

ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE RNA A PARTIR DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS BOVINAS

SILVA, Lucas^{1*}; BARRETO, Bruna¹; LESSA, Ingrid¹; MARTINS, Amanda¹; DELLAGOSTIN, Eduardo¹; BLODORN, Eduardo¹; DANELUZ, Larissa¹; DOMINGUES, William¹; SILVEIRA, Tony¹; CAMPOS, Vinicius¹.

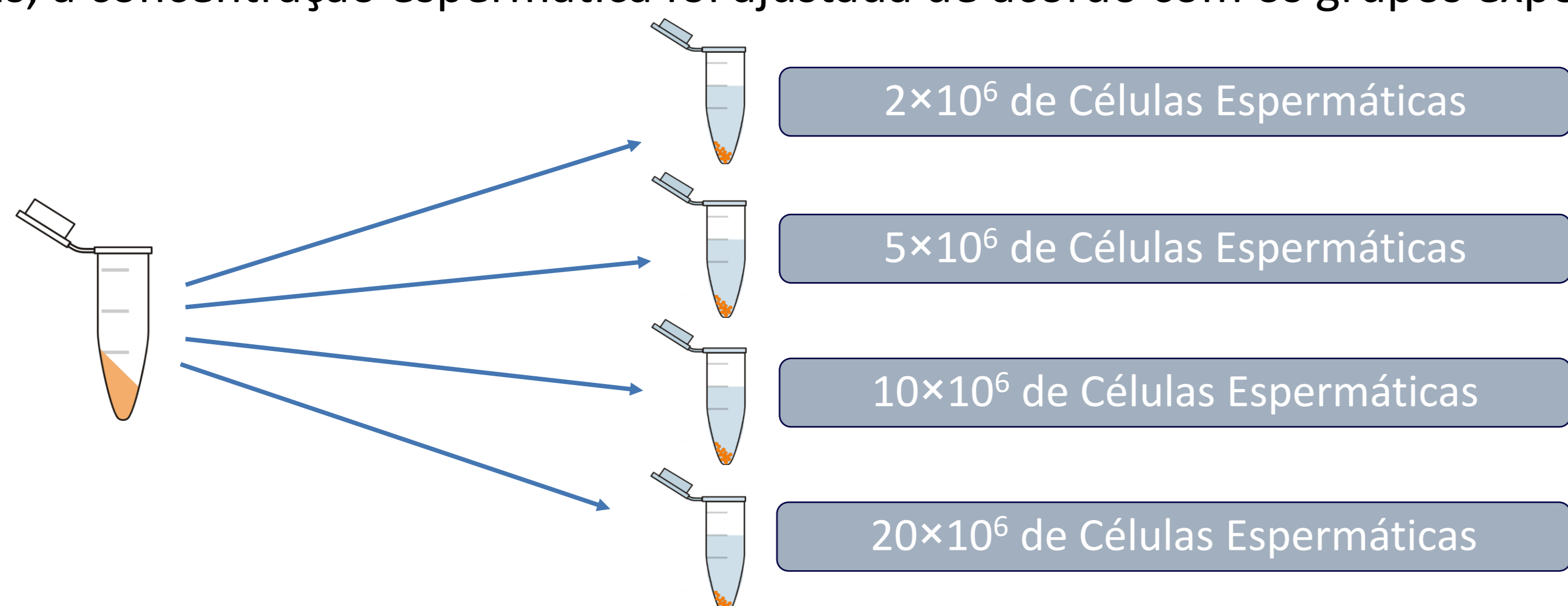
¹Laboratório de Genômica Estrutural - Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.
*E-mail: lucassantos_17@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

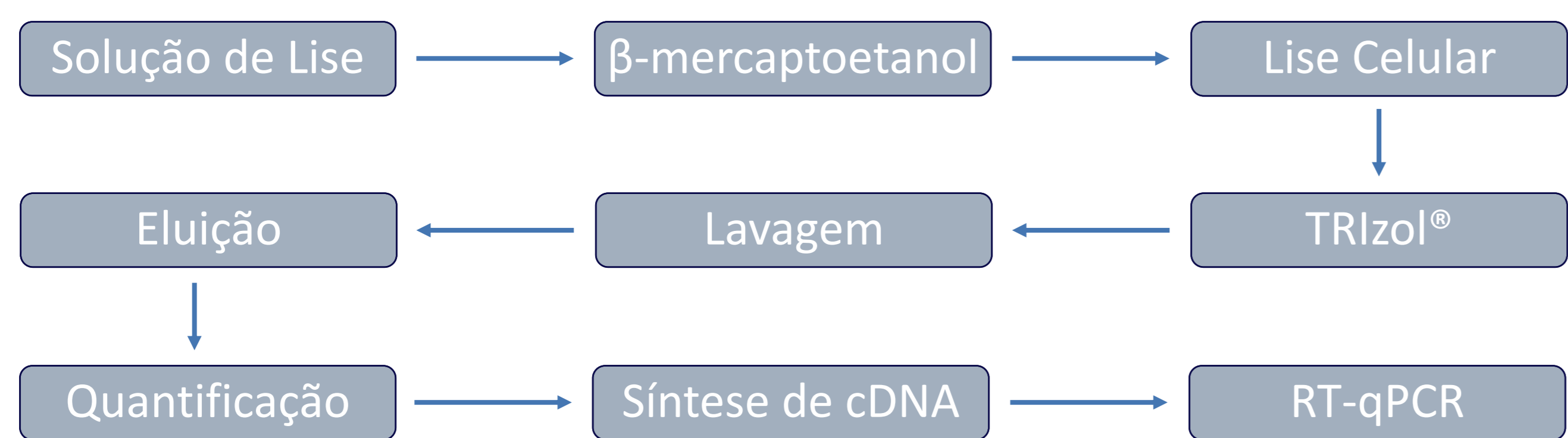
O genoma de eucariotos é capaz de produzir RNAs não codificantes (ncRNAs) para síntese proteica, a partir de RNAs mensageiros (mRNA). Dentre as classes de ncRNAs, os microRNAs (miRNAs) são caracterizados por serem moléculas pequenas que apresentam função de regulação pós-transcricional da expressão gênica, seja pela degradação ou pelo bloqueio na tradução do seu mRNA alvo. Em células espermáticas bovinas há uma grande variedade de miRNAs, sendo que a expressão diferencial de alguns desses transcritos está associada com a fertilidade de touros, sugerindo que os miRNAs influenciam o potencial de fertilização desses animais (GOVINDARAJU et al., 2012). Buscando subsidiar futuros estudos sobre o papel dos miRNAs sobre a qualidade espermática em bovinos, o presente trabalho teve por objetivos, a padronização de um protocolo de extração de RNA total a partir de células espermáticas bovinas e a validação da eficiência do mesmo através da análise da expressão gênica pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Palhetas de sêmen provenientes de três touros (*Bos taurus*) da raça Nelore foram descongeladas em água pré-aquecida à 36,5 °C, seguido por duas lavagens sucessivas através de centrifugação para retirada de crioprotetores e células somáticas não desejáveis para o processo de extração de RNA. A partir da determinação do número de células, a concentração espermática foi ajustada de acordo com os grupos experimentais:



Com os grupos experimentais definidos, cada amostra foi submetida às seguintes etapas:



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração de RNA total

Com o protocolo de extração modificado utilizado, obtivemos uma quantidade de RNA detectável por Fluorimetria somente no grupo experimental 4, no qual foram utilizadas 20×10^6 células espermáticas (Fig.1).

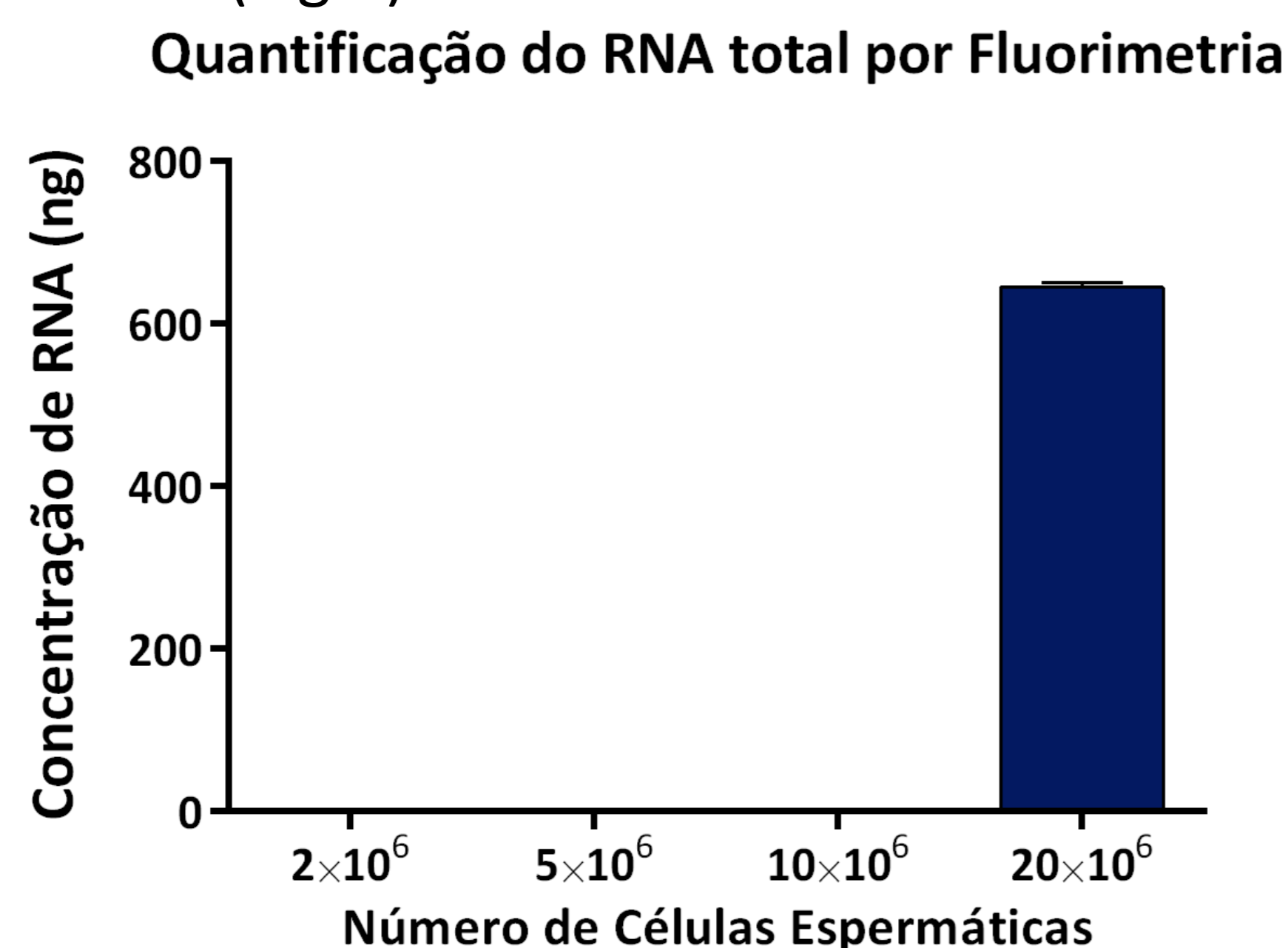


Fig.1: Quantificação do RNA total por Fluorimetria dos grupos de células espermáticas utilizados no protocolo modificado.

Segundo a literatura, estão descritos diferentes métodos para obtenção de RNA total como o descrito por Pranab e colaboradores (2010), onde os mesmos utilizaram 100×10^6 células espermáticas, retiradas diretamente do ejaculado do animal, sendo as células submetidas à extração de RNA com o reagente TRIzol®.

Como resultado, os pesquisadores obtiveram 2.000 ng de RNA a partir de 100×10^6 de espermatozoides. Neste mesmo sentido, o protocolo sugerido por Partiphan e colaboradores (2015), utilizou $30-40 \times 10^6$ de células espermáticas, provenientes de sêmen fresco, tendo como resultado final o rendimento de 811 ng de RNA extraído. Em contraste, no presente estudo, se utilizando tanto um protocolo convencional com modificações, quanto um número reduzido de células espermáticas (20×10^6 de células), obteve-se $15,88 \pm 1,41$ ng/ μ l de RNA, tendo como rendimento total da amostra do grupo experimental 4 cerca de 635 ng (Fig.2).

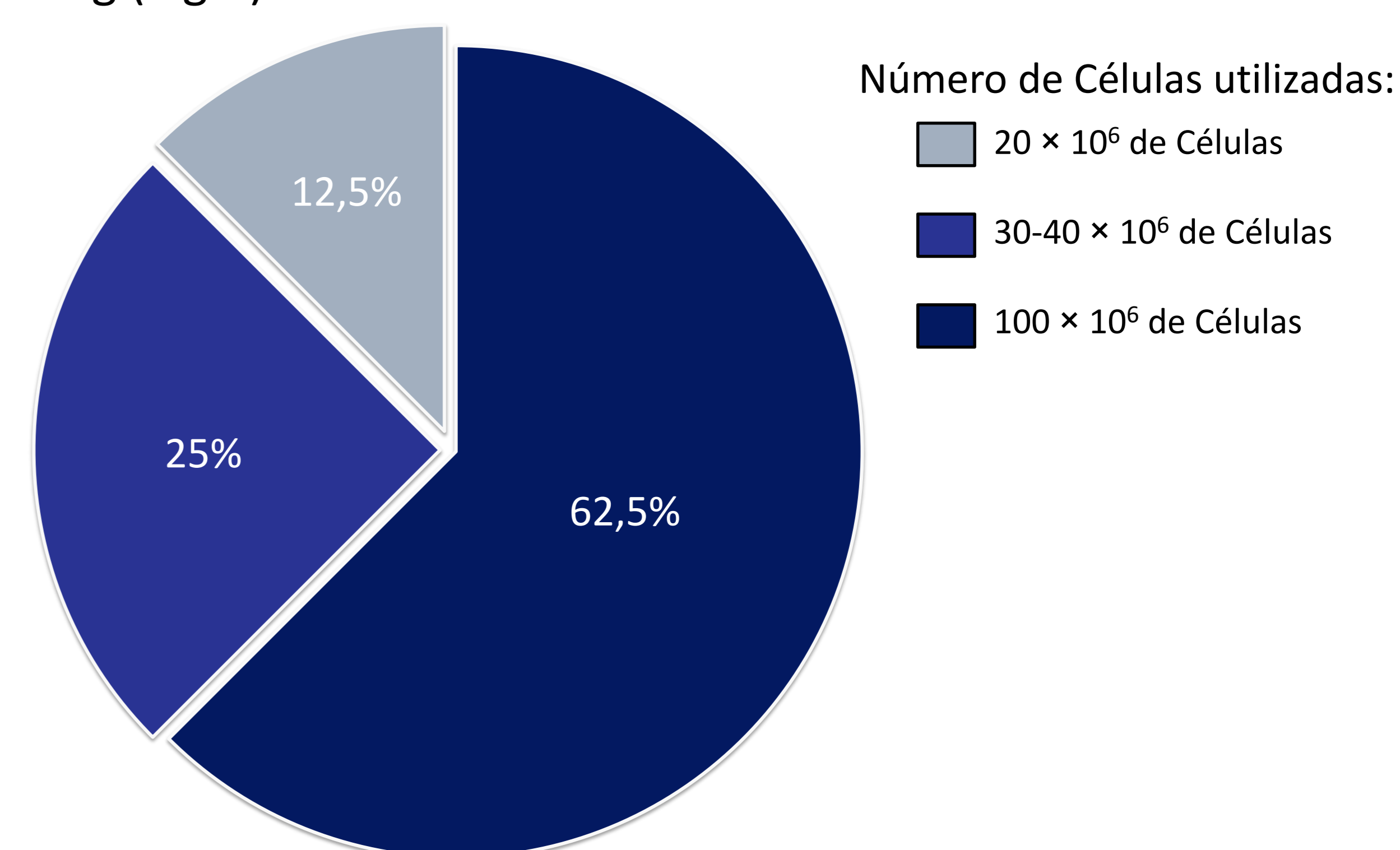


Fig.2: Comparação de concentrações de células espermáticas utilizadas pelos artigos discutidos em relação ao protocolo utilizado neste trabalho.

3.2 Análise da Expressão Gênica (qPCR)

Após a síntese de cDNA, reações de qPCR foram realizadas para verificação da possibilidade de utilização do RNA extraído a partir do protocolo estabelecido pelo nosso grupo, em trabalhos de análise de expressão de miRNAs. Para isso, utilizou-se o gene da GAPDH (Fig.3), o qual é tido como um gene endógeno de eficiência satisfatória.

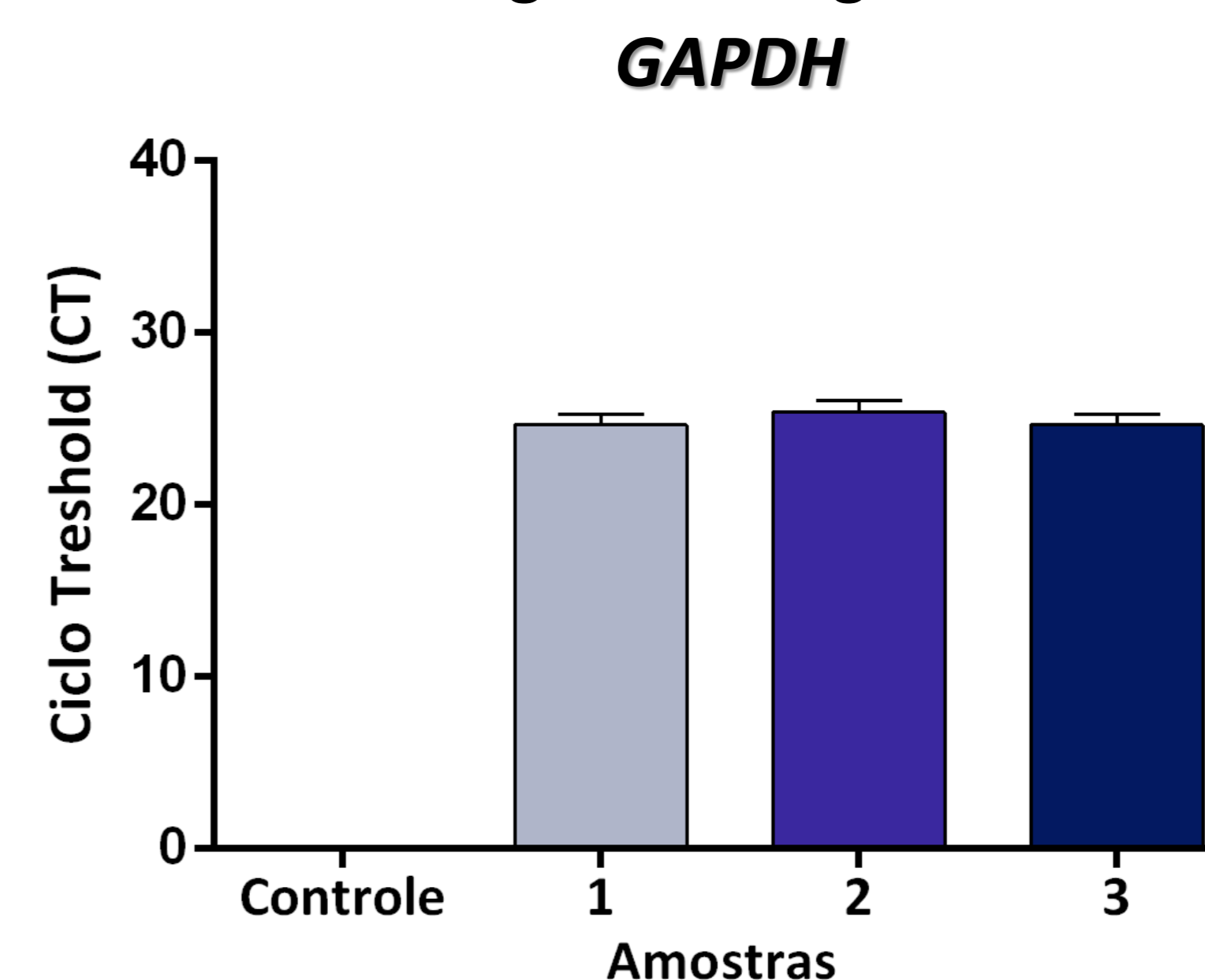


Fig.3: Validação do protocolo de Extração de RNA total a partir da análise da expressão do gene GAPDH através de qPCR. N=3, valores expressos com média \pm desvio padrão.

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que é possível realizar extração de RNA total a partir de uma concentração espermática menor do que as já demonstradas na literatura até o presente momento. Além disso, validamos o protocolo aqui sugerido, uma vez que o mesmo mantém o RNA total íntegro e em concentrações suficientes para a realização de ensaios de análise de expressão gênica, podendo o mesmo ser utilizado nos experimentos vindouros envolvendo análise de miRNAs espermáticos relacionados à capacidade fertilizante dessas células. Ainda, o protocolo aqui apresentado encontra-se depositado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

5. REFERÊNCIAS

- CAPRA, E. et al. Small RNA sequencing of cryopreserved semen from single bull revealed altered miRNAs and piRNAs expression between High-and Low-motile sperm populations. **BMC Genomics**, v.18, n.1, p.14, 2017.
- GOVINDARAJU, A. et al. Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.10, n.1, p.82, 2012.
- PARTHIPAN, S. et al. Spermatozoa input concentrations and RNA isolation methods on RNA yield and quality in bull (*Bos taurus*). **Biochemistry**, v.482, p.32-39, 2015.
- PRANAB, D.J. et al. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. **Theriogenology**, v.10, n.6, p.1099-1106, 2010.