obteve uma variância de 51.7°C e 52.5°C do primer 1 e do primer 3, respectivamente. É recomendado que não ocorra sequências autocomplementares para evitar a formação de possíveis dímeros de *primers*. A temperatura de anelamento é uma variável importante que também está relacionado com favorecimento da apresentação de bases complementares e suas possíveis ligações indesejáveis, pois formam fragmentos inespecíficos (WANG; SEED, 2003).

Essa temperatura está diretamente associada ao que chamamos de energia livre de Gibbs (Delta G), que mensura as formações de estruturas primárias e secundárias, quando menor os valores de Delta G, mais espontaneamente acontecerá em uma reação química. Analisando os valores de Delta G ( $\Delta G$ ) de self-dímeros, houve uma variação de -4.41 a -9.75 kcal.mole<sup>-1</sup>. Nesta avaliação, esperava-se encontrar valores que fossem maiores que -10 kcal.mole<sup>-1</sup> e, todos os primers obtiveram esses resultados com o que garante maior chance de não ocorrer formação inespecíficas e esse parâmetro está de acordo com o descrito por Ingh e Kumar (2001).

O nosso trabalho também avaliou a formação e estruturas secundárias que são conhecidas como Dimers. Estruturas secundárias de primers podem reduzir a eficiência da PCR. Nosso algoritmo, como os de muitos programas existentes de projeto de primers, seleciona a autocomplementaridade do primer, que é o mais importante determinante para estruturas secundárias. A formação dessa estrutura está relacionada com a espontaneidade de formação como descrito anteriormente com a energia livre de Gibbs. E os valores encontrados estavam de acordo com o trabalho de Wang e Seed (2003).

É imprescindível um bom desenho de primer no diagnóstico molecular, pois estes necessitam ser específicos para detectar o gene de interesse, diminuindo a possibilidade de amplificação de regiões inespecíficas e a formação de estruturas secundárias que interfiram em alguma etapa da análise dentro da reação.

## 5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento *in silico* de primers vem sendo utilizado frequentemente para estudos moleculares. Por meio das ferramentas de bioinformática é possível obter resultados que possam garantir

a eficiência na construção de primers na amplificação de sequências de DNA, diminuindo assim a probabilidade de erros que possam interferir na Reação em Cadeia da Polimerase.

A vasta disponibilidade de dados nos bancos de dados auxilia na escolha das regiões que se pretende estudar, garantindo autonomia, economia de tempo e de recursos laboratoriais para o pesquisador. Com os resultados obtidos é possível ter uma base de parâmetros que podem ser utilizados em futuras pesquisas científicas que envolvam o desenvolvimento *in silico* de primers, principalmente para fins de diagnóstico molecular de doenças.

Assim, o estudo por meio de ferramentas de bioinformática mostra-se como um importante recurso que visa facilitar a busca e disseminação científica para análise de DNA em programas computacionais disponíveis.

## REFERÊNCIAS

BANAGANAPALLI, B. *et al.* In Silico PCR. *In*: SHAIK, N. A., HAKEEM, K. R.; BANAGANAPALLI, B.; ELANGO, R. (Ed.). **Essentials of Bioinformatics, Volume I**. Springer, Cham, 2019. p. 355-371.

BUTLER, J. M. *et al.* Quality control of PCR primers used in multiplex STR amplification reactions. **Forensic Sci. Int.**, v. 119, n. 1, p. 87-96, 2001.

CAVALCANTI, M. P. C. *et al.* Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Rev. Patol. Trop.**, v. 37, n. 1, p. 1-14, 2008.

CHIRINOS, N. E. C. *et al.* A relação das representações sociais dos profissionais da saúde e das pessoas com tuberculose com o abandono do tratamento. **Texto Contexto Enferm.**, v. 26, n. 1, e5650015, 2017.

FULLSTON, E. F. *et al.* Clinical impact of rapid polymerase chain reaction (PCR) test for group B *Streptococcus* (GBS) in term women with ruptured membranes. **Irish J. M. Sci.**, v. 188, n. 4, p. 1269-1274, 2019.

GARCÍA, M. Hibridación de ácidos nucleicos: fundamentos y aplicaciones. **Bol. Sanit. Panam.**, v. 109, n. 3, p. 244-257, 1990.

HACKING, D.; HULL, J. Respiratory syncytial virus – viral biology and the host response. **J. Infect.**, v. 45, n. 1, p. 18-24, 2002

INGH, V. K.; KUMAR, A. PCR primer design. **Mol. Biol. Today**, v. 2, n. 2, p. 27-32, 2001.



KALENDAR, R. *et al.* Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. **Genomics**, v. 98, n. 2, p. 137-144, 2011.

MORAIS, R.C.S. **Ensaio de multiplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de Leishmania spp. relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana.** 2019. 129f. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Recife, 2019.

QUEIROZ, J. A. S. *et al.* Desenho e validação de primers *in silico* para detecção do vírus sincicial respiratório humano. **Rev. FIMCA**, v. 4, n. 1, p. 17-30, 2017.

RORING, S. *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. **Vet. Microbiol.**, v.74, p. 227- 236, 2000.

SCHÖN, T. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. **Clin. Microbiol. Infec.**, v. 23, n. 3, p. 154-160, 2017.

VIEIRA, D.P. **Técnicas de PCR:** aplicações e padronização de reações. V. 30, 2011. On-line. Disponível em: <http://www.imtsp.fm.usp.br/Protocolo/aula1.pdf>, Acesso em: 5 maio 2019.

WANG, X.; SEED, B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 24, p. e154, 2003.

YE, J. *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

ZANINI, M. S. *et al.* *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 809-813, 2001.

---

**Recebido em:** 30 de Março de 2018

**Avaliado em:** 5 de Maio de 2018

**Aceito em:** 10 de Agosto de 2018

---



A autenticidade desse artigo pode ser conferida no site <https://periodicos.set.edu.br>

---

1 Acadêmico em Biomedicina, Universidade Ceuma.  
E-mail: herison.victor@hotmail.com

2 Acadêmico em Biomedicina, Universidade Ceuma.  
E-mail: antoniofialho16@gmail.com

3 Acadêmico em Biomedicina, Universidade Ceuma.  
E-mail: luizalfredo.torressales@gmail.com

4 Acadêmica em Biomedicina, Universidade Ceuma.  
E-mail: thalitarodriguessoares@outlook.com.br

5 Mestre em Biologia Parasitária; Doutorando em Biotecnologia e Biodiversidade; Professor, Universidade Ceuma.  
E-mail: Matheus.alves@ceuma.com



Este artigo é licenciado na modalidade acesso abertosob a Atribuição-Compartilha Igual CC BY-SA

