

## COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA DE AMOSTRAS DE SANGUE DE HAMSTER SÍRIO DOURADO

ANAEL DA LUZ MOREIRA<sup>1</sup>; TIFFANY THUROW BUNDE<sup>2</sup>; JADY DUARTE NOGUEIRA<sup>3</sup>; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA<sup>4</sup>; MARA ANDRADE COLARES MAIA<sup>5</sup>; THAIS LARRÉ OLIVEIRA BOHN<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [anaeldaluz@gmail.com](mailto:anaeldaluz@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [tiffsthurow@gmail.com](mailto:tiffsthurow@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [jadyduartenogueira2@hotmail.com](mailto:jadyduartenogueira2@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [oliveiranatasha@hotmail.com](mailto:oliveiranatasha@hotmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [maracmaia@hotmail.com](mailto:maracmaia@hotmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [thais.larreoliveira@gmail.com](mailto:thais.larreoliveira@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A técnica de PCR quantitativo de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) consiste em uma variação do PCR convencional que permite acompanhar simultaneamente a duplicação dos ácidos nucleicos através do uso de sondas fluorescentes (HARSHITHA et al. 2021). Essa técnica possui várias aplicações, como diagnóstico de doenças infecciosas, estudos de biomarcadores e análise do perfil de expressão de genes, como dito por VALONES et al. 2009. A partir da avaliação da expressão gênica, é possível traçar os níveis da transcrição de diversos produtos celulares, como citocinas e quimiocinas e, assim analisar o perfil de resposta imune celular em modelos experimentais (BUSTIN e NOLAN 2004).

A primeira etapa para este tipo de análise é a obtenção de mRNA, a qual é feita através da extração do RNA total diretamente da amostra. Os protocolos de extração variam conforme o tipo de amostra, dos reagentes utilizados e do objetivo do experimento (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987). Cada protocolo afeta diretamente a qualidade e a concentração do RNA obtido. Os mais comumente empregados são protocolos que utilizam soluções caseiras, juntamente com solventes como TRIzol, para separação do RNA, como descrito em RIO et al. 2010. Protocolos mais refinados utilizam kits comerciais para a extração, na qual o RNA é concentrado com o uso de colunas de sílica, estas que possuem afinidade físico-química pelo RNA, consequentemente elevando sua concentração e pureza. O índice de pureza do RNA pode ser avaliado pela medida da absorbância por espectrofotometria (Abs) e posterior cálculo da razão da Abs 260nm/280nm, que identifica contaminações por proteínas, como explicado em MOREIRA e AGOSTINHO, 2021.

O tecido sanguíneo é uma das principais amostras a serem utilizadas para análise de perfis de expressão gênica, pois o mesmo, por abranger todos os demais tecidos e órgãos, possui diversos tipos e produtos celulares que demonstram o estado do metabolismo do organismo (JOEHANES et al. 2013). Além disso, o sangue é uma amostra acessível, pois possui uma coleta menos invasiva e mais simples, sem a necessidade de isolamento e cultivo de tipos celulares específicos. Sendo assim, esta é uma amostra mais prática para a avaliação da resposta celular através da análise dos níveis transcricionais de citocinas (DEBEY et al. 2004). O hamster sírio dourado é um modelo experimental vastamente usado para estudo de doenças infecciosas e não transmissíveis e tem sido empregado pelo nosso grupo de pesquisa para análise de eficácia de vacinas recombinantes contra leptospirose. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar dois diferentes protocolos para a extração de RNA do tecido sanguíneo de hamster sírio-dourado

para posterior utilização na análise da resposta celular induzida por vacinas recombinantes neste modelo animal através de RT-qPCR.

## 2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção das amostras: Quatro hamsters sírio-dourados com idade de quatro a seis semanas foram utilizados para realizar a coleta de sangue (CEUA 022906/2023-38). Os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia inalatória, seguido de punção cardíaca para retirada do volume total de sangue, o qual foi distribuído em tubos contendo cerca de 500 µl de sangue e 10 µl de EDTA 10% para prevenir a coagulação da amostra. Posteriormente, foi adicionado 1,2 ml de RNAlater, para estabilizar e proteger o RNA contra degradação por ribonucleases. O volume coletado foi armazenado a -80 °C.

2.2 Extração de RNA do sangue: As alíquotas de sangue foram descongeladas a temperatura ambiente e submetidas a dois protocolos para extração de RNA. Para o protocolo 1, foram utilizadas amostras de 750 µl de sangue e o kit comercial Purelink (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo as instruções do fabricante. Já o segundo protocolo utilizado foi baseado no kit comercial Rneasy (*Qiagen*), com adaptações. Inicialmente foi feito o descongelamento da amostra, em temperatura ambiente, posteriormente foi realizada a centrifugação em uma rotação de 16.000 × *g* por 1 minuto a temperatura ambiente, seguido do descarte do sobrenadante. O pellet foi ressuspensionado em 500 µl de H<sub>2</sub>O livre de RNase. Foi alíquotado 250 µl do sangue diluído em um novo tubo livre de RNases. Posteriormente, foi acrescido 750 µl de TRIzol e o eppendorf foi submetido a agitação severa utilizando o vórtex. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, após foi adicionado 200 µl de clorofórmio e o eppendorf foi homogeneizado por inversão durante 20 segundos. A amostra foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada em uma rotação de 12.000 × *g* durante 15 minutos na temperatura de 4 °C. A fase superior aquosa e translúcida da solução, contendo o RNA, foi cuidadosamente coletada e transferida para um novo tubo livre de RNases. A fase contendo o RNA foi acrescida de etanol absoluto no mesmo volume alíquotado e submetido a uma agitação severa utilizando o vórtex. Posteriormente, essa amostra foi transferida para uma coluna de sílica do kit comercial Rneasy (*Qiagen*) e centrifugado a 12.000 × *g* durante 45 segundos, seguido do descarte do filtrado. Foram realizadas etapas de lavagem utilizando os reagentes *Wash Buffer* I e II e, por fim, o RNA foi eluído em 35 µl de H<sub>2</sub>O livre de RNases na temperatura de 60 °C. As amostras de RNA total obtidas foram quantificadas utilizando o equipamento Nanodrop através da medida da absorbância a 260<sub>nm</sub>/280<sub>nm</sub> para avaliação da concentração e pureza e, então, armazenadas à - 80 °C.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os protocolos utilizados para extração do RNA de amostras de sangue de hamsters resultaram em concentrações amplamente divergentes quando avaliadas as mesmas amostras (Tabela 1).

**Tabela 1. Concentração de RNA comparando o protocolo 1 e protocolo 2**

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÃO PROTOCOLO 1	CONCENTRAÇÃO PROTOCOLO 2
1	24 ng/μl	146 ng/μl
2	27 ng/μl	241,2 ng/μl
3	2,2 ng/μl	115,1 ng/μl
4	6,4 ng/μl	178,6 ng/μl

O segundo protocolo, utilizando o TRIzol em combinação com o kit comercial Rneasy, se mostrou com uma eficiência superior, elevando a concentração das amostras 1-4 em 508%, 793%, 5.132% e 2.691%, respectivamente. Dentre as possíveis causas que contribuíram para as diferenças nas concentrações, uma delas é a utilização de diferentes kits comerciais. O PureLink realiza a lise das células com detergentes, já no segundo protocolo, foi utilizado o TRIzol para realizar a lise das células, um reagente conhecido por ser muito eficiente nessa função, mesmo com baixa concentração celular, como descrito por RIO et al. 2010. Além disso, no PureLink ocorre a ligação direta do RNA à coluna de sílica, portanto se a amostra possui muitos contaminantes e inibidores, isso pode afetar a ligação do RNA. No entanto, o principal fator responsável pelo aumento da concentração de RNA, é a diluição prévia do sangue com H<sub>2</sub>O livre de RNases. O tecido sanguíneo é rico em RNases, que degradam rapidamente o RNA. Portanto, a diluição prévia com água pode acarretar a diminuição da eficiência destas enzimas através da redução da concentração enzimática (BENDER et al. 2020).

Em relação a pureza obtida, não houve uma diferença expressiva quando ambos os protocolos foram comparados, conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2. Pureza do RNA (razão 260<sub>nm</sub>/280<sub>nm</sub>) comparando o protocolo 1 e protocolo 2**

AMOSTRAS	PUREZA PROTOCOLO 1	PUREZA PROTOCOLO 2
1	2,03	1,82
2	2,03	1,84
3	2,31	2,01
4	2,06	2,06

Todas as amostras permaneceram dentro da faixa ideal de razão entre as absorbâncias 260<sub>nm</sub>/280<sub>nm</sub> (1,8 a 2), o que já era esperado, já que em ambos os protocolos foi utilizado uma coluna de sílica comercial para realizar as etapas de lavagem e purificação do RNA. No entanto, as amostras 3 e 4 tiveram uma pureza inferior utilizando o protocolo 2, isso provavelmente se deve ao fato de que, nesse protocolo primeiro foi realizado a extração orgânica, portanto houve a separação entre as fases que contém RNA, DNA, proteínas e lipídeos. Sendo assim, durante a coleta da fase aquosa, que contém o RNA, pode ter sido coletado junto algum contaminante que se ligou na coluna de sílica, conforme descrito por RIO et al (2010). Mas ainda assim, as razões permaneceram ideais para posterior utilização.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a diluição prévia da amostra com água, etapa empregada no segundo protocolo, reduziu significativamente a concentração de contaminantes presentes na amostra. Assim, este protocolo se mostrou mais eficiente para a obtenção de RNA total a partir de amostras de sangue de hamster sirio-dourado com maior concentração e pureza adequada para análises posteriores de expressão gênica por RT-qPCR.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENDER, A. T.; SULLIVAN, B. P.; LILLIS, L.; POSNER, J. D. Enzymatic and Chemical-Based Methods to Inactivate Endogenous Blood Ribonucleases for Nucleic Acid Diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 22, n. 8, p. 1030-1040, ago. 2020. DOI: [10.1016/j.jmoldx.2020.04.211](https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.04.211). Disponível em [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7416074/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7416074/).
- DEBEY, S. et al. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *Pharmacogenomics Journal*, v. 4, n. 3, p. 193-207, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500240>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32450280/>.
- FERREIRA, M. R. de S.; GALVÃO, A. P. O.; VALENÇA, M. M.; MARTINS, D. B. G. Storage and purification adaptations for the isolation of total RNA from the dura mater. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 80, n. 12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0042-1758865>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/anp/a/Lt9DgYZDkd7WzCR5nkPyJvH/?lang=en>.
- HARSHITHA, R.; ARUNRAJ, D. R. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 49, n. 5, p. 800–812, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmb.21552>.
- JOEHANES, R. et al. Gene expression signatures of coronary heart disease. *\*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology\**, v. 33, n. 6, p. 1418-1426, 2013. DOI: [10.1161/ATVBAHA.112.301169](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.301169). Disponível em: [https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.301169](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.301169).
- MOREIRA, T. C. G.; AGOSTINHO, L. A. Analysis of the qPCR Assay Efficacy as Molecular Diagnostic in Patients with Chemotherapy and/or Antibiotic Therapy. *\*Brazilian Archives of Biology and Technology\**, v. 64, e21190423, 2021. DOI: [10.1590/1678-4324-2021190423](https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021190423). Disponível em: [https://www.scielo.br/j/babt/a/Lt9DgYZDkd7WzCR5nkPyJvH/?lang=en](https://www.scielo.br/j/babt/a/Lt9DgYZDkd7WzCR5nkPyJvH/?lang=en).
- RIO, D. C.; ARES, M. Jr.; HANNON, G. J.; NILSEN, T. W. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2010, n. 6, p. pdb.prot5439, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3289123/>.
- VALONES, M. A. A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>. PMID: 2440339.
- ZHAO, Y.-B.; KRISHNAN, J. mRNA translation and protein synthesis: na analysis of different modelling methodologies and a new PBN based approach. *BMC Systems Biology*, v. 8, n. 25, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-25>. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1752-0509/8/25>.