

EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL A PARTIR DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS BOVINAS

LUCAS DOS SANTOS DA SILVA¹; BRUNA FAGUNDES BARRETO²; EDUARDO NUNES DELLAGOSTIN²; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Universidade Federal de Pelotas– lucassantos_17@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas– brunaf.barreto@live.com; edu.nd@terra.com.br; williamwwe@yahoo.com; tony8.9@hotmail.com.

³Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os espermatozoides carregam uma mistura de RNAs, contendo RNAs mensageiros (mRNA), RNAs ribossômicos (rRNA) e pequenos RNAs não codificantes (CARD et al., 2013; SALAS-HUETOS et al., 2014). Alguns estudos têm proposto que estes não são apenas transcritos aleatórios remanescentes de estágios iniciais da espermatogênese, mas constituem uma população estável, que foi mantida seletivamente (OSTERMEIER, 2002; JODAR et al., 2013; SALAS-HUETOS et al., 2014), o que sugere que eles desempenham um papel importante no desenvolvimento inicial do zigoto (LALANCETTE et al., 2008; MAO et al., 2014; SALAS-HUETOS et al., 2014).

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 (de 18 a 23 nucleotídeos) e que apresentam função de regulação pós-transcricional da expressão gênica, seja pela degradação ou pelo bloqueio na tradução do seu mRNA alvo. A biogênese dessas moléculas é complexa, pois possui maquinarias enzimáticas diferentes a cada etapa de sua biogênese, nas quais as enzimas DICER1 e Drosha desempenham papel crucial no processamento de precursores de miRNAs (BAGGA et al., 2005).

Para avaliação da expressão de miRNAs, a técnica tida atualmente como “padrão-ouro” é a PCR em tempo real (qPCR), se utilizando como normalizadores da análise, genes endógenos específicos da via de biogênese dos miRNAs, os quais devem ser expressos de forma constante nas mais diversas condições fisiológicas da célula.

Células espermáticas bovinas apresentam uma grande variedade de miRNAs, sendo que a expressão diferencial de alguns desses transcritos associada com uma alta fertilidade de touros, sugere 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: 1) a padronização de um protocolo de extração de RNA total a partir de células espermáticas bovinas e 2) validar a eficiência do mesmo através da análise da expressão gênica pelo método de qPCR.

2. METODOLOGIA

Primeiramente, palhetas de sêmen provenientes de três touros (*Bos taurus*) da raça Nelore foram descongeladas em água pré-aquecida a 36,5°C, seguido por duas lavagens sucessivas através de centrifugação para retirada de crioprotetores e células somáticas não desejáveis no processo de extração de RNA.

Posteriormente, o sêmen foi avaliado em relação a sua concentração em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. A partir da determinação do número de células, a concentração espermática foi ajustada de acordo com os grupos experimentais: Grupo 1 contendo 2×10^6 espermatozoides; Grupo 2 contendo 5×10^6 espermatozoides; Grupo 3 com 10×10^6 espermatozoides; e Grupo 4 contendo 20×10^6 espermatozoides. Determinados os grupos, os mesmos foram submetidos ao processo de extração de RNA total utilizando um protocolo elaborado por PARTHIPAN e colaboradores (2015).

Resumidamente, as amostras foram, então, submetidas ao reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, EUA), para o início da extração do RNA total e separação dos demais ácidos nucleicos, proteínas e lipídios presentes na amostra. Para garantir apenas a presença. Logo após, o RNA foi lavado duas vezes através de centrifugação e eluído em coluna com membrana de sílica presente no *kit* comercial PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, EUA) utilizando água livre de RNase.

Ao final do processo de extração, as amostras de RNA foram quantificadas por fluorimetria utilizando o equipamento Qubit®, (Thermo Fisher Scientific, EUA). Posteriormente, foi realizada a confecção de DNA complementar utilizando o *kit* comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, EUA). Em seguida, foi realizada a avaliação da expressão do gene da GAPDH por meio do método de qPCR utilizando o reagente SYBR Green Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, EUA), para a validação da eficiência do protocolo proposto no presente estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o protocolo de extração convencional utilizado, obtivemos uma quantidade de RNA detectável por fluorimetria somente no grupo experimental 4, no qual foram utilizadas 20×10^6 células espermáticas.

Segundo a literatura, estão descritos diferentes métodos para obtenção de RNA total como o descrito por PRANAB e colaboradores (2010), esses autores utilizaram 100×10^6 células espermáticas, retiradas diretamente do ejaculado do animal, sendo as células espermáticas submetidas à extração de RNA com o reagente TRIzol®. Como resultado, os pesquisadores obtiveram 2µg de RNA a partir de 100×10^6 espermatozoides. Neste mesmo sentido, o protocolo sugerido por Parthipan e colaboradores (2015), no qual nos baseamos para elaborar o presente estudo, utilizou $30-40 \times 10^6$ e $70-80 \times 10^6$ células espermáticas, provenientes de sêmen fresco, tendo como resultado final o rendimento de 811ng de RNA extraído.

Em contraste, no presente estudo, se utilizando tanto um protocolo convencional com modificações, quanto um número reduzido de espermatozoides (20×10^6 células), obteve-se $15,88 \pm 1,41$ ng/µl de RNA, tendo como rendimento total da amostra do grupo experimental 4 cerca de 635ng.

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, o qual é tido como um gene endógeno de eficiência satisfatória para qPCR. Sendo assim, como demonstrado na Figura 1, foi possível analisar a expressão gênica de 5 amostras de RNA extraído com o protocolo implementado. As amplificações do gene GAPDH tiveram uma média de Ct de $27,9 \pm 0,56$, demonstrando que as amostras RNA extraídas foram eficientemente convertidas em cDNA e posteriormente amplificadas com eficácia pela PCR em tempo real.

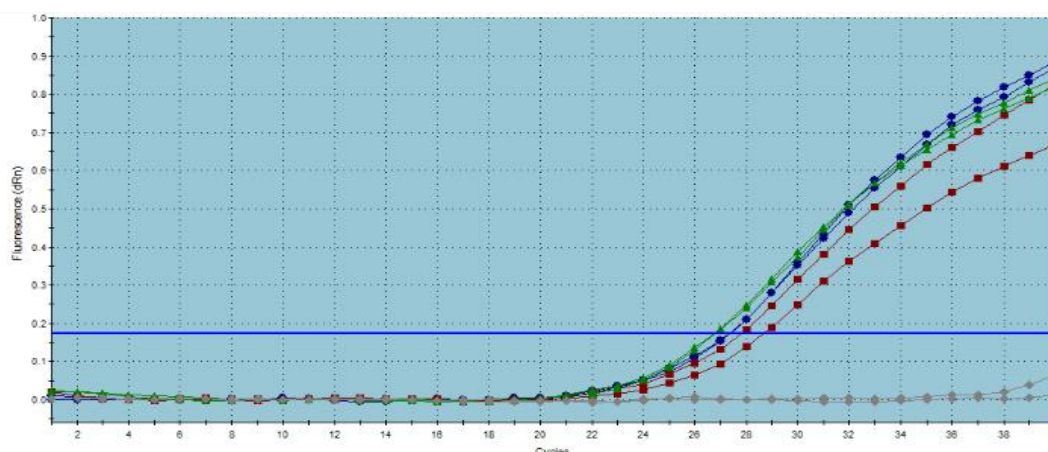


Figura 1: Curva de amplificação do qPCR do gene GAPDH de células espermáticas de *Bos taurus*

4. CONCLUSÕES

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.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OSTERMEIER, G.C; DIX, D.J; MILLER, D; KHATRI, P; KRAWETZ, S.A. Mechanisms of disease Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. **The Lancet**. v.360, n. 9335, p.772-777, 2002.

BAGGA, S; BRACHT, J; HUNTER, S; MASSIRER, K; HOLTZ, J; EACHUS, R; PASQUINELLI, A.E. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. **Cell Press**, v.122, n.4, p. 553-563, 2005.

LALANCETTE, C; THIBAUT, C; BACHAND, I; CARON, N; BISSONNETTE, N. Transcriptome analysis of bull semen with extreme nonreturn rate: use of suppressionsubtractive hybridization to identify functional markers for fertility. **Biology of reproduction**. v.78, n.4, p. 618-35, 2008.

PRANAB, D.J; PARIIAA, N; GUSTAFSON-SEABURYA, A; VISHNOIA, M; CHAKIA, P. S; LOVEB, C. C; VARNERB, D. D; CHOWDHARYA TERJE RAUDSEPPA, P. B. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. **Theriogenology**, v.10, n.6, p. 1099-1106, 2010.

JODAR, M; KALKO, S; CASTILLO, J; BALLESCÀ, J.L; OLIVA, R. Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. **Human Reproduction**. v. 27, n.5, p.1431-1438, 2012.

QIN, Y; XIA, Y; WU, W; HAN, X; LU, C; JI, G; CHEN, D; WANG, H; SONG, L; WANG, S; WANG, X. Genetic variants in microRNA biogenesis pathway genes are associated with semen quality in a Han-Chinese population. **Reproductive BioMedicine**, v. 24, n.4, p. 454- 461, 2012.

CARD, C.J; ANDERSON, E.J; ZAMBERLAN, S; KRIEGER, K.E; KAPROTH, M; SARTINI, B.L. Cryopreserved Bovine Spermatozoal Transcript Profile as Revealed by High-Throughput Ribonucleic Acid Sequencing. **Biology of Reproduction**. v.88, n.2, p. 1-9, 2013.

LI, D; LIU, H; LI, Y; YANG, H; QU, C; ZHANG, Y; LIU, Y; ZHANG, X. Identification of suitable endogenous control genes for quantitative RT-PCR analysis of miRNA in bovine solid tissues. **Molecular Biology Reports**, v.41, n.10, p. 6475-6480, 2014.

MAO, S; GOODRICH, R; HAUSER, R; SCHRADER, S; CHEN, Z; KRAWETZ, S. Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling. **Biology in Reproductive Medicine**. v. 59, n.5, p.287-295, 2014.

SALAS-HUETOS, A; BLANCO, J; VIDAL, F; MERCADER, J.M; GARRIDO, N; ANTON, E. New insights into the expression profile and function of micro-ribonucleic acid in human spermatozoa. **Fertility and Sterility**. V. 102, n. 1, p. 213-222, 2014.

PARTHIPAN, S; SELVARAJU, S; SOMASHEKAR, L; KOLTE, A.P; ARANGASAMY, A; RAVINDRA, J.P. Spermatozoa input concentrations and RNA isolation methods on RNA yield and quality in bull (*Bos taurus*). **Biochemistry**, v.482, p. 32-39, 2015.

HAN, C.M; CHAN, R; LI, T; CHEN, X.L; ZHENG, Y.F; MA, M.T; GAO, Q.H. Evaluation of the semen swim-up method for bovine sperm RNA extraction. **Genetics and Molecular Research**, v.2, n.2, p. 6-15, 2016.