

RNAs CIRCULARES EM MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch.): OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO GÊNICA

CLAUDIANE DA SILVA MACHADO¹; CAREN WILSEN MIRANDA COELHO
WANDERLEY²; AUDREY CHRISTINA DO NASCIMENTO³; YASMIN BRAGA
FARIA⁴, SELENE HENSE LILGE⁵, VANESSA GALLI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – claudiane.machado@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas – carenwilson@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – audreycn97@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – yasminbragafar@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – selenelilge04@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – vanessa.galli@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma fruta amplamente consumida em todo o mundo, conhecida por suas propriedades nutricionais e sabor agradável. O amadurecimento do morango é um processo altamente regulado, envolvendo metabólitos que resultam em melhorias no sabor, na cor e na textura da fruta (GIAMPIERI et al., 2012). Entre os fitormônios reguladores, o ácido abscísico (ABA) desempenha um papel crucial, modulando diversos aspectos do amadurecimento, como o acúmulo de açúcares, degradação da clorofila e síntese de antocianinas (JIA et al., 2011). A nível molecular, o amadurecimento é controlado por uma série de fatores genéticos e epigenéticos, incluindo RNAs não codificantes, como os miRNAs e os circRNAs (RNAs circulares) (MA, 2020).

Os circRNAs são moléculas de RNA de fita simples que não possuem CAP nem cauda poli (A). A maioria dos circRNAs é formada por meio de um evento de "backsplicing", onde um sítio doador de *splicing* de um éxon é ligado covalentemente a um sítio a montante, formando uma estrutura circular. Entretanto, alguns circRNAs podem ser derivados de íntrons (COCQUERELLE et al., 1993; SANGER et al., 1976). Dentre as principais funções com as quais os circRNAs são relacionados estão a regulação da transcrição pela ligação na região do promotor; síntese proteica; regulação da estrutura de proteínas; proteínas de ligação de RNA (RBPs) e "esponja" de miRNA (LI et al., 2021), nesse caso se ligam a miRNAs específicos, impedindo que estes degradem seus mRNAs alvo. Além disso, os circRNAs podem influenciar respostas a estímulos ambientais, como luz e estresse oxidativo, que são fatores importantes no amadurecimento dos frutos (HUANG, 2024).

A amplificação de genes por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é crucial para estudar a expressão gênica e a interação entre RNA mensageiro (mRNA) e circRNA, os quais são derivados de um mesmo gene parental por competição (MULLIS; FALOONA, 1987). Para isso, *primers* convergentes são usados para amplificar o gene parental e o mRNA oriundo deste, confirmando sua presença e expressão, pois se ligam a regiões complementares destas sequências (SAIKI et al., 1988). Por outro lado, *primers* divergentes são necessários para validar a existência de circRNA, ligando-se a regiões não lineares formadas por backsplicing (CHEN, 2016).

Este trabalho teve como objetivo otimizar o protocolo de amplificação dos genes parentais que codificam para circRNAs, incluindo o desenho de *primers* e o teste de temperaturas de anelamento.

2. METODOLOGIA

Foram selecionados 11 circRNAs preditos *in silico* putativamente relacionados à maturação dependente de ABA em frutos de morango, a partir da tese de SIEBENEICHLER (2024), que identificou circRNAs a partir de bibliotecas depositadas no *GenBank Sequence Read Archive* (SRA). As sequências selecionadas para validação foram as com maior número de leituras (reads) nestas bibliotecas.

O desenho dos *primers* foi realizado com o auxílio da ferramenta Bechlig (<https://www.benchling.com/>), conforme metodologia descrita por GOMES (2023). Foram confeccionados *primers* convergentes, utilizados para amplificação dos genes parentais e mRNA, e *primers* divergentes para amplificação do circRNA de acordo com a sequência de *backsplicing*. Os parâmetros utilizados para o confecção foram: tamanho entre 18 e 25 nucleotídeos, GC entre 40% e 60%, temperatura de melting (T_m) de 54 a 58°C e o tamanho total do amplicon de 150 a 250 pb.

O DNA total foi extraído de frutos de morango (*Fragaria x ananassa*), com base em protocolo adaptado de MESSIAS et al. (2010, 2014). Para avaliação da concentração de DNA extraído, a quantificação foi feita por espectrofotômetro NanoVue™. Para amplificação gênica, foram realizadas reações de PCR em dois conjuntos de temperatura de anelamento (52°C e 58°C). Após a PCR, os produtos amplificados foram visualizados em dois géis de agarose, um para cada condição de temperatura. A eletroforese foi realizada a 120V por 50 minutos, utilizando brometo de etídio para a visualização dos produtos sob luz UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na eletroforese em gel de agarose utilizando os produtos de PCR amplificados com temperatura de anelamento de 52°C (Figura 1A) observa-se a fraca visibilidade de bandas dos genes parentais 113, 114, 197, 810 e 811, amplificadas pelos *primers* convergentes. A presença de várias bandas inespecíficas sugere que a baixa temperatura favoreceu a ligação a outros fragmentos de material genético, resultando na amplificação de produtos secundários como dímeros de *primers* ou *hairpins*. O ideal na confecção de *primers* é a inexistência de estruturas secundárias, como *hairpins*, palíndromos e *repeats*, para garantir uma melhor eficiência da PCR, mas devido à complexidade do *design* e limitações da ferramenta de predição, alguns *primers* ainda apresentaram essas formações, influenciando no resultado. Os demais genes parentais não foram amplificados, sendo necessários ajustes na PCR. Para otimizar a PCR, é possível utilizar adjuvantes como o cloreto de magnésio e o glicerol; o $MgCl_2$ é essencial para a atividade da polimerase, enquanto o glicerol estabiliza as reações, minimizando a formação de dímeros de primers e estruturas secundárias, como *hairpins* (GRUNENWALD, 2003).

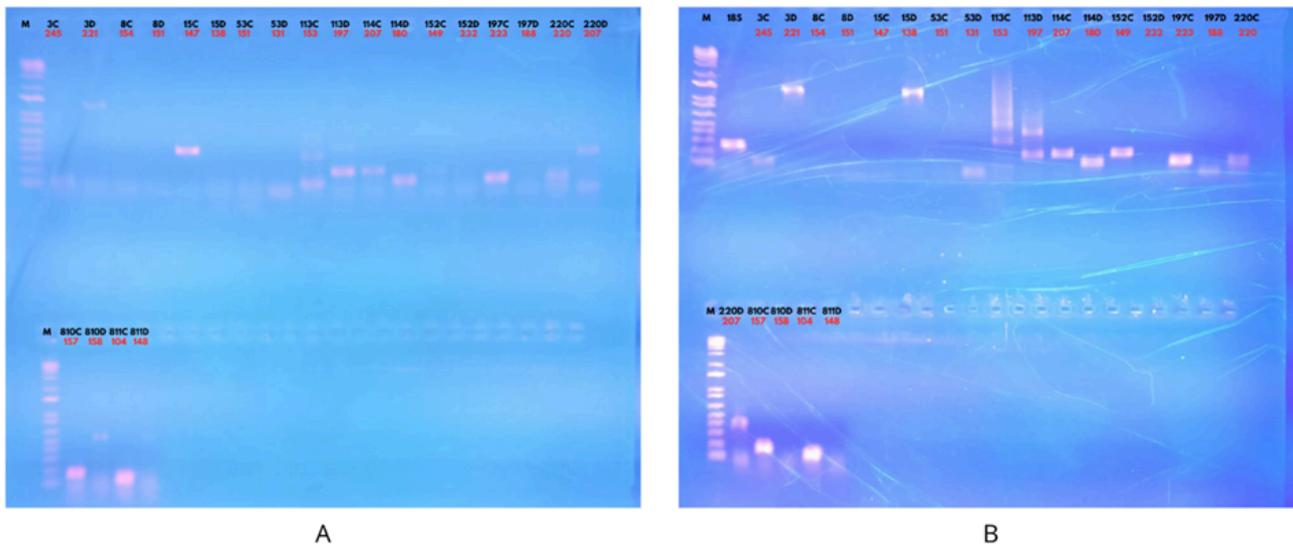


Figura 1. Eletroforese de Gel de Agarose. 1A e 1B mostram o resultado em gel de agarose 1% da PCR com temperatura de anelamento a 52°C e 58°C, respectivamente. O marcador (1KB) é identificado como M. As identificações dos CircRNAs estão em preto, sendo 11 pares, convergentes e divergentes respectivamente (3, 8, 15, 53, 113, 114, 152, 197, 220, 810 e 811); e os tamanhos em pares de base (pb) estão destacados em vermelho.

Na eletroforese em gel de agarose utilizando os produtos de PCR amplificados com temperatura de anelamento de 58°C (Figura 1B) observa-se um menor número de bandas inespecíficas e uma definição mais clara de bandas únicas. A elevação da temperatura de anelamento favoreceu a especificidade da ligação dos *primers* às sequências-alvo, resultando na amplificação dos genes parentais 3, 114, 152, 197, 220, 810 e 811, o que indica que essa temperatura é mais adequada para a amplificação de genes parentais e do mRNA, reduzindo a formação de produtos indesejados.

Como utilizamos DNA como amostra na PCR, não é possível confirmar se os *primers* divergentes amplificam de forma específica as sequências de circRNAs dos quais estes *primers* foram projetados; porém, é possível constatar sua viabilidade através da presença de bandas visíveis, mesmo que o produto da PCR não corresponda ao circRNA. No gel com temperatura de anelamento de 52°C foi possível a amplificação das bandas 3, 113, 114, 220 e 810, embora de fraca visibilidade. Já no gel de 58°C, as bandas 3, 15, 113, 114, 197 e 220 apresentaram uma amplificação mais visível. Para confirmação da amplificação do circRNA será necessário utilizar amostra de RNA para posterior avaliação da expressão por PCR em tempo real (RT-qPCR).

4. CONCLUSÕES

Na temperatura de 52°C, foi possível amplificar os genes parentais 113, 114, 197, 810 e 811. Com a temperatura de 58°C, foi possível amplificar os genes 3, 114, 152, 197, 220, 810 e 811. Para verificar se os circRNAs ou mRNAs estão sendo expressos a partir destes genes parentais em frutos de morango, estas PCRs serão realizadas a partir de amostras de RNA. Essa abordagem permitirá

entender o papel dos circRNAs no amadurecimento destes frutos, a partir da técnica de RT-qPCR.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COCQUERELLE, C. et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 1, p. 155–160, jan. 1993.
- GIAMPIERI, Francesca. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 371-383, 2012.
- GRUNENWALD, Haiying. Optimization of Polymerase Chain Reactions. **Methods in Molecular Biology**, v. 226, p. 89-99, 2003.
- HUANG, H. et al. Mecanismos moleculares de regulação do amadurecimento, senescência e resistência ao estresse em frutas e vegetais. **Agronomy**, v. 14, n. 8, p. 1703, 2024
- JIA, Hai-Feng et al. Abscisic Acid Plays an Important Role in the Regulation of Strawberry Fruit Ripening. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 188-199, 2011.
- LI, A. et al. Circular RNA in colorectal cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 8, p. 3667-3679, 2021.
- MA, Lili; MU, Jianlou; GRIERSON, Donald; WANG, Yunxiang; GAO, Lipu; ZHAO, Xiaoyan; ZHU, Benzong; LUO, Yunbo; SHI, Kai; WANG, Qing; ZUO, Jinhua. Noncoding RNAs: functional regulatory factors in tomato fruit ripening. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, n. 6, p. 1753-1762, 2020.
- MESSIAS, R. da S. et al. Metodologias de extração e avaliação semi quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho (*Zea mays* L.). **Embrapa Clima Temperado - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2010.
- MESSIAS, Rafael da Silva et al. Isolation of high-quality RNA from grains of different maize varieties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 697-707, 2014.
- SANGER, H. L. et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 11, p. 3852–3856, nov. 1976.
- SIEBENEICHLER, Tatiane Jéssica. Caracterização de Frutos: Abordagens Químicas, Moleculares e de Bioinformática. 2024. Tese (Bacharelado e Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - **Universidade Federal de Pelotas**, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Pelotas, 2024.
- GOMES, Mariana Pinto da Mota. Obtenção de primers e amostras de RNA para validação experimental por PCR em tempo real da atuação de dois circRNAs de morango (*Fragaria x ananassa* Duch) na captura de miRNAs. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Centro de Desenvolvimento Tecnológico, **Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 2023.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.
- SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.
- CHEN, L. L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 4, p. 205-211, 2016.