COMPARAÇÃO ENTRE AS TEMPERATURAS PRECONIZADAS DE ESTOCAGEM DO RNA: ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO E QUALIDADE DO MATERIAL CONSERVADO

Gabriela de Freitas Santos[1]; Ieda Oliveira Silva [1]; André Luís Fernandes dos Santos[2]; Tamiris Invencioni Moraes[3].

1. Aluno do Curso de Análises Clínicas da Fundação Instituto de Educação de Barueri-ITB Maria Sylvia Chaluppe Mello.
2. Professor Doutor, do Curso de Análises Clínicas da Fundação Instituto de Educação de Barueri-ITB Maria Sylvia Chaluppe Mello.
3. Colaboradora do Centro Universitário Amparense – UNIFIA

RESUMO: o RNA é um polímero de nucleotídeos, normalmente em cadeia simples. As funções do RNA variam de acordo com a sua classe e podem atuar no processamento de proteínas. Com o avanço biotecnológico e questões de evolução, tornou-se importante o estudo do RNA, e conservar essa molécula preservando sua viabilidade, tem sido um desafio, é necessário que as amostras sejam manipuladas cuidadosamente, para que os resultados dos estudos da molécula não fiquem comprometidos, por isso é necessário atentar-se quanto à extração e conservação do RNA, para o sucesso da técnica empregada. O objetivo deste estudo é analisar e comparar a concentração e integridade do RNA armazenado em -70°C e -20°C em um período de 60 dias. Utilizamos amostras de fígado de ave, do qual o RNA foi extraído com o protocolo do reagente Trizol®, e armazenado 10 amostras de RNA em -70°C e 10 amostras em -20°C durante 60 dias. Os resultados de concentração e relações 260/280 e 260/230 das amostras foram determinados por espectrofotometria, que apresentou RNA de qualidade, porém contaminado por substância orgânica, possivelmente por fenol já que não houve purificação das amostras. A integridade da molécula foi determinada por eletroforese em gel de agarose 2%, onde identificaram bandas bem definidas e claras em ambas as amostras conservadas em -70°C e -20°C. Concluímos que tanto a temperatura de -70°C e -20°C são ideais para conservação deste ácido nucléico.

Palavras-chave: Extração de RNA, Trizol reagente, Temperatura de conservação de RNA

ABSTRACT

RNA is a polymer of nucleotides, usually in a single chain. The functions of RNA vary according to their class and can act in the processing of proteins. With the advancement of biotechnology and evolution issues, it has become important to study RNA, and to preserve this molecule while preserving its viability, has been a challenge, it is necessary that the samples be handled carefully, so that the results of the molecule studies do not remain compromised, so it is necessary to be careful about the extraction and conservation of RNA, for the success of the technique employed. The objective of this study is to analyze and compare the concentration and integrity of RNA stored at -70 ° C and -20 ° C over a period of 60 days. We used bird liver samples from which the RNA was extracted with the Trizol® reagent protocol, and stored 10 samples of RNA at -70 ° C and 10 samples at -20 ° C for 60 days. The results of concentration and 260/280 and 260/230 ratios of the samples were determined by spectrophotometry, which presented RNA of quality, but contaminated by organic substance, possibly by phenol since there was no purification of the samples. The integrity of the molecule was determined by 2% agarose gel electrophoresis, where well defined and clear bands were identified in both samples

stored at -70 ° C and -20 ° C. We conclude that both the temperature of -70 ° C and -20 ° C are ideal for the conservation of this nucleic acid.

Keywords: RNA extraction, Trizol reagent, RNA storage temperature.

1. INTRODUÇÃO

O RNA (ácido ribonucleico) é um polímero de nucleotídeos, normalmente em cadeia simples, em que cada nucleotídeo é formado por uma base nitrogenada, uma ribose e um agrupamento fosfato. As funções do RNA variam de acordo com a sua classe e podem atuar no processamento de proteínas (LEONTIS; WESTHOF, 2001).

Com o avanço biotecnológico e questões de evolução, tornou-se importante o estudo do RNA gereando uma grande quantidade de conhecimentos em biologia molecular. Existem vírus, como o HIV, que possuem apenas RNA como material genético, e o estudo dessa molécula pode fornecer mais esclarecimentos sobre a fase de ativação do vírus (MELO *et al*., 2010; SOLA *et al*., 2012).

Conservar as amostras de ácidos nucléicos, ou seja, preservar sua viabilidade, tem sido desafio atual; para isso são necessários métodos de manutenção, estocagem e conservação amostras (SOLA et al., 2012). Não existe um protocolo universal que determine a eficiência da estocagem e preservação do RNA a longo prazo. É necessário que as amostras sejam manipuladas cuidadosamente, para que os resultados dos estudos da molécula de RNA não fiquem comprometidos. É comum a degradação do RNA, por hidrólise, pela ação de ribonucleases (RNAses); as ribonucleases são muito estáveis. Sua atividade está associada à temperatura no qual é exposta, sendo inativada sob temperatura muito baixa (BORGES, 2014). Alguns autores preconizam armazenar o RNA em -70ºC e -20ºC, sendo mais comum à -70ºC (SOLA, 2012). Porém já foi constatada a degradação do RNA armazenado, durante oito meses, a -80ºC (OLIVIERI *et al*., 2014).

O objetivo deste trabalho, frente aos resultados conflitantes encontrados na literatura, é analisar e comparar a concentração e a integridade do RNA armazenado em -70ºC e -20ºC, em um período de estocagem de 60 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A amostra utilizada para o método foi fígado de ave (*Gallus gallus domesticus*) adquirido comercialmente, macerado em nitrogênio líquido e armazenado a -70º C durante 30 dias. A extração seguiu a metodologia indicada na bula do reagente Trizol®, que inclui a homogeneização, seguido pelo isolamento, separação de fases, precipitação, lavagem e ressuspensão do RNA em água nuclease *free*.

A integridade do RNA extraída foi verificada em gel de agarose 2% e a determinação da concentração foi feita por espectrofotometria no NanoDrop 1000®. As amostras foram estocadas em -20º C e -70º C por 60 dias. Após este período as mesmas foram descongeladas e novamente a integridade e concentração foram mensuradas.

A análise estatística dos dados foi realizada nos programas Microsoft Excel® (gráficos e estatísticas descritivas) e MiniTab® (inferência estatística). Na inferência estatística utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 5, pois as amostras não possuíam distribuição normal (teste de Kolmogorov-Sminorff).

3. RESULTADOS

Após o descongelamento das amostras, armazenadas em um período de 60 dias, foram comparados os resultados das concentrações e relações 260/280 e 260/230, obtidos no Nanodrop®.

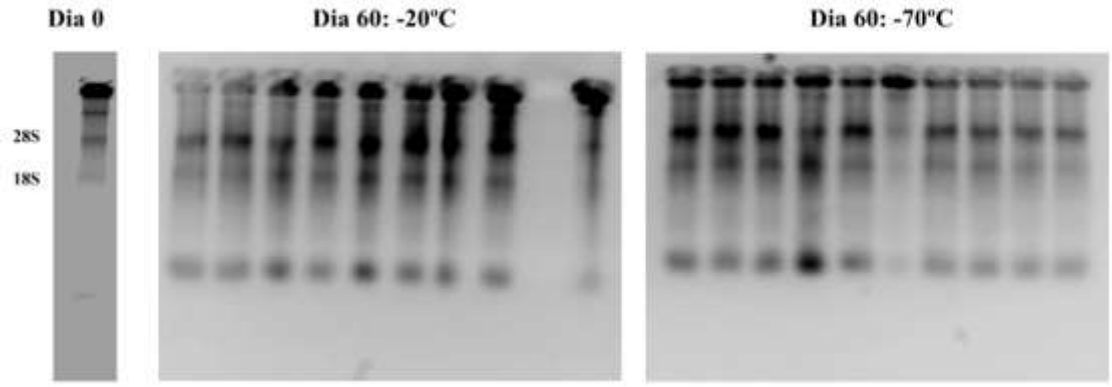
A solução inicial do dia 0, apresentou concentração média de 2299,4±242,0 ng/µL (260/280=1,91±0,06, 260/230= 0,87±0,05), enquanto as amostras armazenadas em um período de 60 dias em -20ºC apresentou a concentração média de 2245,4±15,5 ng/µL (260/280= 1,91±0,07, 260/230=0,90±0,08) e em -70ºC apresentaram, a concentração de 2218,2±5,4 ng/µL (260280= 1,91±0,04, 260/230= 0,89±0,03). A amostra 9, armazenada a -20ºC, secou durante o período de estocagem.

Tabela 1- Concentração, relação 260/280 e 260/230 da solução-mãe (dia 0) e das amostras armazenadas a -20ºC e -70ºC, durante 60 dias.

Amostras	Concentração (ng/µL)			Relação (260/280)			Relação (260/230)		
		Dia 60			Dia 60			Dia 60	
	Dia 0	-20°C	-70°C	Dia 0	-20°C	-70°C	Dia 0	-20°C	-70°C
1	2158,9	2106,7	2261,5	1,92	1,94	1,93	0,86	0,88	0,86
2	2224,7	2060,1	2251,6	1,91	1,94	1,92	0,84	0,86	0,89
3	2341,5	2087,8	2114,6	1,93	1,93	1,95	0,86	0,86	0,89
4	2414,8	2072,1	2363	1,93	1,93	1,89	0,88	0,86	0,9
5	2438,1	2133,4	2468,1	1,93	1,94	1,82	0,88	0,88	0,96
6	2907,3	2080,2	2194,2	1,75	1,94	1,91	1,02	0,81	0,88
7	2104,2	2162,8	2204,3	1,93	1,94	1,9	0,88	0,88	0,9
8	2118,4	2542,6	2121,9	1,93	1,91	1,93	0,84	0,95	0,85
9	2159		2104,3	1,93		1,94	0,85		0,88
10	2209,2	3102,1	2116,9	1,94	1,72	1,93	0,85	1,09	0,87
Mediana	**2217**	**2106,7**	**2199,3**	**1,93**	**1,94**	**1,93**	**0,86**	**0,88**	**0,89**
Média	**2299,4**	**2245,5**	**2218,2**	**1,91**	**1,91**	**1,91**	**0,87**	**0,9**	**0,89**
Desvio Padrão	**242**	**349,1**	**120,4**	**0,06**	**0,07**	**0,04**	**0,05**	**0,08**	**0,03**
Coef. de variação (%)	**10,5**	**15,5**	**5,4**	**2,97**	**3,76**	**1,94**	**6,06**	**9,06**	**3,39**

Após mensurar a concentração e relação 260/280 e 260/230, foi analisada a integridade das amostras armazenadas, comparando com a amostra inicial do dia 0. Não se observou na comparação da solução inicial com as amostras armazenadas a -20ºC e -70ºC sinais de degradação do DNA e observa-se as sub-unidades 28S e 18S.

Figura 1- Bandas de RNA corridas em gel de agarose 2%.



4. DISCUSSÃO

A metodologia do Trizol® possui baixo custo e extração do RNA eficaz em amostras frescas ou mantidas a -70°C; estas condições aplicam-se as amostras desse estudo, que foram armazenadas por 30 dias antes da extração do RNA (GOUVEIA *et al*, 2001). Outro fator importante para a extração do RNA

é a temperatura em que a mesma ocorre; observou-se que RNA extraído nas temperaturas de 4ºC e temperatura ambiente apresentam concentrações maiores, do que aquele extraído a -20ºC. O protocolo utilizado no presente estudo extraiu o RNA com as amostras em contato com gelo, ou seja, em uma temperatura próxima de 0°C e adequada à extração (AYALA-RAMIREZ *et al*, 2013).

As amostras armazenadas a -70° e -20°C, durante 60 dias, não apresentaram concentrações diferentes quando comparadas entre si e à extraída no dia 0 ($p>0,05$). Tanto as amostras de -70° e -20°C se mantiveram na média padrão da relação 260/280, ou seja, RNA livre de proteínas, e segundo os dados da relação 260/230 houve contaminação, possivelmente por conta do fenol, reagente utilizado para separar RNA das proteínas, pois não houve purificação das amostras(ND- 1000 Spectrophotometer v3.3 User's Manual, 2006). O RNA estava íntegro nas amostras armazenadas nas diferentes temperaturas, demostrando que não houve degradação das amostras em ambas as temperaturas, apesar da literatura preconizar que a temperatura de -20º não inibe a atividade das RNAses (MELO *et al*., 2010).

Em outra pesquisa, que também foi utilizado o protocolo do Trizol®, porém modificando a metodologia, as amostras foram armazenadas a -80°C e não houve resultados satisfatórios na concentração; já o protocolo do reagente Pure Link Plant RNA Reagent® obteve resultado satisfatório também em -80ºC. Esses estudos demonstram que a metodologia deve ser seguida conforme recomendações do fabricante, fato comprovado com as concentrações de RNA obtidas em nosso estudo (NAGASHIMA *et al.*, 2013).

Um estudo que extraiu RNA de folhas de *Passiflora edulis*, coma metodologia do Trizol®, em temperatura ambiente constatou que houve degradação do RNA ribossômicos, mas não do RNA mensageiro. Isso mostra que as subunidades do RNA ribossômico são bons indicadores da integridade do RNA, pois são mais sensíveis à degradação (LUZ; PRETTI; BATITUCCI, 2014). Por isso podemos afirmar que as nossas amostras, extraídas em uma temperatura próxima de 0°C, estavam íntegras após conservação em -20°C e -70°C, pois as subunidades ribossômicas não estavam degradadas.

5. CONCLUSÃO

Tanto as amostras de -70°C e -20°C apresentaram moléculas de concentração e integridade significativamente inalteradas, tendo em vista seu período de armazenamento de 60 dias. Houve contaminação das amostras, possivelmente por fenol já que não houve purificação, o que não alterou a qualidade do RNA, pois o gel de integridade evidenciou bandas definidas para ambas as temperaturas. As moléculas de RNA extraídas pelo Trizol®, podem ser armazenadas tanto em -70°C e -20°C sem alterar a concentração e integridade das mesmas.

6. REFERÊNCIAS

AYLA-RAMIREZ, P.A.; GONZALEZ-ROPERO, L.A.; GARCIA-ROBLES, R. Temperatura de almacenamiento y cantidad de ARN extraído de plasma materno. **Universitas Scientiarum,** v.18, n.2, p.181-187, 2013. Disponível em: https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/issue/view/470. Acesso em: 14 mai. 2017.

BORGES, J. Protocolo para conservação de RNA em temperatura ambiente por meio de liofilização. **Universidade Federal de Viçosa**, 2014. Disponível <https://www3.dti.ufv.br/sia/florestal/2014/trabalhos/3248>. Acesso em: 21 de nov.2016.

GOUVEIA, G.R.; FERREIRA, S.C.; SABINO, E.C.; SIQUEIRA, S.A.C.; PEREIRA, J. Comparison of three different protocols for extrating RNA from formalin- fixed paraffin- embedded tissoes**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.47, n.6, p.649-654, 2011. Disponível em < http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/bbr/article/view/15657/12940>. Acesso em: 10 mai. de 2017.

LEONTIS, N.; WESTHOF, E. Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. **RNA**, v.7,n.4, p.499-512, 2001.

LUZ, A. C.; PRETTI, I. R.; BATITUCCI, M. C. P. Comparison of RNA extraction methods for *Passiflora edulis* SIMS. **Rev. Bras. Frutic**., v. 38, n. 1, p. 226-232, 2016. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452016000100226&lng=pt&nrm=iso >. Acesso em: 18 mar. 2019.

MELO, M.R.; MARTINS, A.R.; BARBOSA, I.V.; SHCOLNIK, W. et al. Coleta, Transporte e Armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Bras Patol Med Lab**, v.46, n.5, p.375-381, 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v46n5/06.pdf> Acesso em: 21 nov. 2016.

NAGASHIMA, A.I.; HENNING, L.M.M.; PODANOSQUI, A.M.P.; MOREIRA, R.M.P.; HENNING, F.A. Comparação de protocolos para extração de RNA de Tegumentos de semente de soja. **Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, v.2, n. 3, p. 178-181, 2013. Disponível em <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/rt/printerFriendly/4671/6503>.Acesso em: 14 mai. 2017.

ND – 1000 Spectrophotometer. **User's Manual**. v.3.3, 2006.

OLIVIERI, E.H.R.; PEREIRA, R.G.; FRANCO, L.A.; MOTA, L.D.C. Biobanking Practice: RNA Storage at Low Concentration Affects Integrity, **Biopreservation and Biobanking**, v.12, n.1, p. 46-52, 2014.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Manutenção de microrganismos: Conservação e Viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14, p.1398-1418, 2012.. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biologicas/manutencao.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2016.