

ANÁLISE DE QUALIDADE DE RNA PARA ESTUDO DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE RATOS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO EXAUSTIVO

Isabele da Silva Pereira (1); Jonathan Elias Rodrigues Martins (2); Luiz Henrique Pontes dos Santos (3); Stela Mirla da Silva Felipe (4); Vânia Marilande Ceccatto (5)

Universidade Estadual do Ceará

Introdução

Com o advento e aperfeiçoamento contínuo das tecnologias de sequenciamento de DNA, RNA-Seq tornou-se um método bastante utilizado para análise do genoma funcional. RNA-Seq é uma abordagem desenvolvida para transcriptoma, usando tecnologias de sequenciamento “*next generation*”, as quais permite a medição dos níveis de transcritos e determina a estrutura funcional dos genes. Essa abordagem é capaz de rastrear com acurácia as mudanças na expressão gênica durante diferentes estágios da diferenciação celular, no desenvolvimento de alguns organismos e em condições fisiológicas diversas, tais como as geradas pela atividade física em atletas (CHERANOVA *et al.*, 2013).

O transcriptoma trata-se de uma coleção de mRNAs, um conjunto completo de transcritos encontrados dentro de uma célula, tecido ou organismo, de acordo com sua condição fisiológica e/ou fase do seu desenvolvimento. O transcriptoma, em sua essência, reflete a expressão gênica geral de determinada localização em uma dada condição. Tanto a ativação quanto a desativação dos genes pode ser observada na estrutura celular por meio do estudo do transcriptoma, onde os genes são quantificados e sua expressão definida. O genoma, diferentemente do transcriptoma, é mais estável e não se altera com o estágio do desenvolvimento, condição fisiológica ou ambiental; entretanto compreendendo o transcriptoma, é possível esclarecer elementos funcionais do genoma, que estariam relacionados aos processos fisiológicos e patológicos (WANG *et al.*, 2009; BELESINI, 2015).

A tecnologia RNA-Seq apresenta-se revolucionária para estudos de expressão gênica. Independente da plataforma utilizada, o sequenciamento segue as etapas de: extração de RNA, preparação das bibliotecas de cDNA, obtenção e avaliação de sequências de DNA. A extração de RNA, a partir de tecidos específicos, consiste no primeiro passo para estudos de expressão gênica e caracterização de transcritos. A integridade e qualidade do RNA extraído é importante para garantir a confiabilidade dos dados provenientes de RNA-Seq (WANG *et al.*, 2009; CARDOSO-SILVA, *et al.*, 2014; BELEZINI, 2015; CONESA *et al.*, 2016).

Trabalhos atuais demonstraram, por exemplo, que determinados genes são mais importantes, como os que regulam a nossa resistência cardiovascular e tipo de fibra muscular. Porém, fatores ambientais tão diversos como gênero, nutrição, histórico de treino, motivação, estado imunológico, ambiente e avanços em equipamentos (tênis, roupas de banho, esquis, bicicletas), atuam na expressão do genoma individual e possibilitam melhorias na performance atlética. Em termos fisiológicos, ainda carecemos de metodologias eficazes e eficientes para a avaliação do genoma funcional do exercício (COFFEY, HAWLEY, 2007; EGAN, ZIERATH, 2013).

O estudo de RNA-Seq em animais submetidos ao exercício, por exemplo, pode ser útil para identificar genes e vias metabólicas que são influenciadas pela atividade física. O objetivo desse trabalho foi analisar a qualidade e integridade do RNA extraídos de tecido muscular (sóleo) de ratos submetidos a uma sessão de exercício exaustivo, a fim de garantir o sucesso do sequenciamento (RNA-Seq) e posterior obtenção de padrões fenotípicos produzidos pelo exercício.

Metodologia

Animais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE) com o número de processo 1592060/2014. O trabalho utilizou 12 ratos machos da linhagem *Wistar*, obtidos do biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da UECE (ISCB-UECE). Os animais tinham 60 dias de vida, com peso médio de 220g, e foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, água e ração *ad libitum* em ciclo claro/escuro de 12h/12h.

Adaptação e sessão de exercício exaustivo

Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (GC) e Grupo Treinado (GT), com 6 animais em cada grupo. Os mesmos foram familiarizados à esteira ergométrica adaptada para roedores (Imbramed®) com volume e intensidade baixa, no período noturno, por duas semanas.

Após a adaptação o GT foi submetido a uma sessão de exercício exaustivo (VIEIRA et al., 2006), que consistiu em um incremento de 0,2km/h na intensidade do exercício a cada 3 minutos, até que o animal atingisse a exaustão. A exaustão foi avaliada pelo comportamento, quando o animal se recusou a correr, e ao sair da esteira apresentou sinais de fadiga, como a falta de coordenação e afastamento das patas anteriores e posteriores, e hiperventilação. O GC não foi submetido a sessão de exercício.

Dissecação e armazenamento do sóleo

Os animais foram eutanasiados 24 horas após a sessão de exercício com Tiopental (150mg/Kg). A pata esquerda traseira do animal foi dissecada, o músculo sóleo removido e armazenado em solução *RNAlater*® a 8°C para a preservação e estabilização do RNA total do tecido e inativação de ribonucleases.

Extração, quantificação e integridade do RNA

Os experimentos de extração de RNA foram realizados no Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (OCRC) sob a supervisão do prof. Dr. Leonardo Silveira, na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. A quantificação e a análise da integridade do RNA foram realizadas pelo Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho - LACTAD, também na UNICAMP.

A extração de RNA total foi feita com os reagentes *TRIzol*® (*Thermo Fisher Scientific*) e *RNeasy Plus Mini Kit*® (*QIAGEN*) de acordo com as recomendações e especificações dos fornecedores.

A quantificação de RNA total foi feita de acordo com as recomendações do *QUBIT*, método fluorimétrico específico para RNA, com maior precisão em relação ao método espectrofotométrico tradicional, por utilizar corantes específicos para RNA, DNA e proteínas.

Para analisar a integridade do RNA foi realizado eletroforese capilar das amostras, através do sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer*, (*Agilent Technologies*®), protocolo padrão para RNA. A qualidade do RNA foi verificada pelo *RNA Integrity Number - RIN*.

Resultados

O *Bioanalyzer* permitiu uma análise qualitativa e quantitativa de cada amostra de RNA. Os parâmetros mensurados foram a concentração de RNA, o rácio 28S/18S e o *RNA Integrity Number - RIN*, sendo este último, o de maior importância para o sequenciamento. A concentração de RNA obtida nas amostras avaliadas foi de 466.6 ± 21.7 e a razão 28S/18S foi de 1.4 ± 0.02 (tabela 1). A quantidade de RNA presente nas amostras é de elevada importância para a realização do sequenciamento, pois só as amostras com uma concentração de RNA igual ou superior a 40 ng/ μ l são viáveis. Portanto, no requisito concentração, todas as amostras corresponderam as exigências para o sequenciamento de nova geração. Quanto a razão 28S/18S, o valor exigido é aproximadamente 1.5, todas as amostras apresentaram valor satisfatório.

Tabela 1 – Parâmetros mensurados pelo *Bioanalyzer* nas amostras de RNA obtidos do músculo sóleo de ratos submetidos ao exercício exaustivo (C1 a C6 – grupo controle/ T1 a T6 – grupo treinado).

Amostras	RIN	RNA Concentration	
		(ng/ μ l)	rRNA Ratio [28s / 18s]
C1	8,1	359	1,4
C2	7,8	421	1,5
C3	8,1	493	1,4
C4	8	416	1,5
C5	8	465	1,5
C6	8	527	1,4
T1	8,3	377	1,6
T2	7,8	540	1,5
T3	8	438	1,6
T4	8	633	1,4
T5	7,9	455	1,5
T6	8,1	476	1,5

A eletroforese capilar apresentou RNA íntegro em todas as amostras (figura 1), as duas bandas correspondem às unidades ribossomais do RNA, respectivamente 18S e 28S, sem rastros significativos abaixo das bandas, indicando que não houve degradação e nem contaminação por DNA genômico. Além disso, a banda 28S apresentou o dobro da intensidade da banda 18S, como observado na figura 1. Para um bom resultado da expressão gênica, é preciso estabelecer a integridade dos materiais a serem utilizados, visto que a degradação do RNA é progressiva e diminui a relação da banda 18s, com a banda 28s (MUELLER et al. 2004).

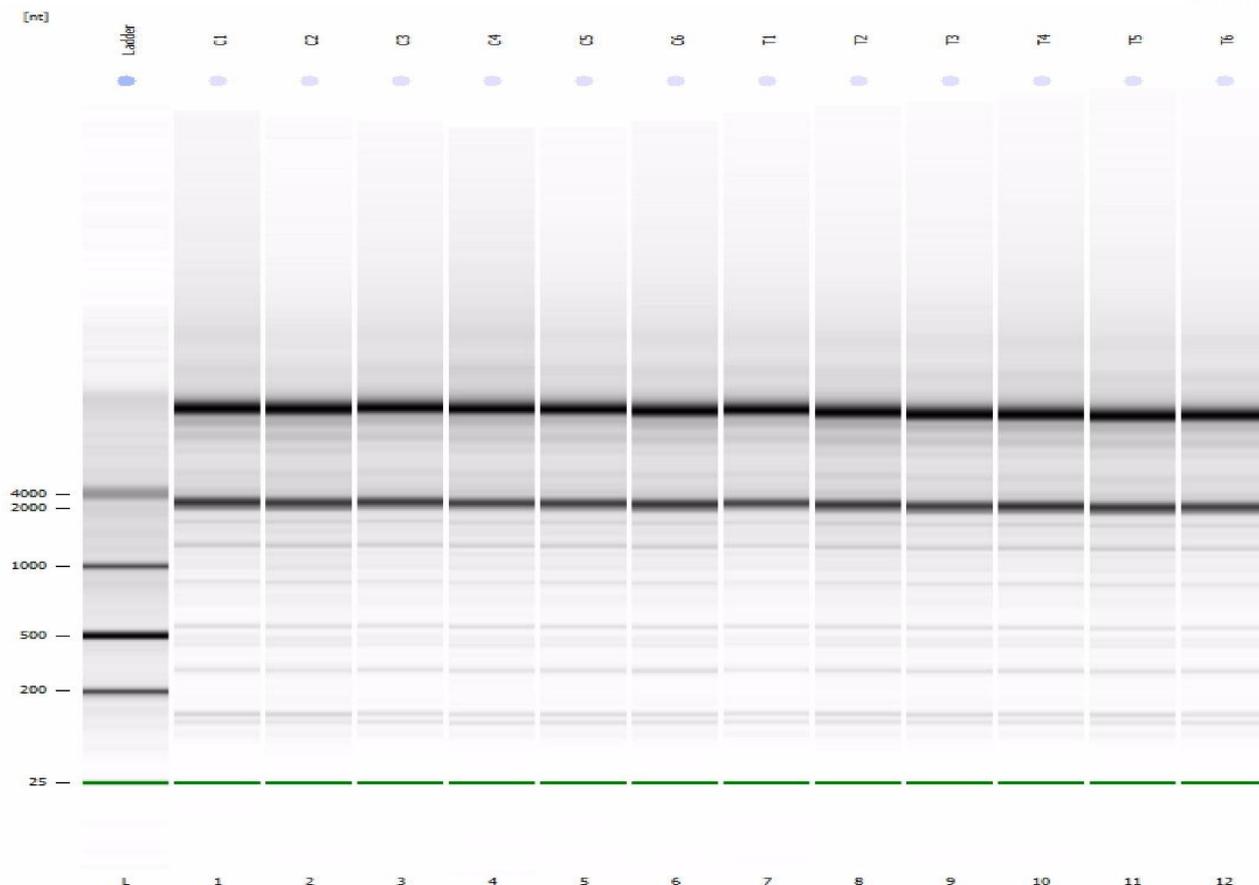


Figura1 – Eletroforese capilar das 12 amostras (L – marcador de peso molecular / 1 a 6-controle / 7 a 12-exercício) realizada no *Bioanalyzer*(AgilentTecnologies®).

Além da eletroforese capilar, a plataforma *Bioanalyzer* apresentou um resumo da qualidade do RNA total de cada amostra, através de eletroferograma, que é representado por gráfico (figura 2) com picos de fluorescência por segundo (FU). Os dois picos correspondem as bandas de RNA ribossomal (18S e 28S). O eletroferograma das 12 amostras avaliadas neste trabalho preencheram os parâmetros de qualidade requeridos para o sequenciamento. Como pode ser observado na figura 2, cada amostra apresentou RNA total com boa integridade e com dois picos bem definidos, que correspondem às unidades ribossomais mais abundantes, e sem background à sua volta.

O valor de RIN foi calculado por um algoritmo que analisa os resultados obtidos e atribui uma pontuação as amostras, que varia de 1 a 10. Para amostras de músculo esquelético, o valor de RIN igual ou superior a 8 é considerado ótimo e as amostras são aprovadas para análises posteriores. O valor obtido do RIN foi 8.1 ± 0.14 , em um grupo amostral de 12 (figura 2). Portanto, o valor de RIN, obtido nas amostras do presente estudo, foi satisfatório e as amostras de RNA estão adequadas para preparação das bibliotecas de cDNA. De acordo com Gregório (2009), o RIN foi concebido para proporcionar uma avaliação inequívoca da integridade do RNA, a partir dele pode se garantir a repetibilidade da expressão de um gene. Desta forma, auxilia na escolha das amostras para posterior análise.

A literatura apresenta métodos de análise da qualidade do RNA para estudos de expressão gênica, mostrando que a qualidade e integridade das amostras é fundamental para o sucesso dos sequenciamentos de nova geração. No estudo de Serra e colaboradores (2013), que investigaram uma condição extrema em animais, no caso o consumo alimentar residual, obteve-se o valor de RIN igual a $8,00 \pm 0,30$ de um grupo de 30 animais, certificando a qualidade do RNA e garantindo confiabilidade nos dados providos do sequenciamento.

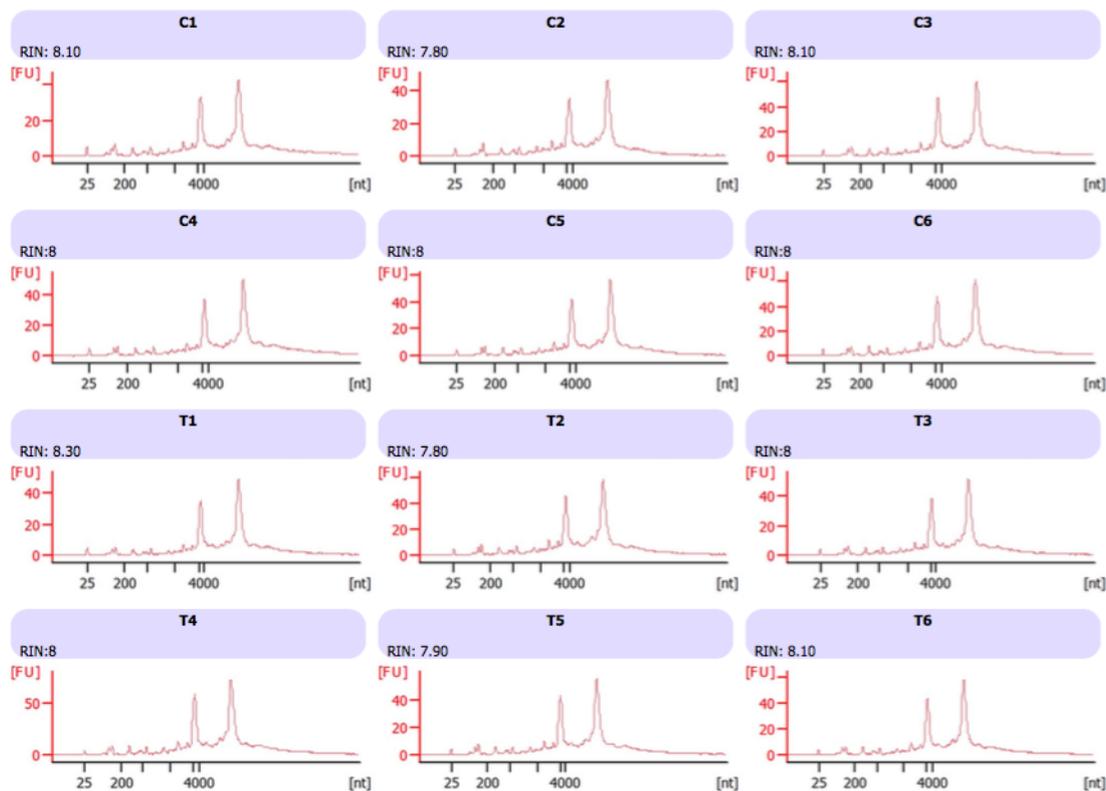


Figura 2 – Eletroferogramas das 12 amostras avaliadas. FU representa fluorescência por segundo e os picos representam as unidades ribossômicas 18S e 28S. RIN significa *RNA Integrity Number*.

Os resultados obtidos neste trabalho, quanto à concentração de RNA, à razão 28S/18S e o valor de RIN, corresponderam às exigências de qualidade e integridade do RNA para o sequenciamento. Essas avaliações permitiram que as amostras fossem encaminhadas para a preparação das bibliotecas de cDNA e posterior sequenciamento (RNA-Seq).

Conclusão

As análises realizadas na plataforma *Bioanalyzer* atestaram a qualidade do RNA obtido de tecido muscular esquelético. Portanto, as amostras estão adequadas para a preparação das bibliotecas de cDNA. A integridade do RNA foi avaliada de acordo com o *RIN*, que apresentou resultado satisfatório para o posterior sequenciamento (RNA-Seq).

Referências

CARDOSO-SILVA, C. B. et al. De Novo Assembly and Transcriptome Analysis of Contrasting Sugarcane Varieties. **PLOS ONE**, February, v. 9, n. 2, p. 1- 10, 2014.

CHERANOVA, D. et al. RNA-seq analysis of transcriptomes in thrombin-treated and control human pulmonary microvascular endothelial cells. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 72, p. e4393-e4393, 2013.

COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. The molecular bases of training adaptation. **Sports medicine**, v. 37, n. 9, p. 737-763, 2007.

CONESA, A. et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology**, v. 17, n. 13, p. 2- 19, 2016.

BELESINI, A. A. *Análise do transcriptoma de folhas de cana-de-açúcar submetidas à prolongada limitação hídrica usando RNA-Seq*. 2015. 124p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2015.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162-184, 2013.

GREGÓRIO, S. F. *Análise molecular e celular da resposta regenerativa da pele/escamas da dourada (Sparus aurata)*. 2009. 69p. Tese de Doutorado- Universidade do Algarve, Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, 2009.

MUELLER, O.; LIGHTFOOT, S.; SCHROEDER, A. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. **Tech. Rep. 5989-1165EN, Agilent Technologies, Application Note**, 2004. Disponível em: 10 de set. 2017. [<http://www.agilent.com/chem/labonachip>].

SERRA, V. et al. A. *Análise de qualidade de RNA para estudo do perfil transcriptômico de animais extremos para eficiência alimentar da raça Nelore*. In: JORNADA CIENTÍFICA - EMBRAPA SÃO CARLOS, 5, 2013, São Carlos, SP. *Anais...* São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste: Embrapa Instrumentação, 2013, p. 12.

VIEIRA, W. H. B. et al. Adaptação enzimática da LDH em ratos submetidos a treinamento aeróbio em esteira e laser de baixa intensidade. **Rev Bras Fisioter**, v. 10, p. 205-211, 2006.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, January, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.