

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

**Estudo de expressão gênica em pau-ferro: estratégias otimizadas
para a detecção e análise de genes associados com tolerância à
seca**

Leonardo Furtado de Oliveira

**Dissertação apresentada à Universidade Federal do
Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento para a
obtenção do título de “Mestre”.**

**Teresina
2018**

Leonardo Furtado de Oliveira
Licenciado em Química

**Estudo de expressão gênica em pau-ferro: estratégias otimizadas para a
detecção e análise de genes associados com tolerância à seca**

Orientador: Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima
Co-orientadores: Dr. Lúcio Flavo Lopes Vasconcelos
Dr. Aderson Soares de Andrade Junior
Dr. Sergio Emilio dos Santos Valente

**Dissertação apresentada à Universidade Federal do
Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Genética e Melhoramento, área de
concentração em Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de “Mestre”.**

Teresina
2018

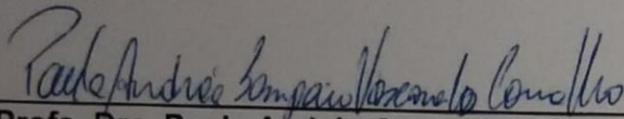
**Estudo de expressão gênica em pau-ferro: estratégias otimizadas para a
detecção e análise de genes associados com tolerância à seca**

Leonardo Furtado de Oliveira

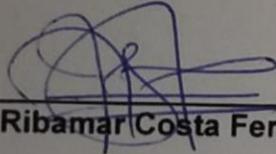
Licenciado em Ciências Biológicas

Aprovado em 31/08/2018

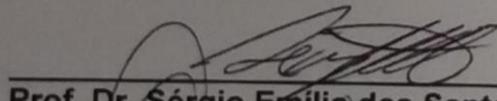
Comissão Julgadora:



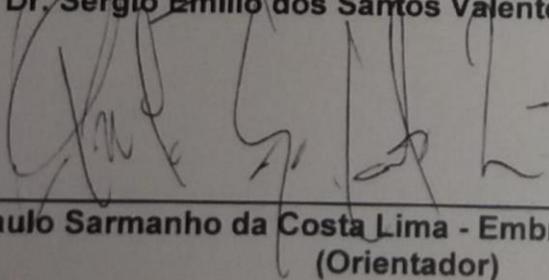
Profa. Dra. Paula Andréa Sampaio de Vasconcelos - UNESP



Prof. Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto - UFPE



Prof. Dr. Sérgio Emilio dos Santos Valente - CCN/UFPI



**Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima - Embrapa Meio Norte
(Orientador)**

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo companheirismo e todos os ensinamentos recebidos ao longo da vida.

À minha noiva, Jéssica Daniele, pelo incentivo a iniciar essa jornada, companheirismo e inestimável ajuda em todas as etapas do trabalho.

Ao meu colega de trabalho e orientador, Dr. Paulo Sarmanho, pelos conselhos, orientações e incentivo a iniciar esse desafio.

Ao corpo docente do programa de Pós-graduação em genética e melhoramento da UFPI pelo conhecimento transmitido.

Aos colegas de mestrado pela troca de conhecimentos e vivência.

À Embrapa Meio-Norte e seus funcionários por possibilitar meios para realização da pesquisa.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”. (Carl Sagan)

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Pau-ferro (<i>Caesalpinia ferrea</i>)	11
2.2 Mecanismos moleculares e genes de resistência a fatores abióticos.....	12
2.3 Genes ortólogos.....	14
2.4 PCR quantitativa em tempo real.....	16
2.6 Otimização e validação de ensaios RT-qPCR	19
REFERÊNCIAS	24
Resumo	33
Abstract	34
3.1 INTRODUÇÃO	35
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.2.1 Protocolos de extração de RNA e métodos de maceração avaliados	36
3.2.2 Avaliação do rendimento e pureza das amostras de RNA	38
3.2.3 Avaliação da integridade das amostras de RNA	38
3.3 RESULTADOS	40
3.4 DISCUSSÃO	49
3.5 CONCLUSÕES	54
3.6 REFERÊNCIAS	55
Resumo	57
Abstract	58
4.1 INTRODUÇÃO	59
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.2.1 Material biológico e local de estudo.....	60
4.2.2 Buscas das sequências dos genes e desenho dos <i>primers</i>	60
4.2.3 Otimização dos ensaios de RT-qPCR.....	61
4.3 RESULTADOS	63
4.3.1 Busca das sequências e desenho de <i>primers</i>	63
4.3.2 Otimização dos ensaios de RT-qPCR.....	64
4.4 DISCUSSÃO	70
4.5 CONCLUSÕES	73

4.6 REFERÊNCIAS	75
------------------------------	-----------

RESUMO

OLIVEIRA, L. F. **Estudo de expressão gênica em pau-ferro: estratégias otimizadas para a detecção e análise de genes associados com tolerância à seca.** 76p. Dissertação (Mestrado/Genética e Melhoramento) – UFPI, Teresina, Brasil, 2018.

A seca é o problema que mais afeta a produção e a sustentabilidade de muitas culturas agrícolas. Quando submetidas ao estresse hídrico, as plantas desenvolveram uma série de respostas, incluído a mudança na expressão gênica. O presente trabalho objetivou prospectar e otimizar ensaios RT-qPCR (transcrição reversa do RNA codificante (RNAm) combinada à PCR quantitativa em tempo real) de genes ortólogos relacionados à tolerância ao estresse hídrico (HSP70, NAC e DREB) e genes ortólogos de referência (GAPDH, β -Actina e eEF1A) utilizando o transcriptoma do pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*), bem como avaliar protocolos de extração de RNA total de folha e raiz de pau-ferro. A avaliação dos protocolos mostrou que o protocolo modificado Híbrido-CTAB obteve rendimento de RNA, parâmetros de pureza e integridade superiores aos protocolos comercialmente disponíveis avaliados. Todos os *primers* desenhados para os genes ortólogos amplificaram por RT-qPCR utilizando RNA de pau-ferro como molde. Os resultados das eficiências de amplificação de todos os genes variaram de 93% a 106,87%. Os coeficientes de correlação (reprodutibilidade) variaram de 0,986 a 0,998 e da faixa dinâmica linear igual a 5log evidenciaram a robustez e precisão das reações. O resultado das curvas de *melting* e os controles de contaminação (NTC e –RT) demonstraram a especificidade dos ensaios RT-qPCR que foram confirmados através de eletroforese em gel de agarose.

Palavras-chave: estresse hídrico; forrageira; transcriptoma

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. F. **Gene expression analysis in pau-ferro: strategies optimized for the detection and analysis of genes associated with drought tolerance.** 76p. Dissertation (Master /Genetics and Breeding) – UFPI, Teresina, Brazil, 2018.

Drought is the problem that most affects the production and sustainability of many agricultural crops. When submitted to water stress, the plants developed a series of responses, including the change in gene expression. The present work aimed to prospect and optimize RT-qPCR (reverse transcription of coding RNA (mRNA) combined with real-time quantitative PCR) of orthologous genes related to hydric stress tolerance (HSP70, NAC and DREB) and reference orthologous genes (GAPDH, β -Actin and eEF1A) using the pau-ferro transcriptome (*Caesalpinia ferrea*), as well as evaluating protocols for the extraction of total leaf and root RNA from pau-ferro. The evaluation of the protocols showed that the modified CTAB-Silica protocol obtained RNA yield, parameters of purity and integrity superior to the commercially available protocols evaluated. All primers designed for orthologous genes amplified by RT-qPCR using pau-ferro RNA as template. The results of the amplification efficiency of all genes ranged from 93% to 106.87%. The correlation coefficients (reproducibility) ranged from 0.986 to 0.998 and the linear dynamic range of 5 log showed the robustness and precision of the reactions. The results of the melting curves and the contamination controls (NTC and -RT) demonstrated the specificity of the RT-qPCR assays that were confirmed by agarose gel electrophoresis.

Key words: forage; water stress; transcriptome.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura utiliza a maior parte da água com qualidade para consumo humano e o seu emprego deverá diminuir para se adequar à crescente preocupação com o uso responsável dos recursos hídricos, incentivando o desenvolvimento de cultivares e tecnologias que proporcionem uma maior eficiência no aproveitamento da água (USDA, 2017).

O déficit hídrico é um dos fatores que mais limita a distribuição, o crescimento, a produtividade dos ecossistemas e o rendimento das culturas, pois além de ser um componente constitutivo essencial, desempenha um papel funcional vital, na medida em que fornece um ambiente perfeito para a maioria das reações bioquímicas das células das plantas. Como consequência, o déficit hídrico acarreta em restrições superiores a outros fatores abióticos e bióticos (GRISI et al., 2008).

A prospecção e estudo funcional de genes relacionados à tolerância a seca têm se beneficiado do grande acúmulo de sequências de plantas modelo em bancos de dados público. O conhecimento acumulado nas plantas modelos pode ser usado em espécies que possuem poucos estudos científicos e que não possuem sequências depositadas. Essa estratégia aproveita o fato de que muitas espécies possuem ascendentes em comum e muitas de suas rotas metabólicas são altamente conservadas, como consequência de compartilharem genes ortólogos.

Os genes ortólogos são uma subcategoria de genes homólogos que existem em diferentes espécies e que derivam de um ancestral comum. Embora os genes ortólogos sejam genes homólogos derivados de um evento de especiação, nem sempre existe uma equivalência funcional, tornando-se importante a obtenção de informações de estudos de expressão gênica entre espécies relacionadas evolutivamente (STUDER; ROBINSON-RECHAVI, 2009).

A prospecção, identificação e quantificação dos níveis de expressão de genes envolvidos nos mecanismos de tolerância a seca presentes em espécies não domesticadas como a forrageira pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*) que ocorre no semiárido piauiense, pode melhorar o entendimento do controle genético da resistência ao estresse hídrico e também ajudar os programas de melhoramento, na medida em que espécies como essa, são adaptadas à ambientes com longos períodos de seca, podendo apresentar muitas formas, ou até novos genes relacionados a tolerância a fatores abióticos (BENKO-ISEPON et al., 2011).

A transcrição reversa do RNA codificante (RNAm) combinada à PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), permite a quantificação dos níveis de expressão de genes de interesse com rapidez, especificidade e sensibilidade, sendo a técnica mais robusta para quantificação de transcritos individuais. Porém, uma série de deficiências técnicas e fontes de variação podem afetar um ensaio de RT-qPCR, que devem ser otimizados e validados para algumas condições básicas visando garantir a precisão dos ensaios antes da obtenção dos dados experimentais de expressão gênica (BUSTIN, 2002; BUSTIN et al., 2009; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008)

O estudo buscou avaliar protocolos de extração de RNA total com relação ao rendimento, pureza e integridade exigidas em ensaios RT-qPCR, bem como prospectar e otimizar ensaios RT-qPCR de genes ortólogos relacionados à tolerância ao déficit hídrico e genes ortólogos de referência utilizando o transcriptoma da forrageira pau-ferro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*)

Caesalpinia ferrea, popularmente conhecida como pau-ferro ou Jucá, pertence à família das leguminosas (Fabaceae) e a subfamília *Casealpinioideae* que possui 171 gêneros e cerca de 2250 espécies de árvores e arbustos, que se espalham nas regiões tropicais e subtropicais (ABDEL-HAMEED et al., 2013). A maior parte das espécies se distribuem pela África, América e parte da Ásia. No Brasil, é possível observar uma boa representatividade dessas espécies (RIBEIRO et al., 1999).

O pau-ferro é uma forrageira arbórea que se distribui na região semiárida do Brasil principalmente nas regiões Norte e Nordeste. Essa espécie é muito usada pela população sertaneja na construção de casas e na produção de utensílios e ferramentas devido à resistência de seu tronco, característica que originaram seu nome popular. Por ser uma planta perene, suas folhas e frutos servem de alimento para bovinos, caprinos e ovinos, principalmente no período de estiagem. Apesar de ser citada como forrageira, muitos estudos destacam sua importância como planta ornamental, e sua utilização na medicina popular, por suas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes, antiúlcera, expectorante e antibacteriana (CARVALHO et al., 1996; CAVALHEIRO et al., 2009; LIMA et al., 2012).

Ao longo das últimas décadas, as plantas da caatinga têm demonstrado conter importantes moléculas bioativas, como flavonoides e taninos, bem como diversas classes de fármacos (ARAÚJO et al., 2008). Os extratos retirados das folhas, caules e frutas do pau-ferro foram relatados por Nakamura et al. (2002) como anticancerígenos. Pereira et al. (2012) também relataram as propriedades antitumorais e anti-inflamatórias do fruto dessa espécie, bem como sua importância como fonte alternativa de energia na alimentação de ruminantes. Nozaki et al. (2007) isolaram e identificaram, a partir do caule da *C. ferrea*, um potente inibidor da ação da enzima topoisomerase II que induz a apoptose, reduzindo a proliferação de células de leucemia humana.

Na literatura, existem poucos estudos moleculares que usem o pau-ferro. Os trabalhos existentes não possuem representatividade com a grande área geográfica que se encontra espalhada essa espécie e visam caracterizar a diversidade genética de acessos encontrados em bancos de germoplasma. Também não há relatos de estudos de transcriptomas e de expressão gênica.

Autores como Silva et al. (2017) caracterizaram e avaliaram a diversidade genética de acessos de pau-ferro do banco de germoplasma da Embrapa Meio-Norte utilizando marcadores ISSR, e observaram a presença de diversidade genética e a formação de grupos distintos dentro de uma mesma população.

Estudando o perfil enzimático de diferentes genótipos de pau-ferro, Santos et al. (2010) observaram polimorfismo enzimático, evidenciando diversidade entre os indivíduos. Sousa et al. (2014) avaliaram diferentes protocolos de extração de DNA utilizando folhas da pau-ferro destacaram a importância de estudos de caracterização da diversidade genética dessa espécie em virtude da devastação, e conseqüentemente, perda de variabilidade causada pela coleta indiscriminada de sua madeira pela população local.

2.2 Mecanismos moleculares e genes de resistência a fatores abióticos

As plantas possuem bilhões de pares de base em seu DNA. Dentre os milhares de genes, somente alguns são expressos, em um dado momento pela planta. Os genes que são expressos sob uma determinada condição externa, natural ou induzido, podem determinar os processos vitais necessários para adaptação e sobrevivência das células. A comparação da expressão diferencial gênica em diferentes condições fornecem a informação básica necessária para compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos (LIANG; PARDEE, 1992; OH et al., 2012)

A condição de déficit hídrico em plantas inicia uma série de respostas. Inicialmente ocorre a percepção do estresse, onde é desencadeada uma cascata de mecanismos moleculares que possibilitam vários níveis de respostas metabólicas, moleculares e de desenvolvimento (BRAY, 1993). A pouca disponibilidade de água nas plantas provoca uma diminuição no volume das células, alterando o potencial de pressão (tensão física; turgor) e o potencial osmótico (concentração) dos componentes celulares. Alterações na membrana celular e em seus constituintes, assim como o aumento da concentração de metabólicos, também são consequência da desidratação celular. Todos esses eventos ativam alguns complexos enzimáticos, que iniciam uma complexa rede de mecanismos moleculares induzindo a expressão de várias categorias de genes (KASUGA et al., 1999).

Genes que alteram sua expressão pelo estresse hídrico permitem que as plantas tenham resistência à desidratação das células; modificações no potencial osmótico para otimizar a absorção de água; mecanismos de proteção do citoplasma;

regulação do acúmulo de íons; regulação da expressão de outros genes e a metabolização de compostos produzidos pelo estresse (BRAY, 1993). Pesquisas recentes têm focado no esclarecimento dos mecanismos fisiológicos e genéticos envolvidos na tolerância à seca em plantas, com a identificação de importantes genes e a interação que ocorre entre eles (HUANG et al., 2012).

Os mecanismos genéticos de percepção e resposta ao déficit hídrico podem ser divididos em duas categorias: (I) responsáveis pela cascata de sinalização e controle transcricional como fatores de transcrição DREB (*dehydration responsive element binding*), NAC; (II) aqueles que participam diretamente na preservação de membranas e proteínas HSP (*heat shock proteins*), chaperonas, proteínas LEA (*Embriogenese tardia abundante*), prolinas (SEKI et al., 2002).

O gene que codifica as proteínas LEA participa de mecanismos de proteção contra danos causados por estresses ambientais, especialmente a desidratação. Muitos estudos mostram que essas proteínas se acumulam nas células das plantas sob déficit hídrico e que suas funções são relacionadas com proteção de membranas, sequestro de íons, e retenção de água. A síntese, expressão e atividades biológicas da proteína LEA são reguladas por muitos fatores (por exemplo: estágios de desenvolvimento, hormônios, concentrações de íons e desidratação) e vias de transdução de sinal (HONG-BO; ZONG-SUO; MING-AN, 2005).

As proteínas HSP são outro conjunto de produtos gênico encontrados em plantas submetidas a períodos de estiagem e alta temperatura. Foram identificadas primeiramente como uma resposta ao calor, ajudando no correto dobramento ou na prevenção da desnaturação de outras proteínas (LOPES-CAITAR et al., 2013). Os genes HSP são altamente conservados e seus produtos gênicos podem ser divididos pelo peso molecular de suas proteínas (ex.: HSP90, HSP70, HSP60). Os genes que codificam as proteínas HSP70 e HSP60 parecem ser particularmente importantes na proteção e na inibição da desnaturação. Ambas se ligam e ajudam a manter a correta estrutura terciária de certas proteínas. Durante o déficit hídrico em plantas, ocorre uma desnaturação e agregação de proteínas, e uma maior expressão de HSP possibilitaria a proteção de algumas outras proteínas durante o estresse osmótico (AL-WHAIBI, 2011). Lopes-Caitar et al. (2013) analisaram o perfil de expressão de uma família de HSP em soja e revelaram que sua ativação ocorre pelo aumento da temperatura. Esse grupo de genes é altamente conservado, e muitos apresentam participação em processos biológicos não relacionados ao estresse abiótico.

Os produtos da expressão gênica não apenas participam diretamente na preservação de membranas e proteínas nas células de plantas desidratadas. Também existem fatores de transcrição que regulam a expressão de vários genes relacionados ao estresse. Uma dessas classes de fatores de transcrição é o DREB/CBF que se liga a elementos responsivos em resposta à seca. Os DREB pertencem a uma família de fatores de transcrição ERF consistindo em duas subclasses: DREB1/CBF e DREB2 que são induzidas por frio e desidratação, respectivamente. Os DREBs aparentemente estão envolvidos na via de sinalização de estresse abiótico. Tem sido possível desenvolver a tolerância ao estresse em plantas transgênicas manipulando a expressão de DREBs (AGARWAL et al., 2006). Em *Arabidopsis thaliana*, que são plantas modelos utilizadas para ensaios gênicos, os DREBs desempenham um papel importante na tolerância ao frio, à seca e ao calor (SCHRAMM et al., 2007). O aumento da expressão desses genes também desempenha um papel semelhante no milho (LIU et al., 2013).

Outro importante fator de transcrição em situações de estresse abióticos são os genes NAC. Os fitohormônios desempenham papel fundamental em muitos processos relacionados ao estresse hídrico em plantas. A percepção adequada e adaptação às flutuações hormonais são em grande parte controladas por proteínas regulatórias, incluindo fatores de transcrição NAC (JENSEN et al., 2010). Várias proteínas NAC foram relatadas estarem envolvidas em processos de interação com hormônios durante o desenvolvimento das plantas e que possibilitaram diferentes níveis de adaptações a estresses ambientais (FUJITA et al., 2004).

2.3 Genes ortólogos

A prospecção e o estudo funcional de genes relacionados ao déficit hídrico em plantas têm se beneficiado do grande acúmulo de sequências de organismos modelo depositadas nos bancos de dados públicos. Os organismos modelo mais estudados em plantas são *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa* L.), *Medicago truncatula*, entre outras (FIELDS & JOHNSTON 2005).

O conhecimento acumulado em plantas modelo pode ser usado em espécies mais complexas ou que possuam poucos estudos científicos e tecnologias desenvolvidas. Esta estratégia aproveita o fato de que muitas espécies vegetais possuem ascendentes em comum. O processo evolutivo entre as espécies faz com que muitas rotas metabólicas sejam altamente conservadas. A análise da expressão

gênica em arroz e *Arabidopsis*, induzidas ao estresse hídrico, revelaram alta correspondência de genes ortólogos diferencialmente expressos e evidenciaram que a resistência à desidratação em plantas tem evoluído através de mecanismos conservados (MOVAHEDI; VAN DE PEER; VANDEPOELE, 2011).

Os genes ortólogos são subcategorias de genes homólogos que ocorrem em diferentes espécies e derivam de um ancestral comum. Podem apresentar funções equivalentes nos organismos que ocorrem em virtude de uma similaridade do domínio proteico (POWELL et al., 2012). São usados na análise filogenética das espécies como ferramenta da genômica comparativa, mais especificamente na inferência sobre identificação e propriedades funcionais dos genes. Também são usados como marcadores em estudos de diversidade, inclusive em espécies que não possuem genoma sequenciado. Embora os genes ortólogos sejam genes homólogos derivados de um evento de especiação, nem sempre existe uma equivalência funcional, tornando-se importante a obtenção de informações de estudos de expressão gênica entre espécies relacionadas evolutivamente (STUDER; ROBINSON-RECHAVI, 2009).

Uma importante contribuição da análise da expressão de genes ortólogos é na transferência de genes de interesse. No melhoramento genético clássico, genes são transferidos através de cruzamentos, porém esse é um método demorado e muitas vezes apresenta o inconveniente de transferir genes de interesse ligados a genes deletérios (HOLME et al., 2012). Utilizando ferramentas da engenharia genética, essa transferência pode ocorrer de maneira direta. Se a transferência ocorrer entre espécies distintas recebe o nome de transgenia. Por outro lado, se a transferência direta ocorrer na mesma espécie, ou entre espécies sexualmente compatíveis, o processo recebe o nome de cisgenia.

As culturas cisgênicas apresentam a vantagem de terem uma melhor aceitação do público, ao mesmo tempo que possuem uma menor preocupação ambiental em relação ao seu uso quando comparadas as culturas transgênicas. Segundo a Lei brasileira de Biossegurança (11.105/05), os transgênicos e cisgênicos são considerados organismos geneticamente modificados (OGM) (BRONDANI, 2018).

Os genes ligados à resistência ao estresse hídrico são fortes candidatos à cisgenia. No entanto, esses genes devem ser criteriosamente selecionados através de estudos de quantificação da expressão gênica (SCHOUTEN; KRENS; JACOBSEN, 2006).

Uma alternativa para compreender o funcionamento dos fatores que atuam na reação das plantas ao déficit hídrico é o uso de ferramentas de biologia molecular na identificação e quantificação dos genes envolvidos no mecanismo de tolerância à seca presentes nas espécies não domesticadas, como as forrageiras que ocorrem no semiárido piauiense, que possuem a capacidade de sobreviver em condições de déficit hídrico. Por estarem adaptadas a ambientes com longos períodos de seca, podem apresentar muitas formas e até mesmo novos genes de tolerância que ajudariam os programas de melhoramento genético de plantas (BENKO-ISEPON et al., 2011).

Com a quantidade crescente de genomas sequenciados em bancos de dados, várias sequências de genes envolvidos na expressão de resistência ao déficit hídrico estão disponíveis, o que possibilita o planejamento de ensaios tanto *in silico* como *in vitro*. Dentre as sequências disponíveis encontram-se as dos genes LEA, HSP70, NAC (gene p5cs) e DREB que expressam alguns mecanismos de respostas ao déficit hídrico.

A identificação, avaliação e uso de genes ortólogos nas forrageiras nativas da região do semiárido nordestino poderão ampliar as alternativas para mitigar os impactos provenientes da baixa precipitação pluviométrica nas regiões produtoras. Com o auxílio da genômica funcional e estudos de expressão gênica, é possível prospectar e avaliar genes que conferem resistência a estresses abióticos em espécies não domesticadas e não sequenciadas. Dessa forma, possibilitariam aprofundar o conhecimento sobre as bases moleculares e genéticas que auxiliam as plantas a sobreviver em condições adversas.

2.4 PCR quantitativa em tempo real

Existem diversas maneiras de analisar as mudanças em uma célula, que são induzidas por agentes artificiais ou naturais, durante um processo biológico. Uma maneira é identificar e quantificar alterações nos níveis dos transcritos celulares que podem indicar uma mudança correspondente nos níveis de suas proteínas (LOWE et al., 2017).

Inicialmente, as primeiras tentativas de quantificar ácidos nucleicos, ou o nível de expressão de um gene, envolviam a utilização de radiomarcadores em culturas de células ou outro tipo de preparação *in vitro*, onde se media sua incorporação em ácidos nucleicos através de sua precipitação. A incorporação radioativa fornecia uma

ideia sobre as mudanças globais nos ácidos nucleicos em um sistema experimental, mas não era adequada para identificar e quantificar genes ou transcritos específicos. A identificação de genes específicos teve um primeiro avanço através do desenvolvimento dos métodos de transferência *Southern* e *Northern*. Nestes métodos, fragmentos de restrição de DNA ou RNA são hibridizados com sondas marcadas radioativamente através de uma membrana de transferência. Porém, ambos os métodos possuem dificuldade de extrair qualquer informação quantitativa da expressão de um gene específico (SOUTHERN, 1975; ALWINE; KEMP; STARK, 1977)

O grande avanço na quantificação de ácidos nucleicos específicos foi possibilitado com a introdução da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kerry Mullis em 1983. Usando a PCR, sequências específicas contidas em DNA ou cDNA (DNA complementar) podem ser amplificadas ou copiadas milhões de vezes utilizando oligonucleotídeos de sequência específica, enzima polimerase estável ao calor e ciclos controlados de temperatura (MULLIS, 1990).

A PCR, teoricamente, é uma reação exponencial que duplica a sequência alvo de DNA (*amplicons*) a cada ciclo de amplificação. Logo após seu desenvolvimento, os cientistas perceberam que o número de ciclos e a quantidade final do *amplicon* poderiam ser usados para determinar a quantidade inicial de DNA usado como molde.

Na reação de PCR quantitativa em tempo real, a quantidade de DNA amplificado é medida após cada ciclo por meio de moléculas fluorescentes que geram um sinal crescente proporcional ao número de *amplicons* formados, permitindo o monitoramento em tempo real. O sinal de fluorescência, coletado na fase exponencial, fornece o Ct (*threshold cycle*) que é o principal parâmetro usado pelo equipamento de PCR em tempo real para efetuar as quantificações. O valor do Ct é igual ao número de ciclos que uma reação precisa para atingir um determinado nível de fluorescência acima da fluorescência de fundo, ou ruído do equipamento, e dentro da fase exponencial de amplificação. Considerando que a PCR é uma reação exponencial 2^n (100% de eficiência) onde (n) é o número de ciclos, se uma reação possuir metade do DNA alvo inicial de outra reação, então ela terá um Ct com um ciclo a mais no valor, ou seja, o Ct é inversamente proporcional ao material de partida da PCR. As moléculas fluorescentes mais utilizadas na PCR em tempo real incluem: intercalantes de DNA fita dupla e sondas que hibridizam os produtos da PCR (ARYA et al., 2005; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

A transcrição reversa do RNA codificante (RNAm) combinada à PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), permite a quantificação dos níveis de expressão de genes de interesse com rapidez, especificidade e sensibilidade, mesmo que os níveis do transcrito de interesse sejam mínimos quando comparadas a outros genes que não são alvo do estudo. Nessa técnica, primeiramente, os RNAm são transcritos em moléculas de DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa. Esse cDNA é então usado como molde em reações de PCR em tempo real. Em cada ciclo da PCR, os *amplicons* polimerizados são detectados e os dados de fluorescência geram um Gráfico de amplificação que possibilita quantificar as diferenças no nível de expressão de um gene entre amostras diferentes (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010; LOBO; LOBO, 2014; DIE et al., 2016).

Existem dois tipos de quantificação utilizando a PCR quantitativa em tempo real. Na quantificação absoluta, é quantificado o número total de transcritos de um gene, ao relacionar o sinal de amplificação da PCR alvo desconhecida com o número de cópias de entrada de uma curva de calibração. As curvas de calibração podem ser derivadas de produtos diluídos da PCR, DNA recombinante e plasmídeos linearizados. Na quantificação relativa ou comparativa, mede-se a variação na expressão de determinado gene de interesse (genes cuja expressão varia de acordo com o estresse ao qual o organismo é submetido) em amostras tratadas em relação as amostras controle. Essa variação de expressão entre tratado e controle são normalizados pelos resultados de expressão de genes de referência, ou seja, genes cuja a expressão é constante em todas as condições no qual o organismo é submetido experimentalmente. Na abordagem relativa, não é necessário a construção de curva de calibração com padrões de concentração conhecidos, e os níveis de expressão de um gene são medidos em relação a uma referência que pode ser qualquer transcrito de sequência conhecida (BUSTIN, 2002; NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006; KITCHEN; KUBISTA; TICHOPAD, 2010a).

A quantificação relativa da expressão de um gene de interesse por RT-qPCR é o método mais eficaz e informativo na detecção de alterações mínimas na expressão de RNAm de interesse, porque compara quantas vezes um gene de expressão variável foi mais ou menos expresso na amostra tratada em relação a amostra controle, devido a uma condição ambiental a qual foi submetida. Além disso, os genes de referência cumprem o papel de normalizar os dados, controlando uma possível

variação na quantidade de amostra (cDNA) pipetada nas reações, garantindo, dessa forma, que as variações relativas ao gene de interesse nas amostras tratadas e amostras controle são exclusivas ao tratamento. A referência pode ser coamplificado com o gene de interesse no mesmo tubo em um ensaio multiplex (controle endógeno), ou pode ser amplificado em tubos diferentes (controle exógeno) (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010)

Para calcular o nível de expressão de um gene alvo, são utilizados parâmetros de fluorescência no equipamento de PCR em tempo real que são usados para determinar a diferença (Δ) entre o gene de referência e o de interesse, sendo denominados de métodos Δ Ct. Um segundo nível de complexidade pode ser adicionado na comparação relativa de expressão, ao se comparar o nível de expressão com um indivíduo ou amostra calibradora, que pode ser: uma amostra não tratada, tempo zero, tipo específico de tecido etc.). Essas comparações mais complexas são classificadas como métodos $\Delta\Delta$ Ct (BUSTIN, 2002; NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006; DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

2.6 Otimização e validação de ensaios RT-qPCR

RT-qPCR é o método mais eficaz na quantificação de um RNAm específico devido sua especificidade, ampla faixa dinâmica, sensibilidade e boa reprodutibilidade. Porém, uma série de deficiências técnicas e fontes de variação podem afetar um ensaio de RT-qPCR: o desenho dos *primers* e a escolha dos *amplicons*; número de repetições inadequadas; qualidade do RNA utilizado; eficácia da transcrição reversa; os controles de contaminação; os genes de referência escolhidos e o sistema químico de fluorescência adotado. Nesse sentido, o planejamento e a análise dos dados são cruciais em qualquer sistema experimental. Independente do equipamento de PCR em tempo real utilizado na quantificação, algumas condições básicas devem ser atendidas para garantir a robustez dos ensaios (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008; KITCHEN; KUBISTA; TICHOPAD, 2010a).

Bustin et al. (2009), em um esforço para uniformizar procedimentos, nomenclaturas, termos e estabelecer critérios para gerar dados com qualidade, estabeleceram o guia de diretrizes MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*). Esse guia estabelece um fluxo de trabalho que envolve várias etapas: desenho de *primers* e *amplicons*; amostras controle;

controle de qualidade do RNA; eficiência de amplificação dos genes; demonstração da especificidade e sensibilidade dos ensaios e confirmação da reprodutibilidade. Dessa forma, todo ensaio de RT-qPCR deve ser otimizado e validado sob a luz desses critérios básicos antes de serem usados na obtenção de dados experimentais de expressão gênica.

O desenho dos *primers* é o primeiro passo na RT-qPCR. Deve-se garantir uma amplificação específica e eficiente dos genes em meio a diversos outros transcritos que não são alvo do estudo e que podem ser mais abundantes. O tamanho dos *amplicons* deve ser entre 50 e 150pb, pois produtos longos tendem a não amplificar eficientemente. Os *primers* devem ter entre 18 e 24 nucleotídeos. Em resumo, os *primers* devem ser concebidos de acordo com critérios de uma PCR de sequência específica padrão: porcentagem de conteúdo CG no *primer*; estabilidade da extremidade 3'; complexidade do primer; temperatura de *melting*; formação de estruturas secundárias nos *primers* e *amplicons*. Devido a sua natureza quantitativa e do fato de suas amplificações serem oriundas de cDNA gerados a partir de RNA, os ensaios de RT-qPCR necessitam de uma maior atenção de bioinformática. Bancos de dados genômicos devem ser consultados para obter as sequências das espécies estudadas ou relacionadas antes dos desenhos dos *primers*. Submeter as sequências a uma análise de bioinformática para avaliar a significância ou não dos alinhamentos é essencial para garantir que os iniciadores reconheçam apenas os alvos do estudo (BUSTIN et al., 2009; DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Obtidos os *primers* que irão amplificar os genes, o próximo passo é extrair o RNA total que contém os produtos de expressão. Diferente do DNA, que está nas células durante todo seu ciclo de vida, o RNA possui uma natureza transitória que depende muito do estágio de desenvolvimento, do tipo de célula, do ambiente ou mesmo de uma patologia. Além disso, a molécula de RNA é extremamente susceptível à degradação pela ação de nucleases do tipo RNAses que são resistentes e abundantes. Isso torna o isolamento, quantificação e o controle de qualidade do RNA uma das etapas essenciais para obtenção de dados de expressão precisos e relevantes. Os métodos de extração e purificação de RNA variam em facilidade de uso, rendimento, necessidade de uso de solventes orgânicos e pureza das amostras em relação ao DNA genômico, proteínas e solventes orgânicos (BUSTIN, 2002; FLEIGE et al., 2006; BUSTIN et al., 2009).

A obtenção de RNA de boa qualidade é o ponto de partida para diversos processos que visam avaliar e quantificar a expressão de genes. A natureza transitória e o tempo de meia-vida naturalmente curto do RNA, dificulta e faz com que sejam necessários cuidados especiais no processo de extração. (BUSTIN et al., 2009).

A extração de RNA de plantas é dificultada devido à presença polissacarídeos, metabólicos secundários e muitas classes de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos e metabólicos secundários se ligam covalentemente aos ácidos nucleicos, e acabam por oxidar e degradar o RNA (LOOMIS, 1974). Muitos desses contaminantes possuem características físico-químicas semelhantes aos ácidos nucleicos e acabam sendo coisolados, podendo inviabilizar todos os processos que necessitam de um RNA com bom rendimento e qualidade (SHARMA; GILL; SINGH, 2003). O isolamento e purificação de RNA de plantas não domesticadas como o pau-ferro, aumentam a dificuldade, na medida em que não existem estudos de avaliação de protocolos para servir como ponto de partida, possibilitando a modificação e otimização de métodos e comparação de resultados.

Independentemente do método de extração adotado, a quantificação e avaliação da pureza e integridade do RNA são obrigatórios para obter ensaios de RT-qPCR válidos. Uma triangulação de técnicas é a forma mais eficaz de garantir a qualidade do RNA. A espectrofotometria fornece o rendimento total de ácidos nucleicos e as razões de absorvância avaliam a pureza. Fluorímetros quantificam especificamente o RNA e/ou DNA. A integridade pode ser avaliada em géis eletroforéticos desnaturantes e mais precisamente em equipamentos de eletroforese capilar que fornecem uma nota (RIN: *RNA integrity number*) para o grau de integridade do RNA ou em reações RT-qPCR para avaliação das curvas de amplificação e valores de Cts. (LING et al., 2013; SILVA et al., 2016; AZIZI et al., 2017).

O conjunto de cDNAs obtidos da transcrição reversa do RNA são usados como molde para amplificação dos genes na RT-qPCR. A temperatura de anelamento de cada gene do estudo deve ser obtida experimentalmente através de diferentes reações de amplificação em diferentes temperaturas. A temperatura de anelamento escolhida será a que obter o menor Ct com uma amplificação específica. O sistema químico também tem papel relevante na otimização do ensaio RT-qPCR e no controle da especificidade das reações. Os dois principais sistemas são as sondas que hibridizam os *amplicons* (TaqMan®) e os intercalantes de DNA fita dupla (SYBR® Green)(BUSTIN et al., 2009).

O sistema SYBR® Green é o mais usado devido seu menor custo e maior facilidade de uso. Porém, devido a molécula de SYBR® Green se intercalar em qualquer fita dupla de DNA, deve-se ter um maior cuidado com ampliações inespecíficas. A curva de *melting* executada no final de cada reação de RT-qPCR é a maneira mais simples e direta de verificar a existência de artefatos dímeros e fragmentos inespecíficos. A verificação do tamanho dos *amplicons* por eletroforese em gel de agarose confirmam e validam a especificidade dos ensaios de RT-qPCR (BUSTIN et al., 2009; DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010; TAYLOR et al., 2010).

Os controles negativos também são importantes e sempre devem ser incluídos nas ampliações por RT-qPCR. O NTC (*no template control*) garante que a fluorescência medida é proveniente da amostra e não de contaminantes. O –RT (*no reverse transcription control*) permite avaliar a presença de contaminação com DNA genômico. Esse controle é uma amostra de RNA tratada da mesma forma que as amostras de RNA usadas para amplificar os genes. O RNA que origina o controle –RT é tratado com DNase para degradar o DNA genômico e posteriormente recebe todos os reagentes para síntese do cDNA com exceção da enzima transcriptase reversa. Como não há síntese de cDNA, ampliações nos controles –RT indicam que o tratamento com DNase não está sendo eficaz e que DNA genômico está sendo usado como molde nas reações de RT-qPCR, superestimando a quantificação da expressão dos genes alvos.

A obtenção da curva de eficiência de amplificação de cada gene do estudo é o melhor e mais informativo indicativo sobre a precisão e robustez de um ensaio de RT-qPCR. Teoricamente, uma reação de amplificação em tempo real duplica a cada ciclo e tem uma eficiência de 100%. A eficiência real de amplificação de um gene é o parâmetro que melhor traduz a dinâmica molecular de amplificação e é um reflexo da qualidade de desenho dos *primers*, da integridade e pureza das amostras, da qualidade dos reagentes utilizados e das boas práticas de pipetagem (BUSTIN et al., 2009; DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

O cálculo da eficiência de amplificação pode ser obtido através de uma série de diluições de uma amostra de cDNA molde conhecida que são usadas para construir uma curva padrão. O log da concentração das diluições (eixo X) é representado em função do valor do Ct (eixo Y). A inclinação ou “*slope*” da reta obtida por regressão linear é usada para calcular a eficiência de amplificação através da equação:

Eficiência = $10^{-1 / \text{slope}} - 1$. Uma reação com 100% de eficiência corresponde a uma inclinação de -3.32. Uma boa reação deve ter eficiências entre 90% e 110%. Recomenda-se pelo menos 5 pontos de diluição em triplicata técnica para cada um. O fator de diluição idealmente deve ser de 1:10 até 1:5 para cobrir uma ampla faixa de concentrações do alvo. Além da eficiência, a curva padrão também fornece outros parâmetros importantes. O alcance linear dinâmico fornece a faixa de concentrações de entrada que estão ajustadas ao modelo linear, e também evidencia a sensibilidade do ensaio. O coeficiente de correlação (R^2) é uma medida do quão bem ajustados os pontos estão na curva padrão. O (R^2) reflete a linearidade da curva padrão e revela a reprodutibilidade, ou seja, se a variação entre as réplicas é mínima (BUSTIN, 2002; BUSTIN et al., 2009; TAYLOR et al., 2010; RASO et al., 2011; ZHANG et al., 2015) .

Em síntese, todo ensaio de RT-qPCR deve ser otimizado e validado antes de ser usado na obtenção de dados experimentais de expressão gênica. Isso garantirá que os dados terão significância estatística e significado biológico.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMEED, U. K.; EL-MAGLY, U. I.; ISHAK, I. F.; TANTAWY, M. E. A contribution to the specification of Caesalpinioideae (L) based on morphological and molecular criteria. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 120–127, 2013.

AGARWAL, P. K.; AGARWAL, P.; REDDY, M. K.; SOPORY, S. K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 12, p. 1263–1274, 2006.

AL-WHAIBI, M. H. Plant heat-shock proteins: A mini review. **Journal of King Saud University - Science**, v. 23, n. 2, p. 139–150, 2011.

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5350–5354, 1977.

ARYA, M.; SHERGILL, I. S.; WILLIAMSON, M.; GOMMERSALL, L.; ARYA, N.; PATEL, H. R. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209–219, 2005.

AZIZI, P.; RAFII, M. Y.; MAHMOOD, M.; ABDULLAH, S. N. A.; HANAFI, M. M.; LATIF, M. A.; SAHEBI, M.; ASHKANI, S. Evaluation of RNA extraction methods in rice and their application in expression analysis of resistance genes against *Magnaporthe oryzae*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 1, p. 75–84, 2017.

BENKO-ISEPPON, A. M.; SOARES-CAVALCANTI, N. M.; BERLARMINO, L. C.; NETO, J.; AMORIM, L.; FERREIRA NETO, J.; PANDOLFI, V.; AZEVEDO, H.; SILVA, R.; SANTOS, M.; MARCCUS, R.; KIDO, E. Prospecção de Genes de Resistência à Seca e à Salinidade em Plantas Nativas e Cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, p. 1112–1134, 2011.

BRAY, E. A. Molecular Responses to Water Deficit. **Plant Physiology**, v. 103, n. 4, p. 1035–1040, 1993.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23–39, 2002.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CARVALHO, J. T.; TEIXEIRA, J. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; FILHO, D. dos S.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175–178, 1996.

CAVALHEIRO, M.G., FARIAS, D.F., FERNANDES, G.S., NUNES, E.P., CAVALCANTI, F.S., VASCONCE-LOS, I.M., MELO, V.M.M., CARVALHO, A. F. U. Biological and enzymatic activities of aqueous extract of seeds from *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 586–591, 2009.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–9, 1987.

DE SOUSA ARAÚJO, T. A.; ALENCAR, N. L.; DE AMORIM, E. L. C.; DE ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72–80, 2008.

DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene

expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227–230, 2010.

DIE, J. V.; ROMAN, B.; FLORES, F.; ROWLAND, L. J. Design and Sampling Plan Optimization for RT-qPCR Experiments in Plants: A Case Study in Blueberry. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. March, p. 1–9, 2016.

DING, L. W.; SUN, Q. Y.; WANG, Z. Y.; SUN, Y. Bin; XU, Z. F. Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 374, n. 2, p. 426–428, 2008.

FIELDS, S.; JOHNSTON, M. CELL BIOLOGY: Whither Model Organism Research? **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1885–1886, 2005.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 126–139, 2006.

FLEIGE, S.; WALF, V.; HUCH, S.; PRGOMET, C.; SEHM, J.; PFAFFL, M. W. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 19, p. 1601–1613, 2006.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; MARUYAMA, K.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; TRAN, L.-S. P.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. **The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology**, v. 39, n. 6, p. 863–76, 2004.

GRISI, F. A.; ALVES, J. D.; CASTRO, E. M. de; OLIVEIRA, C. de; BIAGIOTTI, G.; MELO, L. A. de. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café “catuaí” e “siriema” submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1730–1736, 2008.

HOLME, I. B.; DIONISIO, G.; BRINCH-PEDERSEN, H.; WENDT, T. A Cisgenic Approach for Improving the Bioavailability of Phosphate in the Barley Grain. **ISB**

News Report, n. March, p 8-11, 2012.

HONG-BO, S.; ZONG-SUO, L.; MING-AN, S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. **Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces**, v. 45, n. 3–4, p. 131–135, 2005.

HUANG, G.-T.; MA, S.-L.; BAI, L.-P.; ZHANG, L.; MA, H.; JIA, P.; LIU, J.; ZHONG, M.; GUO, Z.-F. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 2, p. 969–987, 2012.

JANIAK, A.; KWASNIEWSKI, M.; SOWA, M.; GAJEK, K.; ŻMUDA, K.; KOŚCIELNIAK, J.; SZAREJKO, I. No Time to Waste: Transcriptome Study Reveals that Drought Tolerance in Barley May Be Attributed to Stressed-Like Expression Patterns that Exist before the Occurrence of Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2212-2218, 2017.

JENSEN, M. K.; KJAERGAARD, T.; PETERSEN, K.; SKRIVER, K. NAC genes. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 7, p. 907–910, 2010.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 287–291, 1999.

KITCHEN, R. R.; KUBISTA, M.; TICHOPAD, A. Statistical aspects of quantitative real-time PCR experiment design. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 231–236, 2010a

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science (New York, N.Y.)**, v. 257, n. 5072, p. 967–971, 1992.

LIMA, S. M. A.; ARAÚJO, L. C. C.; SITÔNIO, M. M.; FREITAS, A. C. C.; MOURA, S. L.; CORREIA, M. T. S.; MALTA, D. J. N.; GONÇALVES-SILVA, T. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia, v. 22, n. 1, p. 169–175, 2012.

LING, Z.; ZHIKE, Z.; SHUNQUAN, L.; TINGTING, Z.; XIANGHUI, Y. Evaluation of six methods for extraction of total RNA from Loquat. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, v. 41, n. 1, p. 313–316, 2013.

LIU, S.; WANG, X.; WANG, H.; XIN, H.; YANG, X.; YAN, J.; LI, J.; TRAN, L. S. P.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; QIN, F. Genome-Wide Analysis of ZmDREB Genes and Their Association with Natural Variation in Drought Tolerance at Seedling Stage of *Zea mays* L. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 9, 2013.

LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. Considerações estatísticas na Análise de Dados de Expressão Gênica Gerados pela Técnica de RT-qPCR. p. 32, 2014. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/117059/1/CNPC-2014-Ocorrencia-e-caracterizacao.pdf>>. Acessado em: 12 fev. 2018.

LOOMIS, W. D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods in Enzymology**, v. 31, p. 528–544, 1974.

LOPES-CAITAR, V. S.; DE CARVALHO, M. C.; DARBEN, L. M.; KUWAHARA, M. K.; NEPOMUCENO, A. L.; DIAS, W. P.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Genome-wide analysis of the Hsp20 gene family in soybean: comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.

LOWE, R.; SHIRLEY, N.; BLEACKLEY, M.; DOLAN, S.; SHAFEE, T. Transcriptomics technologies. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 5, p. 1–23, 2017.

MOVAHEDI, S.; VAN DE PEER, Y.; VANDEPOELE, K. Comparative Network Analysis Reveals That Tissue Specificity and Gene Function Are Important Factors Influencing the Mode of Expression Evolution in *Arabidopsis* and Rice. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 1316–1330, 2011.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, v. 48, n. 8, p. 579–582, 1990.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE JR, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p. 119–124, 2002.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559–1582, 2006.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IINUMA, M.; AKAO, Y. Paufferol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 47, p. 8290–8292, 2007.

OH, D. H.; DASSANAYAKE, M.; BOHNERT, H. J.; CHEESEMAN, J. M. Life at the extreme: Lessons from the genome. **Genome Biology**, v. 13, n. 3, p. 1–9, 2012.

PARVATHI, M. S.; NATARAJA, K. N.; YASHODA, B. K.; RAMEGOWDA, H. V.; MAMRUTHA, H. M.; RAMA, N. Expression analysis of stress responsive pathway genes linked to drought hardiness in an adapted crop, finger millet (*Eleusine coracana*). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 193–201, 2013.

PEREIRA, L. D. P.; SILVA, R. O. Da; BRINGEL, P. H. D. S. F.; SILVA, K. E. S. Da; ASSREUY, A. M. S.; PEREIRA, M. G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 642–648, 2012.

RASO, A.; MASCELLI, S.; NOZZA, P.; UGOLOTTI, E.; VANNI, I.; CAPRA, V.; BIASSONI, R. Troubleshooting fine-tuning procedures for qPCR system design. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 25, n. 6, p. 389–394, 2011.

RAYMAEKERS, M.; SMETS, R.; MAES, B.; CARTUYVELS, R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, n. 3, p. 145–151, 2009.

SANTOS, A. R. F.; SOUZA, E. M.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A.; SILVA, A. V. C. Perfis enzimáticos de genótipos de *Caesalpinia ferrea* var. *Leyostachia* e *Cassia grandis*. **Floresta e Ambiente**, v. 17, n. 1, p. 37–43, 2010.

SCHOUTEN, H. J.; KRENS, F. A.; JACOBSEN, E. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. **EMBO Reports**, v. 7, n. 8, p. 750–753, 2006.

SCHRAMM, F.; LARKINDALE, J.; KIEHLMANN, E.; GANGULI, A.; ENGLICH, G.; VIERLING, E.; VON KOSKULL-DÖRING, P. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 53, n. 2, p. 264–274, 2007.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 279–292, 2002.

SHARMA, A. D.; GILL, P. K.; SINGH, P. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. **Analytical Biochemistry**, v. 314, n. 2, p. 319–321, 2003.

SIDDAPPA, N. B.; AVINASH, A.; VENKATRAMANAN, M.; RANGA, U. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. **BioTechniques**, v. 42, n. 2, p. 188–192, 2007.

SILVA, J.; VIANA, J.; ARAÚJO NETO, R.; LIMA, P. Análise da diversidade genética dos acessos de *Caesalpinia ferrea* por meio de marcadores ISSR. **Anais do III**

Simpósio Brasileiro de Recursos Naturais do Semiárido – SBRNS, 2017.

Disponível em:

<<https://drive.google.com/file/d/0B9cQbhL617PHbW9kOFdGanVhOTg/view>>.

Acessado em: 22 fev. 2018.

SILVA, D. V.; BRANCO, S. M. J.; HOLANDA, I. S. A.; ROYAERT, S.; MOTAMAYOR, J. C.; MARELLI, J. P.; CORREA, R. X. Comparative evaluation of total RNA extraction methods in *Theobroma cacao* using shoot apical meristems. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, 2016.

SOUSA, C. C.; GOMES, S. O.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; BRITTO, F. B.; LIMA, P. S. C.; VALENTE, S. E. S. Comparison of methods to isolate DNA from *Caesalpinia ferrea*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 4486–4493, 2014.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, n. 3, p. 503–517, 1975.

STUDER, R. A.; ROBINSON-RECHAVI, M. How confident can we be that orthologs are similar, but paralogs differ? **Trends in Genetics : TIG**, v. 25, n. 5, p. 210–216, 2009.

TAYLOR, S.; WAKEM, M.; DIJKMAN, G.; ALSARRAJ, M.; NGUYEN, M. A practical approach to RT-qPCR — Publishing data that conform to the MIQE. **Methods**, v. 50, p. 1–5, 2010.

USDA, United States Department of Agriculture, Irrigation & water use, 2017.

Disponível em: <[http://www.ers.usda.gov/topics/farm-practices-](http://www.ers.usda.gov/topics/farm-practices-management/irrigation-water-use.aspx#.UiCU2TaT iQC)

[management/irrigation-water-use.aspx#.UiCU2TaT iQC](http://www.ers.usda.gov/topics/farm-practices-management/irrigation-water-use.aspx#.UiCU2TaT iQC)>. Acesso em: 20 ago. 2017.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **BioTechniques**, v. 44, n. 5, p. 619–626, 2008.

VERMEULEN, J.; DE PRETER, K.; LEFEVER, S.; NUYTENS, J.; DE VLOED, F.; DERVEAUX, S.; HELLEMANS, J.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 9, 2011.

WATERS, A. J.; MAKAREVITCH, I.; NOSHAY, J.; BURGHARDT, L. T.; HIRSCH, C. N.; HIRSCH, C. D.; SPRINGER, N. M. Natural variation for gene expression responses to abiotic stress in maize. **The Plant Journal**, v. 89, n. 4, p. 706–717, 2017.

ZHANG, Q.; WANG, J.; DENG, F.; YAN, Z.; XIA, Y.; WANG, Z.; YE, J.; DENG, Y.; ZHANG, Z.; QIAO, M.; LI, R.; DENDULURI, S. K.; WEI, Q.; ZHAO, L.; LU, S.; WANG, X.; TANG, S.; LIU, H.; LUU, H. H.; HAYDON, R. C.; HE, T.-C.; JIANG, L. TqPCR: A Touchdown qPCR Assay with Significantly Improved Detection Sensitivity and Amplification Efficiency of SYBR Green qPCR. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, 2015.

3. AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE RNA DE FOLHA E RAIZ DE *Caesalpinia ferrea* PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR.

Resumo

A obtenção de RNA de boa qualidade é o ponto de partida para diversos processos visam avaliar e quantificar a expressão de genes. A extração de RNA de plantas é particularmente problemática devido à presença de polissacarídeos, metabólitos secundários e muitas classes de compostos fenólicos. O método proposto nesse estudo utiliza um tampão de extração modificado CTAB combinado com a tecnologia das membranas de sílica. Os resultados das comparações dos protocolos revelaram que o protocolo Híbrido-CTAB obteve as maiores médias de concentração de RNA total tanto para folha quanto para raiz utilizando dois métodos para macerar as amostras: 1099 ng/ μ L para folha e 524 ng/ μ L para raiz. O protocolo Híbrido-CTAB foi o único protocolo avaliado que isolou o RNA livre de contaminantes. A análise da integridade evidenciou que as amostras provenientes do protocolo Híbrido-CTAB apresentaram a menor degradação, estando aptas para estudos de expressão gênica por RT-qPCR.

Palavras chaves: cDNA; pau-ferro; transcriptoma

EVALUATION OF *Caesalpinia ferrea* LEAF AND ROOT RNA EXTRACTION PROTOCOLS FOR STUDIES OF GENE EXPRESSION BY RT-qPCR.

Abstract

Obtaining good quality RNA is the starting point for several processes aimed at evaluating and quantifying gene expression. RNA extraction from plants is particularly problematic due to the presence of polysaccharides, secondary metabolites and many classes of phenolic compounds. The CTAB-Silica method proposed in this study uses a modified CTAB extraction buffer combined with silica membrane technology. The results of the protocol comparisons revealed that the CTAB-Silica protocol obtained the highest mean RNA concentration for both leaf and root using two methods to macerate the samples: 1099 ng / μ L for leaf and 524 ng / μ L for root. The purity parameters of the samples showed that the CTAB-Silica protocol was the only protocol evaluated that isolated contaminant-free RNA. The integrity analysis showed that the samples from the CTAB-Silica protocol showed the lowest degradation, being able to study gene expression by RT-qPCR

Key words: cDNA; Transcriptome; pau-ferro

3.1 INTRODUÇÃO

A obtenção de RNA total de alta qualidade e quantidade é um pré-requisito importante para muitos métodos de biologia molecular, tais como construção de bibliotecas de DNA complementar (cDNA) e estudos de expressão gênica por meio da transcrição reversa do RNA codificante (RNAm) combinada à PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). O isolamento de RNA a partir de tecidos vegetais é particularmente problemático devido à presença de polissacarídeos, compostos fenólicos e outros metabólicos secundários que interagem com o RNA, prejudicando sua qualidade. Outra dificuldade é a presença da parede celular que acarreta em dificuldades quanto ao método de ruptura eficiente e homogeneização dos componentes celulares (DING et al., 2008; SILVA et al., 2016).

O protocolo mais utilizado para isolar RNA é baseado no método fenol-tiocianato de guanidina, ou comercialmente disponível como o reagente Trizol®, que originalmente foi desenvolvido para tecidos animais (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987), mas que se mostra inadequado para alguns tecidos e espécies vegetais (FU et al., 2004; WANG; ZHANG; DU, 2005). A tecnologia das membranas de sílica e os kits comerciais representaram um avanço no isolamento de RNA para plantas, porém, seu custo ainda dificulta sua utilização em larga escala em muitos laboratórios

Protocolos híbridos foram descritos na literatura com o objetivo de combinar aspectos positivos de tampões de extrações diversos com o poder de isolamento e purificação das membranas de sílica. Ding et al. (2008) propuseram um protocolo fenol-sílica ao combinar um tampão de extração a base de fenol/clorofórmio com partículas de sílica para extrair RNA de tecidos recalcitrantes de plantas. Sangha et al. (2010) combinaram um tampão modificado de extração CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) com colunas de sílica e melhoraram a extração de RNA de sementes de *Jatropha curcas* L. Porém, diferente dos protocolos descritos na literatura, o protocolo Híbrido-CTAB, proposto no presente trabalho, não utiliza solventes orgânicos para realizar a separação de fases antes da etapa ligação dos ácidos nucleicos com as colunas de sílica, nem utiliza reagentes químicos perigosos como tiocianato de guanidina e fenol para desnaturação e inativação da RNases que degradam o RNA.

O funcionamento do protocolo Híbrido-CTAB se assemelha ao de kits comerciais, onde o pesquisador elabora suas próprias soluções de ligação, lavagem e eluição. Alguns estudos têm relatado a extraordinária estabilidade das membranas

de sílicas por longos períodos de tempo, podendo ser tratadas e reutilizadas por mais de dez vezes sem risco de contaminação (SIDDAPPA et al., 2007).

O objetivo do estudo é propor um protocolo simples e rápido baseado em um tampão de extração CTAB modificado combinado com a tecnologia das membranas de sílica para o isolamento de RNA total de folhas e raiz de *Caesalpinia ferrea*. Além disso, visa comparar protocolos comerciais e descritos na literatura quanto ao rendimento, pureza e integridade exigidos em estudos de expressão gênica por RT-qPCR.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA Meio-Norte, Teresina – PI.

As sementes de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*) usadas para a formação das mudas pertenciam ao banco ativo de germoplasma de forrageiras da EMBRAPA Meio-Norte que após 45 dias de germinação foram usadas como material biológico (Figura 1).



Figura 1 - Folíolos e raízes de pau-ferro.

3.2.1 Protocolos de extração de RNA e métodos de maceração avaliados

Foram testados cinco protocolos para o isolamento de RNA total para cada tipo de tecido (folha e raiz). Para cada protocolo foram avaliados dois procedimentos de maceração e homogeneização: nitrogênio líquido e no equipamento Precellys®.

O equipamento Precellys® macera as amostras através do choque das amostras com esferas de vidro de 3 mm em movimentos multidirecionais. Foi utilizado

uma configuração de dois tempos de 15 segundos (4500 rpm) com intervalo de 20 segundos

Todos os tratamentos foram efetuados em triplicata e utilizaram 100 mg de tecido que foram pesados em uma mesma balança de precisão.

Os protocolos e os procedimentos são descritos abaixo:

TRIzol®

Protocolo executado conforme descrição do fabricante.

Híbrido Trizol descrito por Dorak (2006)

Esse protocolo é uma junção de protocolos baseados em fenol/clorofórmio/guanidina (Trizol®, Tri-reagent®) com isolamento e purificação por colunas de sílica utilizadas em kits comerciais de extração.

Foi adicionado 1 mL de Trizol® ao tecido macerado. Centrifugou-se a mistura a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi pipetado e colocado em um novo tubo, onde foi incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio, misturando vigorosamente a mistura. Incubou-se por 3 minutos na temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase superior aquosa foi pipetada para um novo tubo onde foi adicionado 0,5 mL de isopropanol para cada 600 µL de isolado. A mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 30 segundos para etapa de ligação com a coluna de sílica. A lavagem e eluição foram executadas conforme o protocolo comercial PureLink™RNA Mini Kit.

Concert™ Plant RNA Reagent

Protocolo executado conforme descrição do fabricante.

PureLink™RNA Mini Kit

Protocolo executado conforme descrição do fabricante.

Híbrido-CTAB

Protocolo resultante da junção de um tampão extração CTAB (Brometo de Cetil trimetilamônio) modificado com o método de isolamento e purificação por colunas de sílica.

Foi adicionado 700 µL do tampão de extração CTAB (CTAB 2,5%; NaCl 2,5 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM e 2-mercaptoetanol 0,2%) modificado ao tecido

macerado. A amostra foi homogeneizada e incubada por 5 minutos, em seguida foi misturada a uma proporção específica de isopropanol (0,5 mL de isopropanol para cada 600 µL de amostra homogeneizada). A mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 30 segundos para etapa de ligação com a coluna de sílica. As colunas de sílica foram lavadas com álcool a 75% por centrifugação a 1300 rpm por 30 segundos. Os ácidos nucleicos foram eluídos da coluna de sílica com água ultrapura DEPC por centrifugação a 1300 rpm por 30 segundos. Foram utilizados microtubos, contendo as membranas de sílica, da marca EconoSpin®.

3.2.2 Avaliação do rendimento e pureza das amostras de RNA

O rendimento total de ácidos nucleicos foi medido por espectrofotometria no equipamento Nanodrop™2000. As razões de absorbância 260/280 e 260/230 também foram obtidas. A quantificação específica de RNA total foi medida por fluorimetria utilizando intercalantes específicos no equipamento Qubit™.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial (5x2) para cada tipo de tecido (folha e raiz), com 5 métodos de extração, 2 métodos de maceração e três repetições. A análise de variância e a comparação das médias de quantificação de ácidos nucleicos (Nanodrop™2000) e RNA total (Qubit™) foram feitas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, utilizando-se o software GENES.

3.2.3 Avaliação da integridade das amostras de RNA

A integridade do RNA total foi avaliada em eletroforese em gel de agarose desnaturante (1% agarose, TBE 0,5x, 2,2 M formaldeído, água DEPC). Misturou-se 5 µL de RNA total com 5 µL de 2x tampão de carregamento (95% v/v formamida, 0,025% m/v SDS, 0,025% m/v azul de bromofenol, 0,5 mM EDTA) e pré-coradas com GelRed®10.000x na concentração 10x. Os géis foram submetidos a uma relação 5V/cm por 1 hora e visualizados em fotodocumentador.

Uma comparação da integridade do RNA total extraído entre os diferentes protocolos testados foi executada através de reações RT-qPCR. Dois transcritos foram usados como parâmetro de comparação: β -Actina e Fator de alongamento (eEF1A). As amostras de RNA total em triplicata de cada protocolo de extração foram misturadas para gerar um único RNA total e em seguida foram tratadas com DNase I. Foi utilizado o kit Amplification Grade DNase I da Invitrogen™ nas seguintes concentrações: até 1 µg de RNA, 1 µL 10x DNase I buffer, 1 µL de DNase I 1 U/µL,

água DEPC q.s.p 10 µL. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. A inativação da DNase I ocorreu através da adição de 1 µL de 25 mM de EDTA e aquecimento a 65°C por 10 minutos.

As amostras de RNA tratadas com DNase I foram reversamente transcritas em uma biblioteca de cDNA para cada protocolo de extração. Para cada tipo de tecido, foi feita uma uniformização da quantidade de RNA usado para a síntese de cDNA: 500 ng de RNA para folha e 100 ng para raiz. Foi utilizado o kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ na seguinte configuração: 10 µL de 2x RT Buffer, 1 µL 20x RT enzyme mix, 100-500 ng RNA e água DEPC q.s.p 20 µL. Cada reação foi incubada a 37°C por 60 minutos e interrompida por aquecimento a 95°C por 5 minutos.

As reações de RT-qPCR para cada gene em cada protocolo foram realizadas em triplicata técnica. Também foram incluídos os controles NTC e –RT para cada gene. Foi utilizado o sistema químico PowerUp™SYBR™Green Master Mix da Applied Biosystems para as reações de RT-qPCR: 2 µL de cDNA, 5 µL PowerUp™SYBR™Green Master Mix (2x), 250 nM de *primers* (*forward* e *reverse*) e água DEPC q.s.p 10 µL. As amplificações ocorreram no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR da ThermoFisher e utilizou-se o programa de amplificação: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de (95°C por 15 segundos para desnaturação, temperatura de anelamento por 15 segundos, 72°C por 1 minuto para extensão), em seguida foi executado uma etapa de dissociação pré-programada no equipamento para obtenção da curva de *melting*. Os valores de Ct obtidos no equipamento de PCR em tempo real, a partir de mesmo nível de fluorescência (*threshold*), serviram como parâmetro para quantificar e comparar o número de transcritos íntegros entre os protocolos testados.

As especificidades das reações de RT-qPCR foram avaliadas através da curva de *melting*. As reações também foram analisadas em eletroforese de gel de agarose (1,5% agarose, 0,5 x TBE) para verificar a presença de fragmentos inespecíficos e confirmar o tamanho dos *amplicons*. Foram misturados 5 µL do produto da reação com 3 µL de tampão de carregamento (60% v/v glicerol, 60 mM EDTA, 0,48% m/v SDS, 0,03% m/v azul de bromofenol) e pré-coradas com GelRed®10.000x na concentração 10x. Os géis foram submetidos a uma relação 5 V/cm por 90 minutos e visualizados em fotodocumentador.

3.3 RESULTADOS

Os resultados das análises de variância em esquema fatorial, para folha e raiz, revelaram existir diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os protocolos testados, tanto para concentração de ácidos nucleicos quanto para concentração específica de RNA total. Para folha, os dados revelaram não existir diferenças significativas entre os dois métodos de maceração. Já para raiz, macerar as amostras com nitrogênio líquido ou no equipamento precellys®, foi significativamente diferente ($p < 0,01$). Ambas as análises de variância, folha e raiz, evidenciaram existir interação significativa ($p < 0,01$) entre os efeitos dos fatores: métodos de maceração e protocolos de extração. Procedeu-se ao desdobramento da interação para estudar o comportamento dos protocolos nos dois métodos de maceração testados (Tabela 1).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância em esquema fatorial (métodos de maceração x protocolos de extração) para folha e raiz.

Fonte de Variação	G.L.	Folha		Raiz	
		Q.M.		Q.M.	
		Nanodrop™	Qubit™	Nanodrop™	Qubit™
Método de maceração (MM)	1	7426,13 ns	204,89 ns	253809,61**	2671,52**
Protocolo de extração (PE)	4	1029778,53**	1117219,11**	208177,45**	283492,23**
PE x MM	4	52701,18**	11141,46**	41002,50**	1556,02**
Resíduo	20	2095,7	463,96	1986,96	59,49

* G.L.: Grau de liberdade; Q.M.: Quadrado médio; ns: Não significativo; ** Significativo pelo teste F, ao nível de 1% de probabilidade.

As comparações das médias dos protocolos de extração para cada tipo de maceração, através do teste de Tukey a 1% de probabilidade, evidenciaram que para folha, o protocolo Híbrido-CTAB obteve as maiores médias de concentração de RNA total para os dois métodos de maceração (Prellyls®=1149,63 ng/μL e Nitrogênio líquido=1048,53 ng/μL), um valor mais de 400% superior que protocolo Trizol® (Prellyls®=195,40 ng/μL e Nitrogênio líquido=257,27 ng/μL) que foi o segundo mais eficiente. O protocolo Híbrido-CTAB também obteve as menores estimativas de contaminação com DNA. Quando macerado com o Nitrogênio, o protocolo Híbrido-CTAB obteve três vezes menos contaminação com DNA que o protocolo PureLink™RNA Mini Kit que foi segundo colocado. Com relação aos parâmetros de pureza das extrações, o protocolo Híbrido-CTAB obteve, para folha, médias das razões de absorvância 260/280 e 260/230 iguais 2,2 e 2,3, respectivamente, quando

maceradas com Precellys®, e 2,2 e 2,1 quando maceradas com nitrogênio líquido (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados médios para os diferentes métodos de maceração e protocolos de extração de RNA total de folha de pau-ferro Concentração⁽¹⁾ de ácidos nucleicos (Nanodrop™), concentração⁽¹⁾ específica de RNA total (Qubit™), razões de absorvância 260/280 e 260/230, porcentagem de contaminação com DNA genômico e os respectivos desvios padrão.

Maceração	Método	Nanodrop™(ng/μL)	Qubit™(ng/μL)	260/280	260/230	%DNA*
	Trizol	313,9 ±13,2c	195,4 ±7,7b	1,7 ±0,08	0,5 ±0,10	37,6
	Híbrido	286,9 ±59,4c	67,5 ±7,0c	1,1 ±0,06	0,5 ±0,02	76,1
Precellys	Concert	569,9 ±42,3b	90,8 ±10,6c	1,4 ±0,08	0,4 ±0,06	84,1
	Kit	205,6 ±42,8c	171,7 ±19,2b	1,8 ±0,42	1,5 ±0,05	15,4
	Híbrido-CTAB	1253,9 ±42,8a	1149,6 ±35,1a	2,2 ±0,16	2,3 ±0,09	8,3
	Trizol	574,0 ±58,8c	257,3 ±7,3b	1,5 ±0,22	0,6 ±0,07	54,9
	Híbrido	211,0 ±5,4d	136,4 ±5,5c	1,7 ±0,15	0,8 ±0,09	35,4
Nitrogênio líquido	Concert	779,5 ±61,5b	131,8 ±3,3c	1,4 ±0,02	0,4 ±0,03	83,0
	Kit	96,1 ±9,7d	74,9 ±5,5c	2,0 ±0,04	1,1 ±0,02	21,8
	Híbrido-CTAB	1126,9 ±66,7a	1048,5 ±51,9a	2,2 ±0,14	2,1 ±0,16	6,9

*Porcentagem estimada pela diferença de concentração entre o equipamento Nanodrop™ e o equipamento Qubit™. ⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra minúscula, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Para raiz, o protocolo Híbrido-CTAB também apresentou as menores estimativas de contaminação com DNA para os dois métodos de maceração e as maiores médias de concentração de RNA total para ambos os métodos de maceração (Precellys®=563 ng/μL e Nitrogênio líquido=486,90 ng/μL), um resultado mais de 400% superior que o protocolo PureLink™RNA Mini Kit (Precellys®=84,47 ng/μL e Nitrogênio líquido=83,40 ng/μL) que foi o segundo mais eficiente, e mais de 700% superior que o protocolo Concert™ (Precellys®=61,93 ng/μL). Para raiz, o protocolo Híbrido-CTAB obteve médias das razões de absorvância 260/280 e 260/230 iguais a 2,1 e 2,2, respectivamente, para os dois métodos de maceração. Todos os outros protocolos obtiveram razões 260/280 e 260/230 menores que 1,8, com exceção do protocolo PureLink™RNA Mini Kit que obteve razões 260/280 que variaram de 1,8 a 2 (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados médios para os diferentes métodos de maceração e protocolos de extração de RNA total de raiz de pau-ferro. Concentração ⁽¹⁾ de ácidos nucleicos (Nanodrop™), concentração ⁽¹⁾ específica de RNA total (Qubit™), razões de absorvância 260/280 e 260/230, porcentagem de contaminação com DNA genômico e os respectivos desvios padrão.

Maceração	Método	Nanodrop™(ng/μL)	Qubit™(ng/μL)	260/280	260/230	%DNA*
Precellys	Trizol	57,7 ±16,8d	8,1 ±3,2c	1,2 ±0,10	0,6 ±0,09	84,3
	Híbrido	388,8 ±49,1bc	28,1 ±3,7c	1,1 ±0,01	0,5 ±0,09	92,8
	Concert	290,8 ±80,3c	61,9 ±4,1b	1,3 ±0,07	0,6 ±0,08	77,7
	Kit	487,5 ±76,4ab	84,5 ±10,0b	1,8 ±0,12	1,0 ±0,07	82,2
Nitrogênio líquido	Híbrido-CTAB	617,4 ±15,0a	563,0 ±12,4a	2,1 ±0,08	2,2 ±0,23	8,8
	Trizol	74,0 ±43,1b	7,3 ±2,7d	1,2 ±0,01	0,5 ±0,05	88,7
	Híbrido	79,5 ±33,0b	21,3 ±5,6d	1,3 ±0,02	0,4 ±0,14	72,2
	Concert	141,0 ±32,2b	52,4 ±5,3c	1,4 ±0,11	0,2 ±0,02	61,8
	Kit	96,7 ±12,5b	83,4 ±6,9b	1,9 ±0,08	0,5 ±0,27	12,9
	Híbrido-CTAB	531,3 ±23,0a	486,9 ±13,7a	2,1 ±0,09	2,2 ±0,15	8,3

*Porcentagem estimada pela diferença de concentração entre o equipamento Nanodrop™ e o equipamento Qubit™. ⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra minúscula, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

A superioridade do protocolo Híbrido-CTAB ficou mais evidente quando se analisou as médias que englobaram os dois métodos de maceração. Para folha, o protocolo Híbrido-CTAB obteve média de concentração de RNA igual a 1099 ng/μL, quase cinco vezes mais que protocolo Trizol® que foi o segundo mais eficiente, com médias das razões de absorvância 260/280 e 260/230 iguais a 2,18 e 2,21, respectivamente. O kit comercial PureLink RNA Mini Kit, que foi o segundo melhor, obteve médias das razões 260/280 e 260/230 iguais a 1,93 e 1,29, respectivamente (Figura 2).

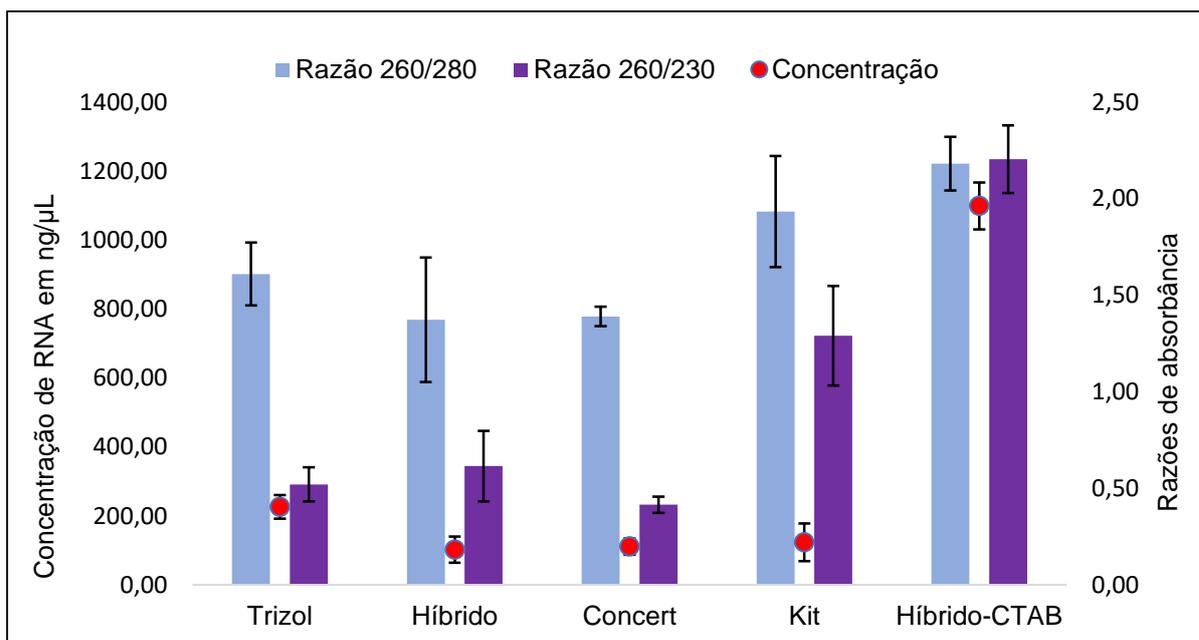


Figura 2 - Média geral, considerando os dois métodos de maceração, da concentração de RNA de folha e razões de absorvância 260/280 e 260/230.

Para raiz, o protocolo Híbrido-CTAB obteve média de 525 ng/μL de RNA, mais de seis vezes que o protocolo PureLink RNA Mini Kit, que foi o segundo lugar, e médias das razões de absorvância 260/280 e 260/230, iguais a 2,14 e 2,19, respectivamente. O protocolo PureLink RNA Mini Kit, que foi o segundo melhor, obteve médias das razões 260/280 e 260/230 iguais a 1,72 e 0,75, respectivamente (Figura 3).

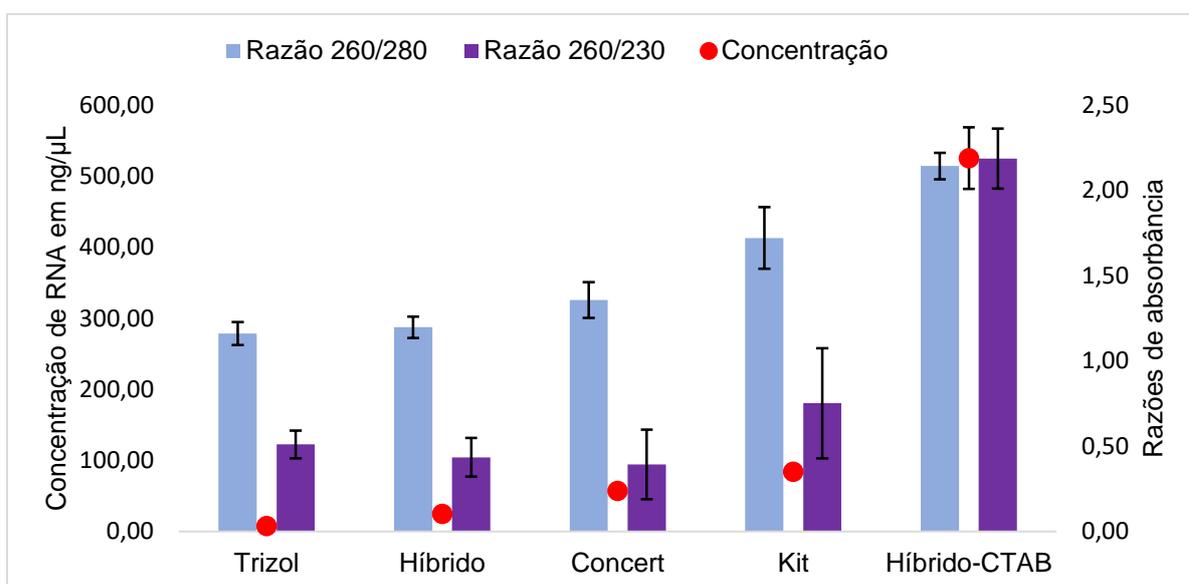


Figura 3 - Média geral, considerando os dois métodos de maceração, da concentração de RNA de raiz e razões de absorvância 260/280 e 260/230.

Os resultados revelaram que os rendimentos de RNA total foram semelhantes entre os dois métodos de maceração. Para folha, não foram encontradas diferenças significativas entre os métodos de maceração (Figura 4).

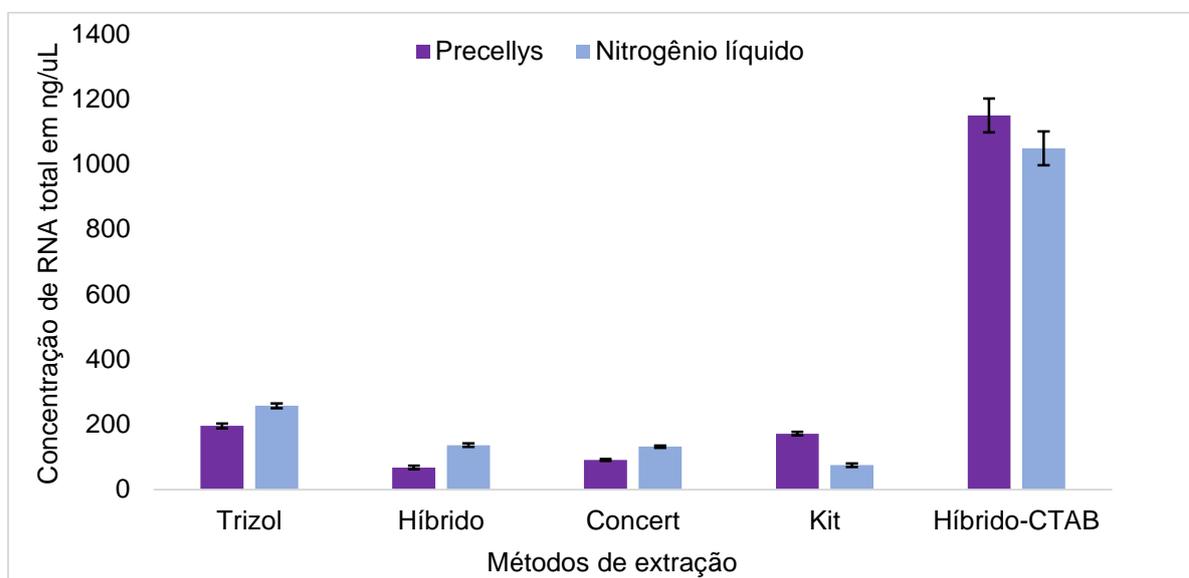


Figura 4 - Comparações das concentrações de RNA total obtidas entre as diferentes combinações (métodos de maceração x protocolos de extração) para folha de pau-ferro.

Para raiz, onde houve diferença significativa ($p < 0.01$) entre os métodos de maceração, o resultado foi concentrado pelo protocolo Híbrido-CTAB no qual a maceração no equipamento Precellys® foi mais eficiente (Figura 5).

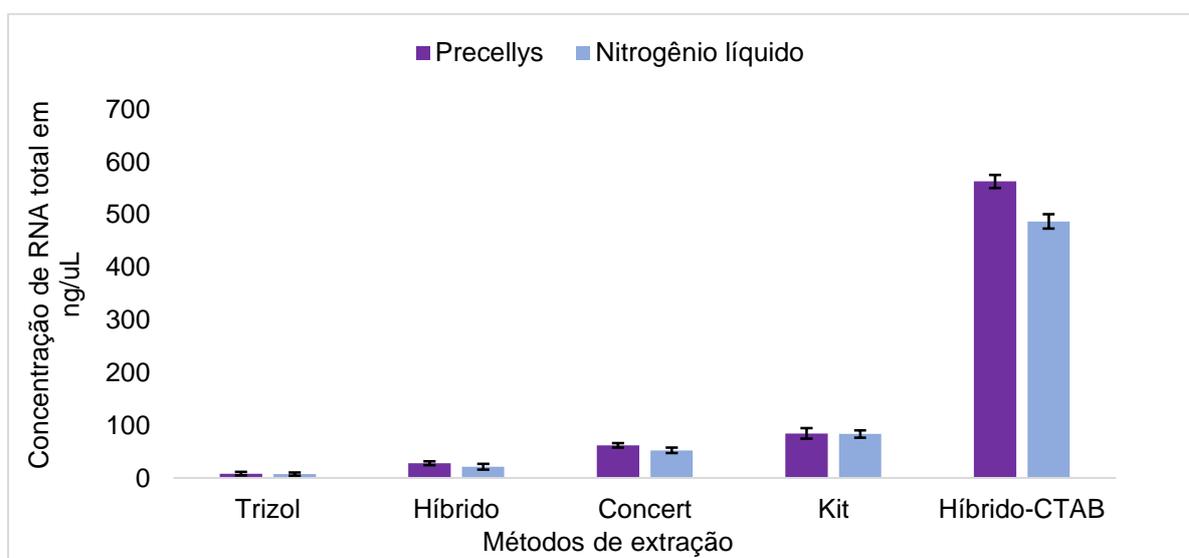


Figura 5 - Comparações das concentrações de RNA total obtidas entre as diferentes combinações (métodos de maceração x protocolos de extração) para raiz de pau-ferro.

As análises de integridade das amostras de RNA em géis de eletroforese desnaturante revelaram, com exceção do protocolo Híbrido-CTAB, a presença de bandas de RNA ribossomal (rRNA). Nas amostras de folha, foi possível visualizar degradação do RNA entre as bandas de rRNA. As amostras de folha maceradas no equipamento Precellys® apresentaram bandas de rRNA mais nítidas (Figura 6).

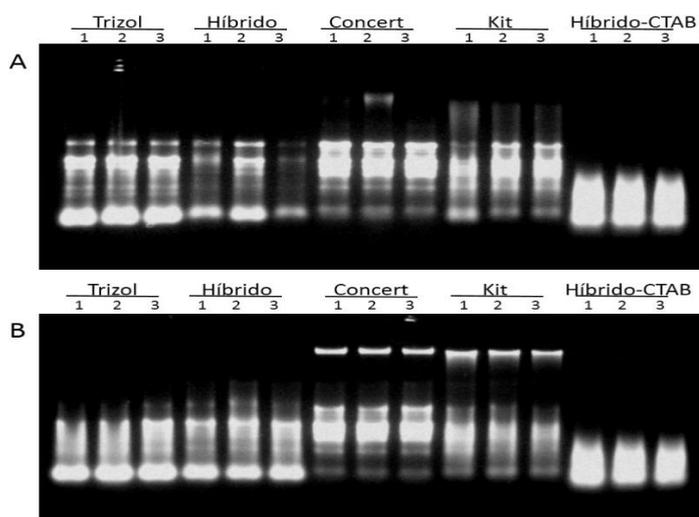


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose a 1% desnaturante de amostras de RNA de folha de pau-ferro. (A) macerados com Precellys®. (B) macerados com nitrogênio líquido.

As amostras de raiz apresentaram um maior nível de degradação quando comparadas às amostras de folha. (Figura 7).

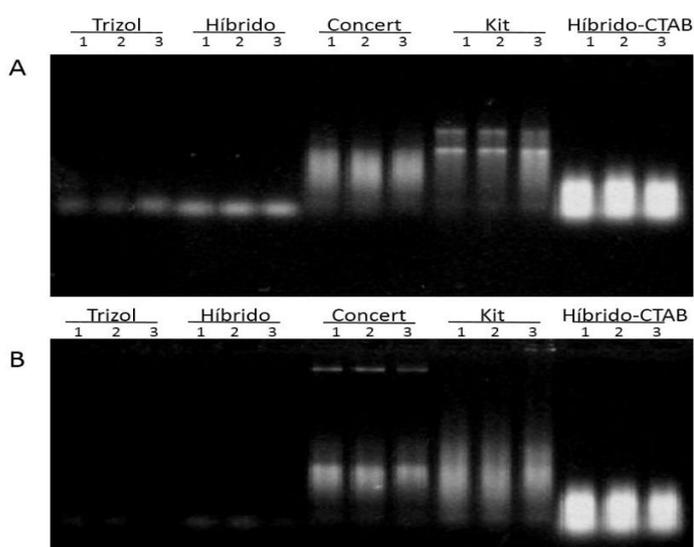


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 1% desnaturante de amostras de RNA de raiz de pau-ferro. (A) macerados com Precellys®. (B) macerados com nitrogênio líquido.

As análises de integridade das amostras RNA através das reações RT-qPCR mostraram que todos os protocolos de extração produziram amplificações para os dois transcritos avaliados a partir de cDNA de folha. O deslocamento para direita das curvas de amplificação mostrou que a detecção dos transcritos β -Actina e eEF1A aconteceu em ciclos cada vez superiores como consequência de um maior nível de degradação das amostras de RNA. A sequência de degradação das amostras de RNA, proporcionada por cada um dos protocolos, foi a mesma para os dois transcritos avaliados (Figura 8).

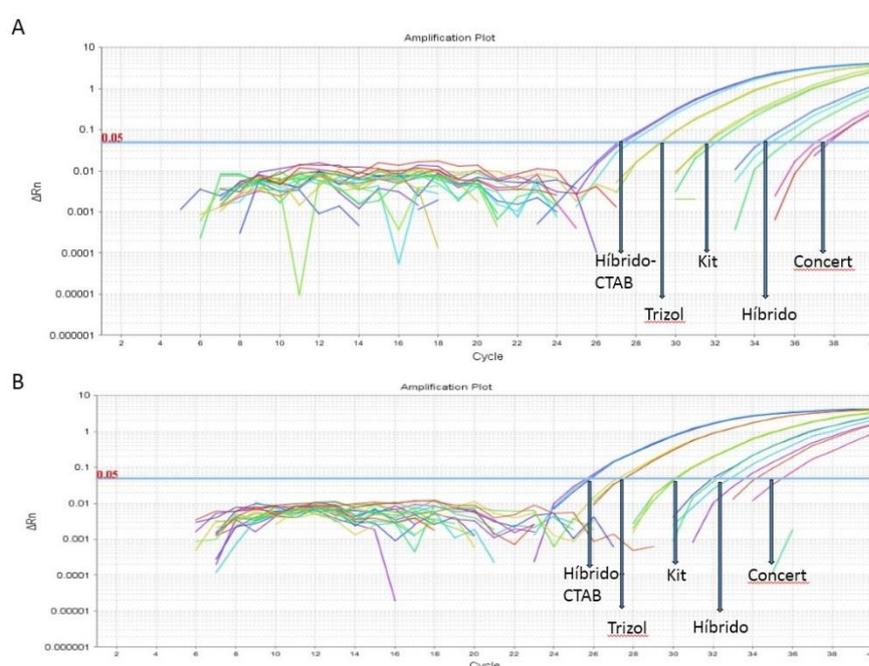


Figura 8 - Reações de RT-qPCR utilizadas para avaliar a integridade do RNA total de folha de pau-ferro. (A) transcrito β -Actina. (B) transcrito eEF1A.

Para raiz, apenas os protocolos Híbrido-CTAB e PureLink™RNA Mini Kit produziram curva de amplificação. O deslocamento para direita das curvas de amplificação mostra que a detecção dos transcritos β -Actina e eEF1A aconteceu em ciclos cada vez superiores como consequência de um maior nível de degradação das amostras de RNA (Figura 9).

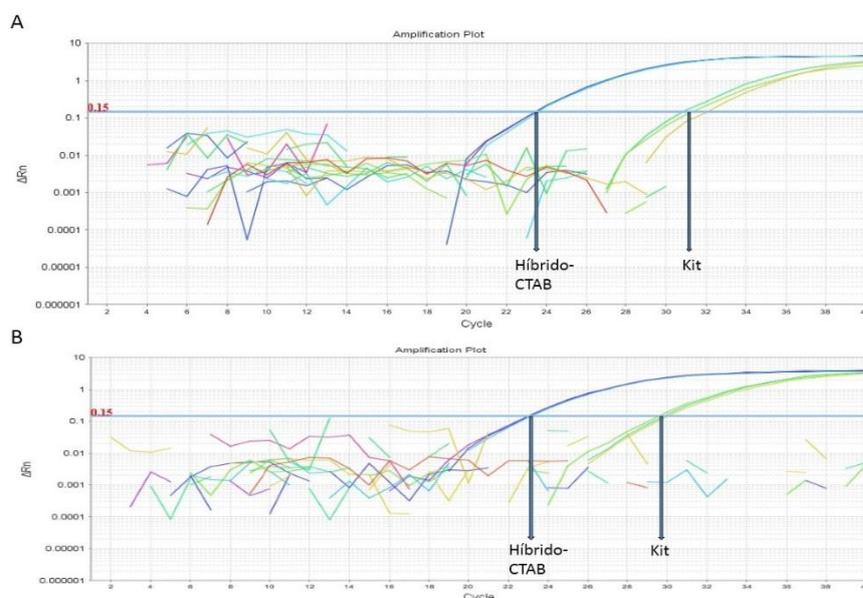


Figura 9 - Reações RT-qPCR utilizadas para avaliar a integridade do RNA total de raiz de pau-ferro. (A) transcrito β -Actina. (B) transcrito eEF1A.

As detecções cada vez mais tardias das amplificações revelam Cts maiores, e conseqüentemente, um menor número de transcritos aptos a serem amplificados. O protocolo Híbrido-CTAB obteve os menores valores de Ct nos ensaios de RT-qPCR para folha (Figura 10).

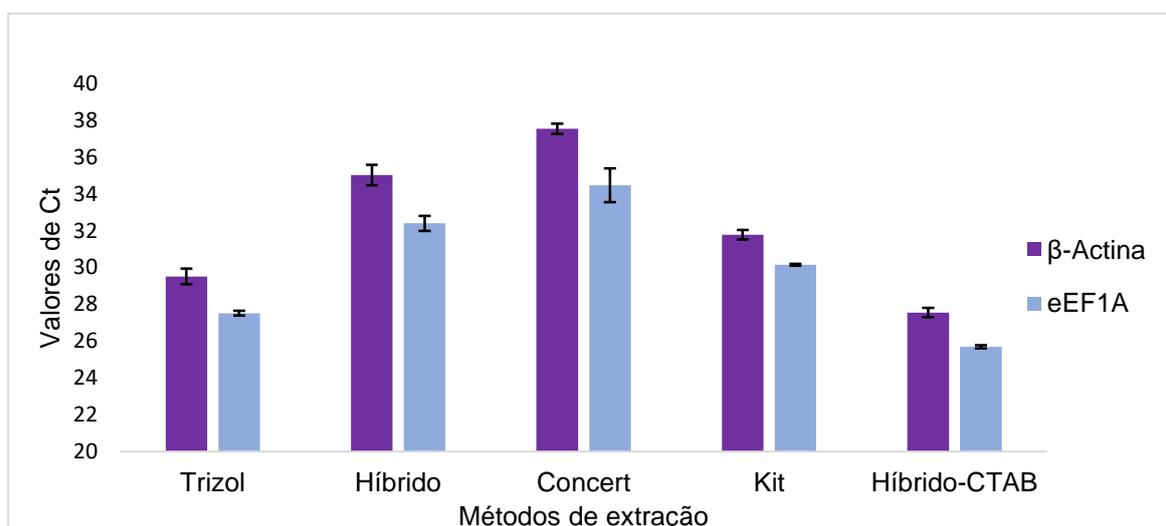


Figura 10 - Valores médios de Ct obtidos das reações de RT-qPCR utilizado cDNA dos diferentes protocolos de extração de folha. Quanto menor o Ct, maior o número de transcritos aptos à amplificação nas reações e menor o nível de degradação.

Para raiz, o protocolo Híbrido-CTAB também obteve as menores médias dos valores de Ct, evidenciando um menor nível de degradação das amostras de RNA provenientes desse protocolo (Figura 11).

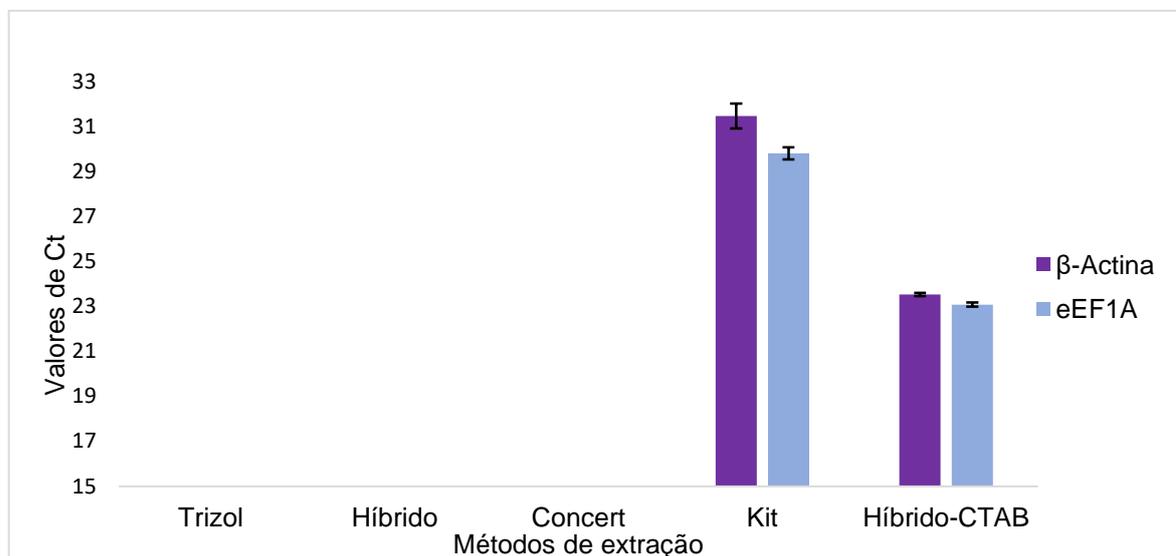


Figura 11 - Valores médios de Ct obtidos das reações de RT-qPCR utilizando cDNA nos diferentes protocolos de extração de raiz. Quanto menor o Ct, maior o número de transcritos aptos à amplificação e menor o nível de degradação.

As curvas de *melting* para os dois transcritos utilizados na avaliação da integridade apresentaram um único pico, indicando a não existência de amplificações inespecíficas e estruturas secundárias nos *primers* utilizados. Os controles NTC e – RT não produziram sinal de amplificação em nenhuma reação de RT-qPCR, mostrando a não ocorrência de contaminações (exógenas e com DNA genômico) (Figura 12).

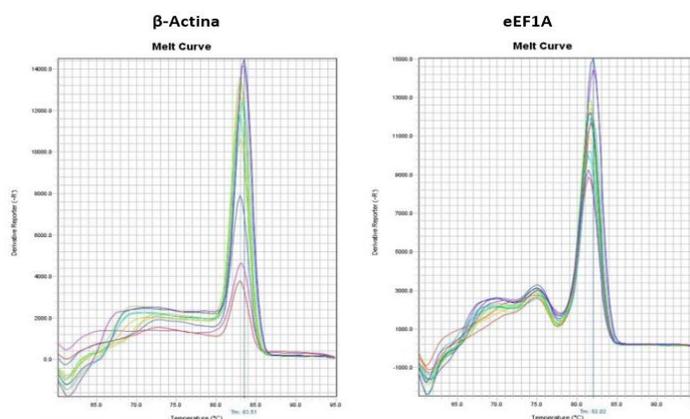


Figura 12 - Curvas de *melting* dos transcritos β -Actina e eEF1A utilizados para avaliar a integridade do RNA extraído de pau-ferro para todos os protocolos avaliados.

A especificidade e o tamanho dos amplicons gerados também foram avaliados e confirmados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 13).

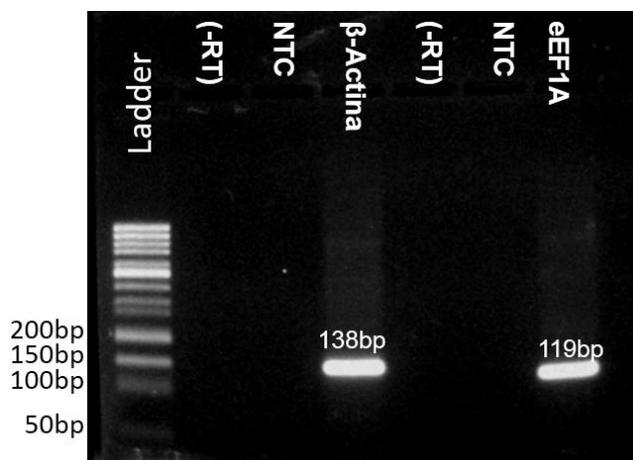


Figura 13 - Gel de agarose a 1,5% dos amplicons dos transcritos β -Actina e eEF1A utilizados para avaliar a integridade do RNA extraído de pau-ferro.

3.4 DISCUSSÃO

Mesmo utilizando folíolos e a coifa da raiz de mudas de pau-ferro com 45 dias de idade, as macerações foram difíceis e sempre apresentavam muito material fibroso. As raízes, mesmo jovens, já apresentavam resistência à maceração com nitrogênio líquido, almofariz e pistilo. Cavalheiro et al. (2009) e Lima et al. (2012) destacam que uma importante característica do pau-ferro é a resistência do tronco e galhos dessa espécie. Essas características poderiam explicar, mesmo em plantas jovens, a dificuldade na maceração das amostras quando comparada a outras espécies. Dessa forma, comparou-se dois métodos de maceração.

A maceração e ruptura da parede celular de plantas por meio do uso de nitrogênio líquido é o método mais utilizado para extração de RNA (FARRELL, 2017). No entanto, a quantidade de amostras pode acarretar em dificuldades quanto ao custo, tempo de processamento e a heterogeneidade dos tratamentos em virtude do método ser manual. Bustin et al. (2009) destacam que um dos principais aspectos para a precisão e significado biológico dos estudos de expressão gênica reside no menor tempo de manipulação e na uniformidade experimental das amostras. Procedimentos que automatizem o processamento das amostras, como no equipamento Precellys®, podem reduzir os custos, o tempo e possíveis fontes de

variação que podem dificultar a quantificação de pequenas variações na expressão de um gene.

O protocolo Híbrido-CTAB foi o mais eficiente em isolar o RNA, tanto para folha quanto para raiz, ao mesmo tempo em que obteve os melhores parâmetros de pureza das amostras. Amostras puras de RNA possuem razões de absorbância 260/280 próximas de 2 e razões 260/230 maiores que 2 e menores que 2,4. Um baixo valor da razão 260/280 indica que a amostra está contaminada com proteínas. Valores baixos de razões 260/230 podem indicar contaminação por sais de guanidina, β -mercaptoetanol, polissacarídeos e polifenóis (GASIC; HERNANDEZ; KORBAN, 2004; FARRELL, 2017). Todas as amostras de RNA de folha e raiz extraídas com o protocolo Híbrido-CTAB obtiveram razões de absorbância 260/280 e 260/230 superiores a 2, indicando que o protocolo foi o mais eficiente no isolamento do RNA e na retirada das impurezas. O protocolo comercial PureLink RNA Mini Kit que utiliza a tecnologia das membranas de sílica foi o segundo protocolo mais eficiente na retirada das impurezas das amostras, porém, todas as amostras apresentaram baixos valores para a razão de absorbância 260/230, indicando que as amostras tinham sais e/ou polissacarídeos como contaminantes.

Todos os outros protocolos apresentaram muita contaminação por proteínas, β -mercaptoetanol, polissacarídeos e polifenóis. A quantidade e pureza das amostras de RNA são críticas para técnicas sensíveis como a RT-qPCR que possuem duas reações enzimáticas. A baixa qualidade da amostra pode prejudicar ou mesmo inviabilizar a síntese da primeira cadeia de cDNA pela transcriptase reversa e a etapa de amplificação na RT-qPCR, diminuindo a precisão dos dados (SANGHA et al., 2010).

Quando um espectrofotômetro quantifica ácidos nucleicos, existe uma sobreposição dos espectros de absorção das moléculas de DNA e RNA, impossibilitando uma diferenciação na quantificação. Outras substâncias que também absorvem no comprimento de onda 260nm, que é usado para quantificar o DNA e RNA, também podem superestimar as quantificações de RNA (FARRELL, 2017). Dessa forma, a diferença entre a quantificação por espectrofotometria e uma quantificação específica do RNA, pode ser uma boa estimativa do grau de contaminação com DNA. A contaminação de amostras de RNA com DNA genômico é um importante controle de qualidade, na medida em que o DNA pode coamplificar com o cDNA, superestimando os resultados e tornando imprecisos os dados de

expressão gênica por RT-qPCR (BUSTIN, 2002; BUSTIN et al., 2009). O protocolo Híbrido-CTAB conseguiu isolar o RNA com as menores estimativas de contaminação com DNA.

O protocolo Híbrido-CTAB utiliza um tampão de extração modificado CTAB combinado com a tecnologia de purificação em coluna de sílica. Em testes anteriores, percebeu-se que o aumento da concentração de NaCl e CTAB no tampão CTAB e posterior mistura do lisado (tecido macerado + tampão CTAB) com uma proporção definida de isopropanol, promoviam a ligação dos ácidos nucleicos à membrana de sílica. Uma hipótese é que o tampão CTAB modificado com um aumento na concentração de cátions (CTAB e Sódio) e ânions Cloreto, necessários para promover a ponte de ligação entre as membranas de sílica e o esqueleto negativo das moléculas de ácidos nucleicos, tenham uma maior facilidade de interação com o tipo de estrutura formada pelas moléculas de RNA.

O rendimento e o nível de pureza que um protocolo proporciona, ao isolar ácidos nucleicos, dependem do sistema químico que eles adotam e da dinâmica de interação molecular com os componentes celulares. O isolamento eficiente de RNA começa com a lise celular mediada por tampões que basicamente se enquadram em duas categorias, que dependem do grau de ruptura celular e da inativação concomitante das RNases: (1) aqueles que contêm agentes caotrópicos fortes, que desnaturam e solubilizam proteínas; (2) aqueles que solubilizam suavemente as membranas e que mantêm a integridade nuclear e de outras organelas, tais como os tampões não-iônicos e os hipotônicos (FARRELL, 2017; SCHMITTGEN et al., 2009).

O protocolo Trizol® possui o sistema químico tiocianato de guanidina/fenol/clorofórmio descrito por Chomczynski e Sacchi. (1987), em que o tiocianato de guanidina é um potente agente caotrópico que inativa as RNases. O protocolo Concert™ Plant RNA Reagent possui os reagentes (β -mercaptoetanol/azida de sódio) que ajudam a inibir a ação das RNases em uma solução monofásica otimizada para tecidos de plantas ricas em polifenóis (PureLink Plant RNA reagent..., 2012). O protocolo PureLink™ RNA Mini Kit utiliza a tecnologia de purificação em fase sólida de matriz de sílica (coluna de sílica). O princípio se baseia na alta afinidade do esqueleto dos ácidos nucleicos, carregados negativamente, com as moléculas de sílica, carregadas positivamente. Um ambiente altamente salino e caotrópico rompem as pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e a sílica e promovem a ligação do DNA/RNA à matriz de sílica. Posteriormente

os ácidos nucleicos são eluídos da sílica sob condições de sal muito baixas (ESSER; MARX; LISOWSKY, 2006; FARRELL, 2017). O protocolo Híbrido descrito por Dorak (2006) utiliza um tampão de extração baseado na química (tiocianato de guanidina/fenol/clorofórmio) combinado com a tecnologia de purificação em coluna de sílica. Todos esses protocolos têm em comum a utilização de reagentes que visam proteger o RNA da ação das RNases. Além de serem prejudiciais à saúde, os baixos valores da razão 260/230 indicaram que os sais de guanidina, β -mercaptoetanol e outros contaminantes coprecipitaram com o RNA, prejudicando sua qualidade.

Com exceção do protocolo PureLink™RNA Mini Kit e do Híbrido-CTAB, todos os protocolos apresentaram baixos valores para razão 260/280, indicando uma contaminação por proteínas. Schmittgen et al. (2009) destacam que a contaminação por proteínas é um problema comum associado a extrações líquido-líquido que utilizam solventes orgânicos em separações incompletas de fases.

O protocolo Híbrido-CTAB apresentou importantes vantagens quanto comparado aos outros protocolos avaliados: rapidez, facilidade de uso e a não utilização de reagentes perigosos como solventes orgânicos, fenol, sais de guanidina e β -mercaptoetanol que acarretam em preocupações quanto a manipulação e a destinação de resíduos. Uma possível deficiência do protocolo Híbrido-CTAB é não possuir nenhuma substância que promova a inativação das RNases como fenol, sais de guanidina e β -mercaptoetanol. Esse possível problema pode ser amenizado com a transcrição reversa no RNA em uma molécula mais estável de cDNA. Independentemente do protocolo de extração adotado, o RNA deve ser armazenado, preferencialmente, na forma de uma biblioteca de cDNAs (BUSTIN et al., 2009; DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Em todas as amostras de folha de pau-ferro, com exceção do protocolo Híbrido-CTAB, foi possível visualizar bandas formadas de RNA ribossomais (rRNA) nos géis eletroforéticos. Para eucariotos, a avaliação da integridade do RNA foca na relação das bandas rRNA 28s/18s que deve ser próxima ou superior a 2. Outras subunidades rRNA menores como 5s e 5,8s, além da desnaturação incompleta e formação de estruturas secundárias, podem revelar múltiplas bandas além das 28s e 18s (FARRELL, 2017). Todas as amostras mostraram degradação entre as bandas de rRNA. As amostras de raiz apresentaram uma acentuada degradação. Nos resultados da eletroforese de RNA de folha, é possível perceber uma saturação do brilho das imagens, que pode ter prejudicado a definição e diferenciação das bandas. A

aplicação das amostras de RNA misturadas com o intercalante fluorescente GelRed® em uma coloração pré-corrída pode ser uma possível explicação.

Comparar as subunidades de rRNA é o método mais fácil e popular para inferir sobre a integridade das amostras, já que o rRNA compõem mais de 80% da massa do RNA total e o RNA mensageiro (mRNA) possui apenas de 2% a 3% (FARRELL, 2017). Porém, o mRNA é o alvo principal da RT-qPCR, por tanto, seria mais informativo e preciso avaliar a qualidade do mRNA diretamente. Além disso, avaliar a integridade do RNA através dos dois passos enzimáticos da RT-qPCR, aumenta o controle de qualidade e torna os resultados mais relevantes (VERMEULEN et al., 2011).

Amostras de RNA isoladas de tecido de raiz e folhas de pau-ferro foram analisadas em experimentos de RT-qPCR para determinar o efeito dos protocolos de extração na quantificação de transcritos específicos. Houve amplificação por RT-qPCR em todas as amostras do protocolo Híbrido-CTAB, para os dois transcritos avaliados, tanto para folha quanto para raiz. Isso por si só já configura um controle de qualidade, na medida em que o nível de degradação, contaminantes e inibidores em uma amostra de RNA, muitas vezes, podem impedir a amplificação de reações RT-qPCR (FLEIGE; PFAFFL, 2006). Os dados mostraram que as curvas de amplificação das reações de RT-qPCR dos protocolos são deslocadas para direita à medida que o RNA se torna mais degradado, ou seja, o produto amplificado foi observado em ciclos sucessivamente posteriores.

Em experimentos de RT-qPCR, o parâmetro Ct é o número de ciclos pelo qual a fluorescência do cDNA amplificado passa por um nível determinado e dentro da fase exponencial. O Ct é o parâmetro utilizado para comparar a diferença na quantidade inicial de um transcrito específico. A diferença de um ciclo revela uma diferença de duas vezes no nível do transcrito inicial (considerando 100% de eficiência de amplificação, 2^n , n=Número de ciclos). Para folha e raiz, o protocolo Híbrido-CTAB obteve as menores médias de Ct para os dois transcritos avaliados. A diferença de Ct (Δ Ct) para o transcrito β -Actina entre os protocolos Híbrido-CTAB e Trizol® foi igual a 1,96 para folha, revelando que o protocolo Híbrido-CTAB tinha 3,89 vezes mais transcritos aptos no início da amplificação que o Protocolo Trizol® ($2^{1,96} = 3,89$ vezes). Já em relação ao protocolo Concert®, o Δ Ct=9,98 revelou que o protocolo Híbrido-CTAB possuía mais de 1000 vezes o transcrito β -Actina integro e apto no início da reação ($2^{9,98} = 1009,9$ vezes). Além de revelar que o RNA isolado pelo protocolo

Híbrido-CTAB foi o mais íntegro, a proporção e a ordem de degradação crescente entre os protocolos foram confirmadas tanto pelo transcrito β -Actina como pelo transcrito eEF1A.

Os maiores valores de Ct para amostras de RNA de menor qualidade também revelaram ter impacto no desvio padrão das réplicas e na diminuição da reprodutibilidade dos experimentos de RT-qPCR. Fleige e Pfaffl (2006) destacam que com o aumento da qualidade do RNA, e conseqüentemente baixos valores de Ct, a variabilidade dos resultados das quantificações de expressão gênica por RT-qPCR diminuem, isso é particularmente importante para precisão das quantificações, principalmente quando o gene estudado produz poucos transcritos.

3.5 CONCLUSÕES

O método Híbrido-CTAB demonstrou ser uma técnica simples e rápida para isolamento RNA total de folha e raiz de pau-ferro, obtendo rendimento, parâmetros de pureza e integridade superiores aos protocolos comercialmente disponíveis. Utilizando o protocolo de extração Híbrido-CTAB, foi possível obter grande quantidade de RNA com a qualidade exigida para a construção de bibliotecas de cDNA e estudos de expressão gênica por RT-qPCR em pau-ferro.

3.6 REFERÊNCIAS

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23–39, 2002.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, 1987.

DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227–230, 2010.

DING, L. W.; SUN, Q. Y.; WANG, Z. Y.; SUN, Y. Bin; XU, Z. F. Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 374, n. 2, p. 426–428, 2008.

DORAK, M. T. Real-time PCR: 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006.

ESSER, K.-H.; MARX, W. H.; LISOWSKY, T. Maxxbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. **Nature Methods**, v. 3, n. 1, 2006.

FARREL, R. E. RNA Methodologies: 5. ed. London: Editora Academic Press, 2017.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 126–139, 2006.

FU, X.; DENG, S.; SU, G.; ZENG, Q.; SHI, S. Isolating high-quality RNA from mangroves without liquid nitrogen. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, n. 2, p.

197–197, 2004.

GASIC, K.; HERNANDEZ, A.; KORBAN, S. S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, n. 4, p. 437–438, 2004.

SANGHA, J.; GU, K.; KAUR, J.; YIN, Z. An improved method for RNA isolation and cDNA library construction from immature seeds of *Jatropha curcas* L. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, 2010.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J.; TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.73>>. Acessado em: 12 fev. 2018.

SIDDAPPA, N. B.; AVINASH, A.; VENKATRAMANAN, M.; RANGA, U. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. **BioTechniques**, v. 42, n. 2, p. 188–192, 2007.

SILVA, D. V.; BRANCO, S. M. J.; HOLANDA, I. S. A.; ROYAERT, S.; MOTAMAYOR, J. C.; MARELLI, J. P.; CORREA, R. X. Comparative evaluation of total RNA extraction methods in *Theobroma cacao* using shoot apical meristems. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, 2016.

VERMEULEN, J.; DE PRETER, K.; LEFEVER, S.; NUYTENS, J.; DE VLOED, F.; DERVEAUX, S.; HELLEMANS, J.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 9, 2011.

WANG, T.; ZHANG, N.; DU, L. Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 9, p. 629–633, 2005.

4. PROSPECÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE ENSAIOS RT-qPCR DE GENES ORTÓLOGOS RELACIONADOS AO DÉFICIT HÍDRICO EM PAU-FERRO.

Resumo

O trabalho objetivou prospectar genes ortólogos de tolerância ao déficit hídrico e genes de referência em espécies evolutivamente próximas da forrageira leguminosa pau-ferro, bem como otimizar ensaios RT-qPCR desses genes utilizando o transcriptoma do pau-ferro. Sequências conservadas da espécie alfafa (leguminosa) foram utilizadas para o desenho de *primers* para amplificação de genes ortólogos relacionados à tolerância ao déficit hídrico (HSP70, NAC e DREB) e genes ortólogos de referência (GAPDH, β -Actina e eEF1A). Todos os *primers* desenhados para os genes ortólogos amplificaram por RT-qPCR utilizando RNA de pau-ferro como molde das reações. Os resultados das eficiências de amplificação de todos os genes variaram de 93% a 106,87%. Os coeficientes de correlação (reprodutibilidade) variaram de 0,986 a 0,998 e da faixa dinâmica linear igual a 5log evidenciaram a robustez e precisão das reações. O resultado das curvas de *melting* e os controles de contaminação (NTC e -RT) demonstraram a especificidade dos ensaios RT-qPCR que foram confirmados através de eletroforese em gel de agarose. Os *primers* utilizados para amplificar os genes ortólogos obtiveram parâmetros de eficiências de amplificação, especificidades e reprodutibilidades exigidos para estudos de expressão gênica por RT-qPCR.

Palavras chaves: *Caesalpinia ferrea*; estresse hídrico; transcriptoma

PROSPECTION AND OPTIMIZATION OF RT-qPCR TESTING OF ORTHOLOGOUS GENES RELATED TO WATER DEFICIT IN PAU-FERRO.

Abstract

The objective of this work was to prospect orthologous genes of drought tolerance and reference genes in species that are evolutionarily close to the forage legume pau-ferro, as well as to optimize and validate RT-qPCR assays of these genes using the pau-ferro transcriptome. Preserved alfalfa (legume) species were used to design primers for orthologous genes amplification related to dry tolerance (HSP70, NAC and DREB) and reference orthologous genes (GAPDH, β -Actin and eEF1A). All primers designed for orthologous genes amplified by RT-qPCR using pau-ferro RNA as a template of the reactions. The results of the amplification efficiencies of all genes ranged from 93% to 106.87%. The correlation coefficients (reproducibility) ranged from 0.986 to 0.998 and the linear dynamic range of 5 log showed the robustness and precision of the reactions. The results of the melting curves and the contamination controls (NTC and -RT) demonstrated the specificity of the RT-qPCR assays that were confirmed by agarose gel electrophoresis. The primers used to amplify orthologous genes obtained parameters of amplification efficiencies, specificities and reproducibilities required for RT-qPCR gene expression studies.

Key words: *Caesalpinia ferrea*; hydric stress; transcriptome

4.1 INTRODUÇÃO

A partir do desenvolvimento da transcriptômica, tornou-se possível a identificação e o estudo dos genes relacionados aos mecanismos de resistência ao déficit hídrico em plantas. Esses estudos são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento visando a obtenção de cultivares tolerantes e capazes de produzir alto rendimento em condições ambientais variáveis (JANIÁK et al., 2017). Entretanto, a maioria dos estudos foram realizados utilizando espécies sensíveis a condições de estresse, como a planta modelo *Arabidopsis thaliana* e em espécies de interesse econômico, que forneceram as bases gerais das vias moleculares de resposta que parecem ser essencialmente conservadas em todas as espécies de plantas.

Espécies como a *Arabidopsis thaliana* e outras espécies estudadas não parecem ser os modelos experimentais mais apropriados para investigar os mecanismos de resistência ao déficit hídrico, pois elas não são tolerantes ao estresse, possuindo assim, uma informação genética limitada associada à tolerância a seca (BOSCAIU et al., 2008; PARVATHI et al., 2013).

Plantas não domesticadas que naturalmente são adaptadas às condições ambientais desfavoráveis podem fornecer um modelo de estudo mais adequado e informativo do controle genético que opera na tolerância ao estresse hídrico, na medida em que elas possuem mecanismos de resposta mais eficientes que as plantas não tolerantes, embora compartilhem de uma mesma base molecular (BOSCAIU et al., 2012). Nesse sentido, o estudo de espécies adaptadas a ecossistemas brasileiros secos e de altas temperaturas, como a espécie pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*), uma forrageira arbórea que se distribui na região semiárida do Brasil, tem o potencial de ampliar o conhecimento dos genes e a prospecção de novos genes capazes de contribuir para geração de plantas mais adaptadas a ambientes com restrição hídrica. Porém, o pouco interesse econômico e a não existência de sequências depositadas em bancos de dados genômicos, dificultam o estudo dessas espécies.

A utilização de genes ortólogos são uma importante ferramenta no estudo de espécies como pau-ferro, tendo em vista que são uma subcategoria de genes homólogos que ocorrem em diferentes espécies e derivam de um ancestral comum. A ortologia possibilita estudos que quantifiquem o nível de expressão de genes relacionados a tolerância a seca em espécies que não foram sequenciadas a partir de

espécies que tiveram as sequências desses genes depositadas em bancos de dados genômicos.

A transcrição reversa do RNA codificante (RNAm) combinada à PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é o método mais eficaz e informativo na quantificação de alterações mínimas na expressão genes de interesse (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010). Porém, uma series de deficiências técnicas e fontes de variação podem afetar um ensaio de RT-qPCR. Algumas condições básicas devem ser atendidas para que os *primers* utilizados para amplificar os genes do estudo gerem dados precisos de expressão gênica: eficiência de amplificação; especificidade e reprodutibilidade das amplificações. Dessa forma, todo ensaio de RT-qPCR deve ser otimizado e validado sob a luz desses critérios básicos antes de serem usados na obtenção de dados experimentais de expressão gênica.

O trabalho objetivou prospectar genes ortólogos de tolerância ao estresse hídrico e genes de referência em espécies próximas evolutivamente da forrageira pau-ferro, bem como desenhar *primers* e otimizar ensaios RT-qPCR desses genes utilizando o transcriptoma do pau-ferro.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material biológico e local de estudo

O estudo foi conduzido no laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA Meio-Norte, Teresina – PI.

As sementes de pau-ferro usadas para a formação das mudas pertenciam ao banco ativo de germoplasma de forrageiras da EMBRAPA Meio-Norte que após 45 dias de germinação, tiveram suas folhas usadas como material biológico.

4.2.2 Buscas das sequências dos genes e desenho dos *primers*

Foram realizadas buscas de genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico e genes de referência na literatura científica para espécies mais próximas evolutivamente do pau-ferro.

Sequências conservadas de cDNA de *Medicago sativa* L. (alfafa), pertencente à família das leguminosas (Fabaceae), obtidas no GenBank disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dos genes alvos HSP70, NAC, DREB e dos genes de referência β -Actina, Fator de alongamento (ϵ EF1A) e GAPDH foram

utilizados para o desenho dos *primers* e determinação dos *amplicons* dos genes ortólogos em pau-ferro.

As sequências selecionadas foram analisadas pelo programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) para comparação e verificação das similaridades. As sequências FASTA foram alinhadas pelo programa ClustalX para identificação das regiões conservadas.

As regiões conservadas foram selecionadas e comparadas com outras sequências no GenBank pelo programa BLASTn para confirmação de sua identidade. A partir das regiões conservadas foram desenhados iniciadores para RT-qPCR pelo programa Primer Express® software 3.0 (Applied Biosystems) considerando os seguintes parâmetros: temperatura de *melting* – T_m, tamanho do fragmento, tamanho do iniciador, conteúdo CG, especificidade, ausência de estruturas secundárias e interação entre *primers*.

4.2.3 Otimização dos ensaios de RT-qPCR

Todos o *primers* desenhados para hibridizar e amplificar genes ortólogos em pau-ferro tiveram suas temperaturas de anelamento experimentais otimizadas através de reações de RT-qPCR. Foram feitas diferentes reações de RT-qPCR em gradiente de temperatura para os genes alvos (HSP70, NAC e DREB) bem como os genes de referência (β -Actina, eEF1A e GAPDH). Foram testadas 4 temperaturas para cada gene. A primeira e menor temperatura foram definidas como a média das duas temperaturas de *melting* (T_m) do par de *primers* menos 5°C. A partir dessa temperatura, aumentou-se 2°C sucessivamente até obter os quatro pontos do gradiente de temperatura. As amplificações em cada temperatura aconteceram em triplicata técnica, totalizando 12 reações para cada par de *primers*. Também foram incluídos em triplicata técnica os controles negativos NTC e –RT.

O cDNA usado como molde para as reações foi obtido a partir de RNA total extraído de folhas de pau-ferro utilizando o protocolo Híbrido-CTAB, que posteriormente foi tratado com DNase I para degradação do DNA genômico. Foi utilizado o kit Amplification Grade DNase I da Invitrogen™ nas seguintes concentrações: 1ug de RNA, 1 μ L 10x DNase I buffer, 1 μ L de DNase I 1 U/ μ L, água DEPC q.s.p 10 μ L. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. A inativação da DNase I ocorreu através da adição de 1 μ L de 25 mM de EDTA e aquecimento a 65°C por 10 minutos. Em seguida foi realizada a síntese do

cDNA. Foi utilizado o kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ na seguinte configuração: 10 µL de 2x RT Buffer, 1 µL 20x RT enzyme mix, 900 ng de RNA e água DEPC q.s.p 20 µL. Cada reação foi incubada a 37°C por 60 minutos e interrompida por aquecimento a 95°C por 5 minutos.

Foi utilizado o sistema químico PowerUp™SYBR™Green Master Mix da Applied Biosystems para as reações RT-qPCR: 2 µL de cDNA, 5 µL PowerUp™SYBR™Green Master Mix (2x), 250 nM de *primers* (*forward* e *reverse*) e água DEPC q.s.p 10 µL. As amplificações ocorreram no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR da Thermofisher e foi utilizado o programa de amplificação: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de (95°C por 15 segundos para desnaturação, Temperatura de anelamento por 15 segundos, 72°C por 1 minuto para extensão), em seguida foi executado uma etapa de dissociação pré-programada no equipamento para obtenção da curva de *melting*. Os Cts obtidos, a partir de mesmo nível de fluorescência (*threshold*), nas reações de RT-qPCR com gradiente de temperatura, foram usadas para determinar a temperatura de anelamento dos *primers*. A temperatura de anelamento escolhida foi aquela que gerou o menor Ct com amplificação específica.

As especificidades das reações de RT-qPCR, nas diferentes temperaturas, foram avaliadas através dos Figura da curva de *melting*. As reações também foram analisadas em eletroforese de gel de agarose (1,5% agarose, 0,5x TBE) para verificar a presença de fragmentos inespecíficos e confirmar o tamanho dos *amplicons*. 5 µL de reação foram misturados com 3 µL de tampão de carregamento (60% v/v glicerol, 60 mM EDTA, 0,48% m/v SDS, 0,03% m/v azul de bromofenol) e pré-coradas com GelRed®10.000x na concentração 10x. Os géis foram submetidos a uma relação 5 V/cm por 90 minutos e visualizados em fotodocumentador.

Foi obtida uma curva padrão para determinação da eficiência de amplificação dos genes alvos (HSP70, NAC e DREB) bem como os genes de referência (β -Actina, eEF1A e GAPDH). A curva padrão foi construída a partir de uma amostra de cDNA diluída em série. O cDNA usado foi o mesmo utilizado para otimizar as temperaturas de anelamento dos *primers*. A curva padrão para cada gene tinha 5 pontos de diluição com fator 1/10 em série, cobrindo, portanto, uma faixa dinâmica 5 log. Cada ponto de diluição foi usado como molde para reações de RT-qPCR em triplicata técnica, totalizando 15 reações para cada gene. Também foram incluídos os controles negativos NTC e -RT em triplicata técnica para cada curva padrão. O log da

concentração das diluições (eixo X) foi representado em função do valor do Ct (eixo Y) obtido no equipamento de PCR em tempo real. A inclinação ou “*slope*” da reta obtida por regressão linear foi usada para calcular a eficiência de amplificação dos genes através da equação: Eficiência = $10^{-(-1 / \text{slope}) - 1}$. A partir da curva padrão, também foram obtidos os parâmetros de índice de correlação (R^2) e a reprodutibilidade, bem como a faixa dinâmica linear e a sensibilidade do ensaio de RT-qPCR. A curva padrão foi produzida através do *software* do equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR da ThermoFisher.

O sistema químico PowerUp™SYBR™Green Master Mix da Applied Biosystems foi utilizado para as reações PCR em tempo real: 2 µL de cDNA, 5 µL PowerUp™SYBR™Green Master Mix (2x), 250 nM de *primers* (forward e reverse) e água DEPC q.s.p 10 µL. As amplificações ocorreram no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR da ThermoFisher e foi utilizado o programa de amplificação: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de (95°C por 15 segundos para desnaturação, Temperatura de anelamento por 15 segundos, 72°C por 1 minuto para extensão), em seguida foi executado uma etapa de dissociação pré-programada no equipamento para obtenção da curva de *melting*.

As especificidades das reações de RT-qPCR foram avaliadas através da curva de *melting*. As reações também foram analisadas em eletroforese de gel de agarose (1,5% agarose, 0,5x TBE) para verificar a presença de fragmentos inespecíficos e confirmar o tamanho dos *amplicons*. 5 µL de reação foram misturados com 3 µL de tampão de carregamento (60% v/v glicerol, 60 mM EDTA, 0,48% m/v SDS, 0,03% m/v azul de bromofenol) e pré-coradas com GelRed®10.000x na concentração 10x. Os géis foram submetidos a uma relação 5 V/cm por 90 minutos e visualizados em fotodocumentador.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Busca das sequências e desenho de *primers*

Todos os *primers* obtiveram tamanhos que variaram de 20bp a 25bp e temperaturas de *melting* que variaram de 58°C a 60°C. O par de *primers* para o gene HSP apresentou a maior diferença da temperatura de *melting* entre os *primers*, $\Delta=0,7$ °C (Tabela 1).

O tamanho dos *amplicons*, os tamanhos dos *primers* e suas respectivas temperaturas de *melting* foram estabelecidos conforme critérios de ensaios de RT-

qPCR, visando a máxima eficiência e especificidade das amplificações dos genes ortólogos em pau-ferro. Os tamanhos esperados dos *amplicons* obtidos a partir das sequências de alfafa variariam de 93bp a 168bp (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers desenhados para amplificação dos genes ortólogos alvos e referência em pau-ferro.

Gene	Senso/Antissenso	Tamanho		Tm(°C)	%GC
		<i>primer</i>	<i>amplicon</i>		
NAC	5'TCAAGACAGATTGGATTATGCATA3'	25 bp	93bp	59,5	36
	5' CCCAGTCATCTAGCCTCATGGA 3'	22 bp		60	55
ACTINA	5' GCTGACCGAATGAGCAAGGA 3'	20 bp	138bp	59,9	55
	5' CATCTGCTGGAAGGTGCTGAG 3'	21 bp		59,6	57
eEF1A	5' TGGTGGTTTTGAGGCTGGTAT 3'	21 bp	119pb	58	48
	5' GAGTGGTGGCATCCATCTTGT 3'	21 bp		58,5	52
GAPDH	5' ACCGTTCACTCCATCACTGCTAC 3'	23 bp	136pb	59,2	52
	5' GAAGCACTTTCCCAACAGCCT 3'	21 bp		59,3	52
HSP	5' GTCGTCACTGTCCCTGCTTACTT 3'	23 bp	168pb	58,5	52
	5' CAACACGTTCTTCTCACCAACT 3'	24 bp		59,2	46
DREB	5' GGAAATGGGTTGCTGAGATTAGG 3'	23 bp	123pb	59,8	48
	5' AAGGACCATACATGGCTCTAGCAG3'	24 bp		59,7	50

*Tamanho dos *primers* e *amplicons*, Tm(°C): temperatura de *melting* e %GC: porcentagem de guanina e citosina em cada *primer*.

4.3.2 Otimização dos ensaios de RT-qPCR

As temperaturas de anelamento experimentais de todos os genes alvo (NAC, DREB e HSP) e genes de referência (β -Actina, eEF1A e GAPDH) foram otimizadas através de reações RT-qPCR. As Figuras de amplificação para os genes NAC e GAPDH demonstram o impacto que o gradiente da temperatura de anelamento tem sobre a eficiência das amplificações. Em temperaturas mais altas, próximas a 60°C, além da diminuição da eficiência, ocorreu um aumento do desvio padrão das curvas de amplificação em triplicata técnica (Figura 1).

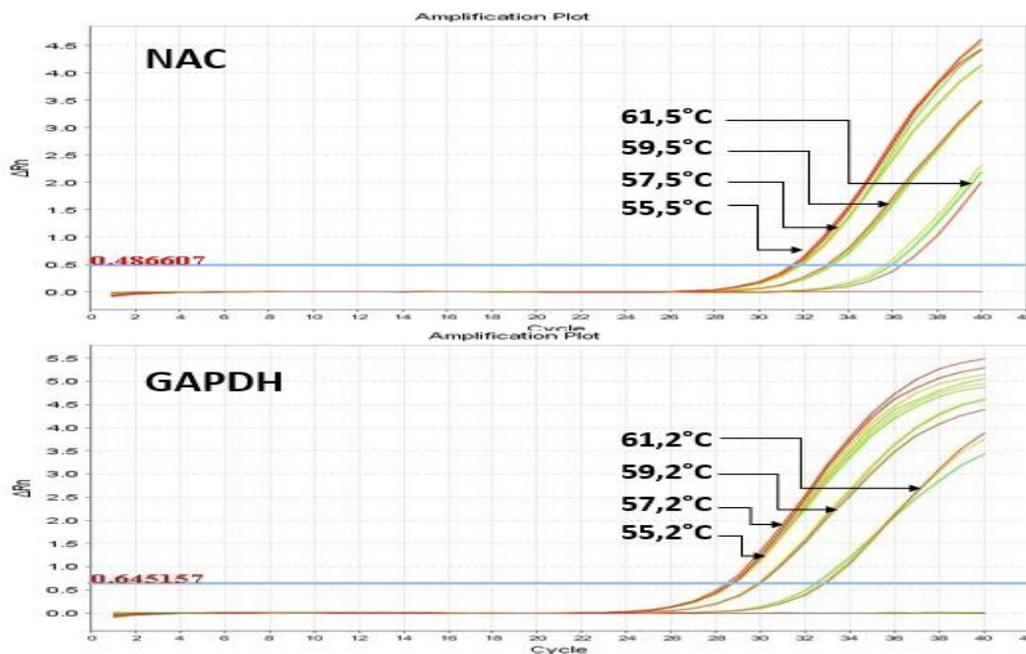


Figura 1 - Reações RT-qPCR em gradiente de temperatura para os genes NAC e GAPDH. O deslocamento para direita das curvas de amplificação é causado pela diminuição da eficiência de amplificação em virtude da temperatura de anelamento usada.

A diminuição da eficiência de amplificação leva, conseqüentemente, a valores de Ct mais elevados. Foram escolhidas as temperaturas que geraram a menor média de Ct com amplificação específica para cada um dos genes. Os controles negativos NTC e (-RT) em triplicata técnica também não geraram sinal de amplificação para as temperaturas escolhidas, evidenciando não ter havido contaminações (exógenas e com DNA genômico) (Tabela 2).

Tabela 2 - Temperaturas de anelamento experimentais dos genes alvo e genes de referência obtidas através de ensaios RT-qPCR.

Gene	Temperatura de anelamento	Média Ct
NAC	55,5°C	31,7
HSP	56,5°C	26,27
DREB	57,7°C	30,83
β -Actina	57,6°C	25,7
eEF1A	56°C	26,53
GAPDH	57,2°C	28,63

As especificidades das reações de amplificação em tempo real de cada uma das temperaturas escolhidas foram analisadas por meio da curva de *melting*. A

presença de um único pico mostrou que não houve ampliações inespecíficas e estruturas secundárias nos *primers* (Figura 2).

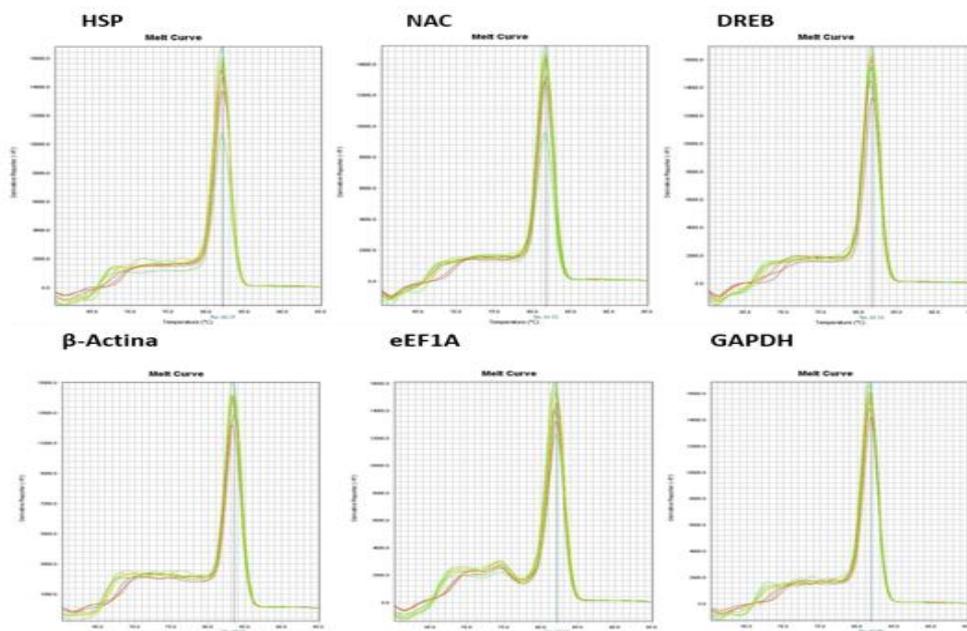


Figura 2 - Curvas de *melting* dos genes ortólogos alvos (HSP, NAC e BREB) e de referência (β -Actina, eEF1A e GAPDH) para as temperaturas de anelamento otimizadas.

Os produtos de amplificação, produzidos nas temperaturas otimizadas em reações RT-qPCR, tiveram sua especificidade e tamanho dos *amplicons* confirmados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. As curvas de *melting*, os controles (NTC e -RT) e eletroforese dos produtos de amplificação validaram a especificidade das reações de RT-qPCR (Figura 3).

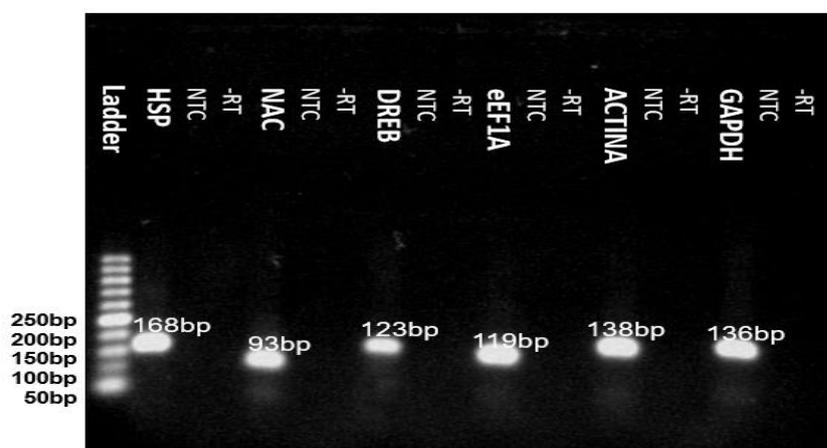


Figura 3 - Gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação dos genes alvos e genes de referências nas temperaturas de anelamento otimizadas.

Com as temperaturas de anelamento otimizadas experimentalmente através de parâmetros quantitativos da RT-qPCR, foram obtidas as curvas padrão para determinação das eficiências de amplificação de cada um dos genes. Os resultados da amplificação de uma amostra de cDNA de pau-ferro em diluição seriada 1:10 para o gene alvo DREB e para o gene de referência eEF1A demonstram o deslocamento para direita das curvas de amplificação causada pela diminuição crescente de cDNA usado como molde nas reações de RT-qPCR (Figura 4).

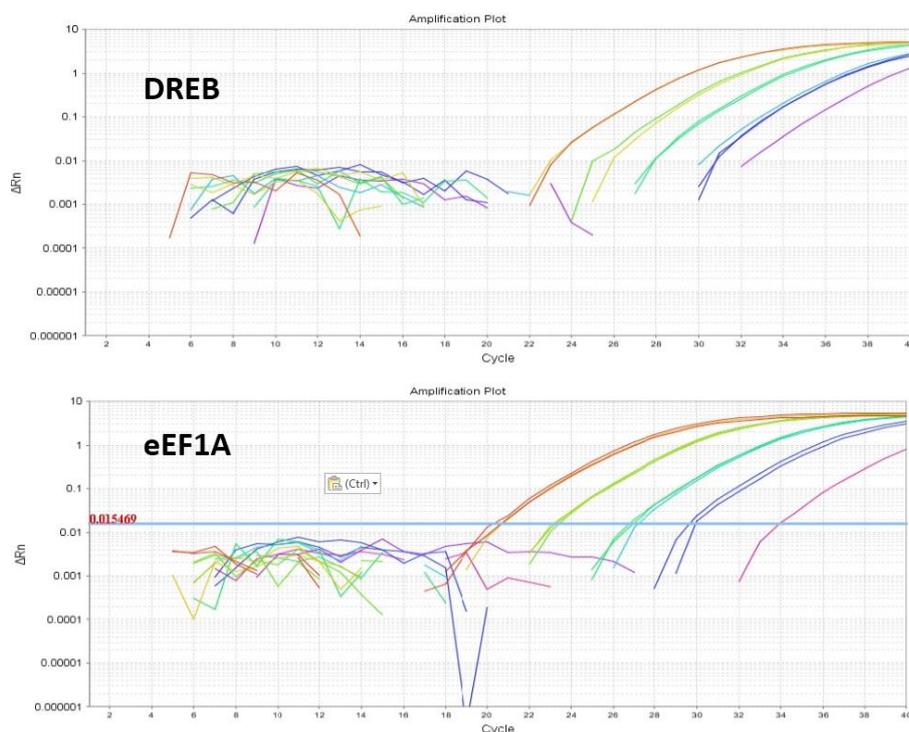


Figura 4 - Gráficos de amplificação de reações de RT-qPCR usando template de cDNA de pau-ferro em diluição seriada. O deslocamento para a direita é consequência da utilização de amostras de cDNA mais diluídas.

O resultado da regressão linear do log das concentrações das diluições (eixo x) e os valores de Cts das diluições (eixo y) são apresentados na forma de curvas padrões para os genes ortólogos DREB, NAC. A partir da inclinação da reta, foi calculado as eficiências de amplificação dos genes, e o ajuste dos pontos a curva padrão possibilitou obter o coeficiente de correlação (R^2) (Figuras 5).

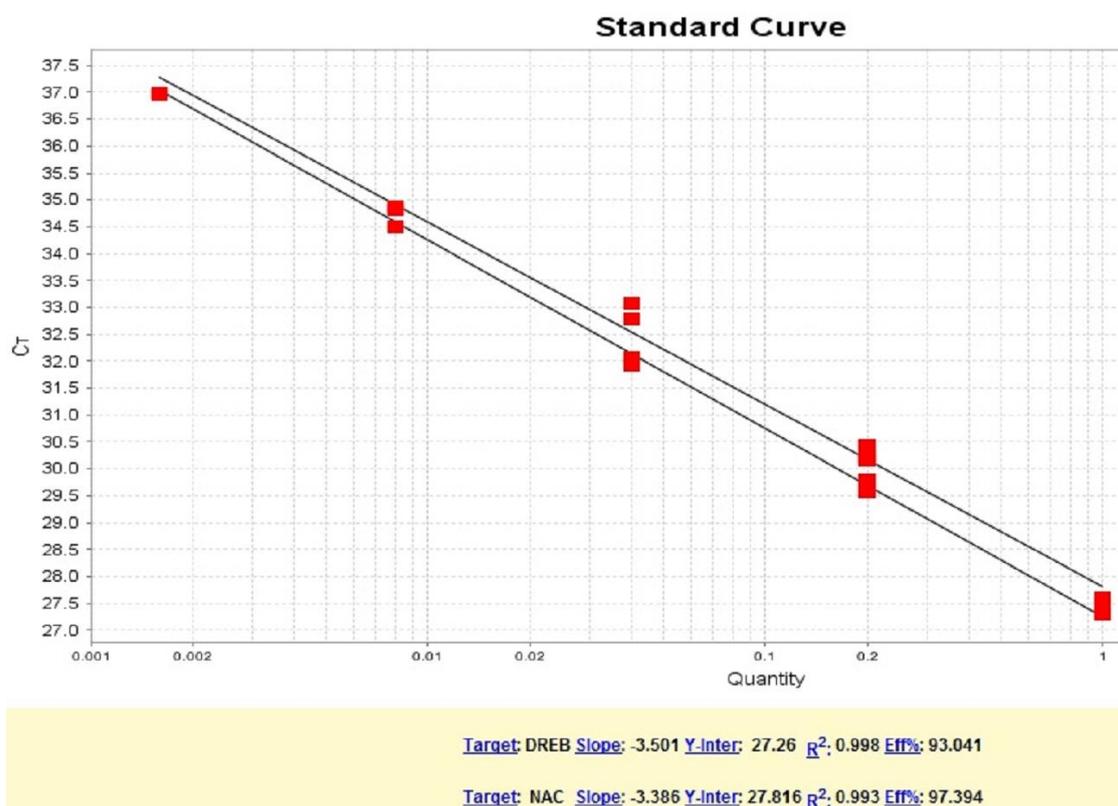


Figura 5 - Curvas padrões de eficiência para os genes ortólogos DREB e NAC.

Os resultados das curvas padrões de todos os genes ortólogos apresentaram eficiências de amplificação que variaram de 93,04% a 106,87%, e correlações lineares (R^2) que variaram de 0,986 a 0,998 (Tabela 3).

Tabela 3 - Inclinação da curva padrão (*Slop*), Eficiência de amplificação, coeficiente de correlação (R^2) e faixa dinâmica linear dos genes alvos e genes de referência obtidos a partir das curvas padrões.

Gene	Slop	Eficiência de amplificação	Faixa dinâmica	R ²
HSP	-3.168	106,87%	5log	0.986
NAC	-3.386	97,38%	5log	0.993
DREB	-3.501	93,04%	5log	0.998
β -Actina	-3.218	105%	5log	0.993
eEF1A	-3.193	106%	5log	0.992
GAPDH	-3.421	96,01%	5log	0.995

Todos os controles negativos NTC e (-RT) incluídos em triplicata técnica em todas as curvas padrões não geraram sinal de amplificação. A especificidade das

amplificações em tempo real das curvas padrões foram monitoradas através da curva de *melting*. A presença de um único pico em todas as amplificações RT-qPCR revelaram que não ocorreu amplificações inespecíficas e estruturas secundárias nos *primers* (Figura 6).

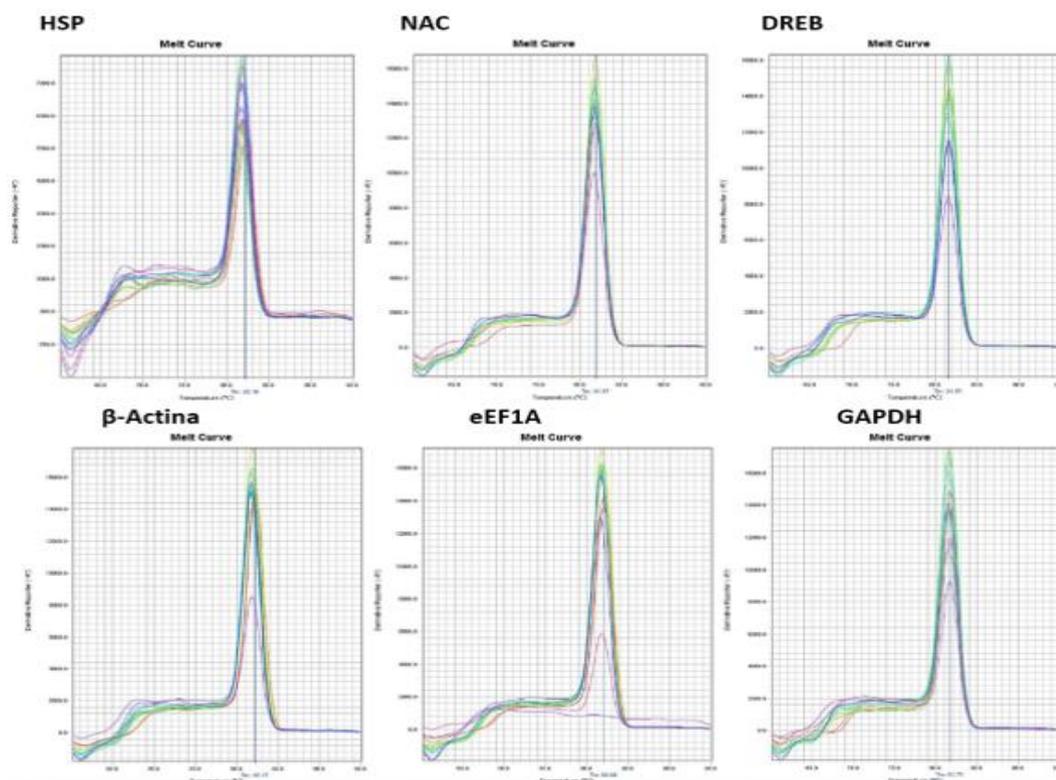


Figura 6 - Curvas de *melting* dos genes ortólogos alvos (HSP, NAC e BREB) e referência (β -Actina, eEF1A e GAPDH) amplificados para as curvas padrões de eficiência.

Os produtos de amplificação de todos os genes foram, posteriormente, confirmados por meio da eletroforese em gel de agarose. O resultado da eletroforese também confirmou o tamanho dos *amplicons* de todos os genes amplificados utilizados para gerar as curvas padrões de eficiência (Figura 7).

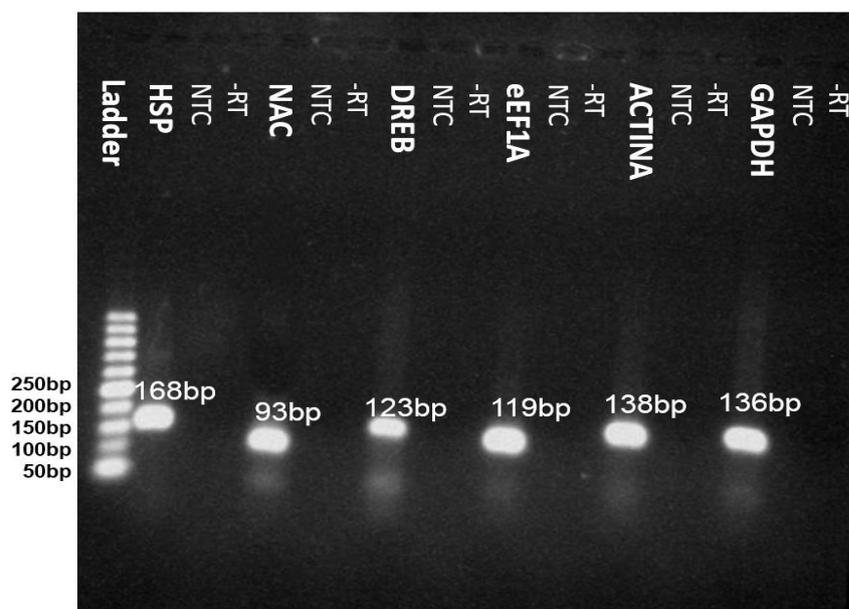


Figura 7 - Gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação dos genes alvos e genes de referências das curvas padrões de eficiência.

4.4 DISCUSSÃO

A RT-qPCR é o método mais eficaz na quantificação de um RNAm específico devido sua especificidade, ampla faixa de quantificações, sensibilidade e boa reprodutibilidade (SVEC et al., 2015). Porém, algumas condições e critérios devem ser alcançados para garantir a robustez dos ensaios. Os critérios focam principalmente se os *primers* e *amplicons* desenhados para amplificação e quantificação dos transcritos alvos atenderão a três condições básicas: eficiência de amplificação, especificidade e reprodutibilidade.

Ao se utilizar *primers* e *amplicons* desenhados a partir de sequências de uma espécie diferente daquela que será o objeto do estudo de expressão gênica, a otimização desses critérios básicos assumem uma importância ainda maior, na medida em que nem sempre existe uma equivalência funcional entre genes ortólogos (STUDER; ROBINSON-RECHAVI, 2009).

A otimização das reações para amplificação dos genes ortólogos, a partir de cDNA de pau-ferro, focaram na obtenção experimental da temperatura de anelamento através de um gradiente de temperatura, utilizando uma concentração padrão (250nM) para todos os *primers* utilizados. Raymaekers et al. (2009) destacam que a otimização das condições da reação de PCR em tempo real foca na concentração ideal dos primers, na temperatura de anelamento e na quantidade de cDNAs usados como *template*, que devem produzir curvas de amplificação específicas com o menor

Ct, ou seja, maior eficiência de amplificação. Porém, a temperatura de anelamento experimental é, depois dos próprios *primers*, o fator que mais tem impacto na eficiência e especificidade das amplificações (WU et al., 1991). Nesse sentido, o gradiente de temperatura aplicado a todos os genes alvos e genes de referência foram eficazes em produzir uma nítida diferença dos valores de Ct, o que facilitou na escolha da temperatura de anelamento em que os *primers* tinham máxima eficiência de amplificação, obtendo baixos valores de Ct.

Na faixa de 55°C-57°C foi produzido pouca variação no parâmetro Ct, e em temperaturas superiores a 57°C foram obtidos Cts cada vez maiores que acarretaram em baixa eficiência, diminuição dos rendimentos (fase platô) e na baixa reprodutibilidade na medida em que não ocorria sobreposição das curvas de amplificação nas triplicatas técnicas. Apesar de ter sido usado uma mesma amostra de cDNA de pau-ferro e a mesma quantidade de molde na preparação das reações, uma comparação das temperaturas otimizadas experimentalmente e seus respectivos valores de Ct entre os diferentes genes ficou prejudicada, na medida em que os limiares de fluorescência (*threshold*) usados para estabelecer os valores de Ct foram diferentes e ajustados automaticamente pelo equipamento de PCR em tempo real.

O gene NAC obteve a menor temperatura de anelamento (55,5°C) com valor de Ct igual a 31,7; já o gene GAPDH obteve temperatura de anelamento (57,2°C) com Ct igual a 28,63. O maior valor de Ct para o gene NAC poderia indicar uma menor eficiência de amplificação, porém o ajuste do *threshold* e a abundância relativa dos transcritos na amostra de cDNA poderiam explicar esse alto valor de Ct. Alguns algoritmos utilizam dados do incremento de fluorescência na fase exponencial para calcular a eficiência de amplificação de reações individuais, porém a metodologia mais usada para determinar a eficiência real de amplificação é a metodologia da curva padrão de uma diluição seriada (BUSTIN et al., 2009; DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010; SVEC et al., 2015).

O estabelecimento da curva padrão para determinação da eficiência de amplificação dos genes ortólogos em pau-ferro é uma medida da taxa em que a polimerase converte os reagentes (dNTPs, *primers* e cDNA) no *amplicon*. O aumento máximo teórico do *amplicon* é exponencial (2^n), que é obtido em curva padrão com inclinação igual a -3.32 representando uma reação 100% eficiente. Os *primers* desenhados para amplificar os genes ortólogos em pau-ferro obtiveram inclinações na curva padrão que variaram de $-3,501$ a $-3,168$ que corresponderam a eficiências

de amplificação iguais a 93,04% e 106,87% respectivamente. Inclinações da curva padrão entre -3,1 e -3,6, com eficiências entre 90% e 110% são aceitas em estudos de expressão gênica por meio da RT-qPCR (RAYMAEKERS et al., 2009).

A eficiência é o parâmetro que possui o maior impacto na cinética de amplificação da RT-qPCR. Portanto, os valores de Ct e, conseqüentemente, a precisão dos resultados das quantificações dos níveis de expressão são influenciados pela eficiência de amplificação. Baixa eficiência de amplificação (próximas ou menores que 90%) podem ser causadas por contaminantes inibidores enzimáticos, temperatura de anelamento alta e/ou pouco otimizada, *primers* mal projetados e *amplicons* grandes com estrutura secundária. Eficiências de amplificação altas (próximas ou maiores que 110%) são geralmente resultado de dímeros de *primers* ou amplificações inespecíficas. Porém, as causas mais comuns de valores altos e baixos de eficiência de amplificação são pipetas não calibradas e/ou mau procedimento técnico (TICHOPAD et al., 2003; TICHOPAD; DIDIER; PFAFFL, 2004; BUSTIN et al., 2009).

Apesar de estar dentro da faixa que proporciona robustez as quantificações por RT-qPCR, o baixo valor de eficiência de amplificação do gene ortólogo DREB (93%) poderia indicar a presença de contaminantes e/ou problemas relacionados ao tamanho do *amplicon*. Já para o gene ortólogo HSP, que obteve alta taxa de amplificação (106,87%), o resultado poderia indicar a presença de amplificações inespecíficas. Porém, foram desenhados *amplicons* curtos (<250bp) para todos os genes ortólogos e usadas amostras de RNA livre de contaminantes e inibidores para construção das curvas padrões. Os resultados dos controles de contaminação e amplificações inespecíficas, utilizados em todos os ensaios RT-qPCR, foram negativos. Dessa forma, é mais provável que esses desvios dos valores de eficiências em torno do valor teórico 100% tenham sido causados por erros de pipetagem.

O coeficiente de correlação (R^2) é outro importante marcador, fornecido pela curva padrão, que evidencia se um ensaio RT-qPCR está otimizado. O valor R^2 representa o quão bem os dados se ajustam à linha de regressão da curva padrão, ou seja, sua linearidade. A relação linear entre os valores de Ct e as quantidades de molde correspondentes, permitiu verificar que a eficiência de amplificação permaneceu constante em diferentes faixas de concentração de RNA, e também forneceu uma medida da variabilidade das repetições e reprodutibilidade dos ensaios RT-qPCR dos genes ortólogos. Valores de R^2 devem ser superiores a 0,98. Todos os

valores de R^2 obtidos das curvas padrões dos genes ortólogos foram superiores a 0,98 (BUSTIN et al., 2009; RAYMAEKERS et al., 2009; DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010)..

Foi utilizado o sistema químico de detecção SYBR® Green que se liga de forma não específica ao DNA de cadeia dupla (dsDNA). Como resultado, a presença de produtos inespecíficos nas reações de RT-qPCR podem contribuir para a fluorescência global afetando a precisão das quantificações (BUSTIN et al., 2009). Nesse sentido, foi adicionado uma análise de curva de *melting* após cada uma das reações de amplificação dos genes ortólogos. A presença de um único pico definido mostra que não ocorreu amplificações inespecíficas e estruturas secundária nos *primers* utilizados. Além disso, todos produtos de amplificação foram confirmados quanto ao tamanho esperado dos *amplicons* e a ausência de fragmentos inespecíficos através de eletroforese em gel de agarose.

A amostra controle transcrição reversa negativa (-RT) monitora possíveis contaminações com DNA genômico nas amostras de RNA que podem coamplificar com as moléculas de cDNA (BUSTIN et al., 2009). Esse controle negativo é particularmente importante no presente estudo, em virtude dos pares de *primers* desenhados para amplificar os genes ortólogos não abrangerem um *intron* ou hibridizarem na borda *intron-exon*, o que dificultaria a amplificação do DNA genômico. Todas as amostras -RT adicionadas aos ensaios de RT-qPCR não apresentaram curva de amplificação, evidenciando que os tratamentos das amostras de RNA com DNase foram eficazes. Os controles negativos de contaminação exógena NTC também não apresentaram sinal de amplificação. Os resultados das análises das curvas de *melting*, dos géis eletroforéticos e dos controles negativos -RT e NTC provaram que o sinal de amplificação dos genes ortólogos, utilizando cDNA de pau-ferro, foram provenientes dos *amplicons* de interesse, validando assim a especificidade dos ensaios RT-qPCR.

4.5 CONCLUSÕES

Foi possível verificar a ortologia entre uma espécie de clima temperado (alfafa) e uma espécie de região tropical (pau-ferro), de ocorrência em regiões semi-áridas. Essa correspondência possibilitou o desenho de *primers* e o planejamento de ensaios RT-qPCR para o estudo de expressão gênica em uma espécie que não possui sequências depositadas em bancos de dados genômicos.

A otimização dos *primers* e *amplicons* desenhados para amplificar, a partir do transcriptoma do pau-ferro, os genes ortólogos relacionado à tolerância a seca (HSP70, NAC e DREB) e genes ortólogos de referência (GAPDH, β -Actina e eEF1A) obtiveram parâmetros de eficiências de amplificação, especificidade e reprodutibilidade exigidos para estudos de expressão gênica por RT-qPCR.

4.6 REFERÊNCIAS

BOSCAIU, M.; DONAT, P.; LLINARES, J.; VICENTE, O. Stress-tolerant wild plants: A source of knowledge and biotechnological tools for the genetic improvement of stress tolerance in crop plants. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 40, n. 2, p. 323–327, 2012.

BOSCAIU, M.; LULL, C.; LIDON, A.; BAUTISTA, I.; DONAT, P.; MAYORAL, O.; VICENTE, O. Plant responses to abiotic stress in their natural habitats. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture**, v. 65, n. 1, p. 53–58, 2008.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227–230, 2010.

JANIAK, A.; KWASNIEWSKI, M.; SOWA, M.; GAJEK, K.; ŻMUDA, K.; KOŚCIELNIAK, J.; SZAREJKO, I. No Time to Waste: Transcriptome Study Reveals that Drought Tolerance in Barley May Be Attributed to Stressed-Like Expression Patterns that Exist before the Occurrence of Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-25, 2017.

PARVATHI, M. S.; NATARAJA, K. N.; YASHODA, B. K.; RAMEGOWDA, H. V.; MAMRUTHA, H. M.; RAMA, N. Expression analysis of stress responsive pathway genes linked to drought hardiness in an adapted crop, finger millet (*Eleusine coracana*). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 193–201, 2013.

RAYMAEKERS, M.; SMETS, R.; MAES, B.; CARTUYVELS, R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. **Journal of Clinical Laboratory**

Analysis, v. 23, n. 3, p. 145–151, 2009.

STUDER, R. A.; ROBINSON-RECHAVI, M. How confident can we be that orthologs are similar, but paralogs differ? **Trends in Genetics : TIG**, v. 25, n. 5, p. 210–216, 2009.

SVEC, D.; TICHOPAD, A.; NOVOSADOVA, V.; PFAFFL, M. W.; KUBISTA, M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 3, p. 9–16, 2015.

TICHOPAD, A.; DIDIER, A.; PFAFFL, M. W. Inhibition of real-time RT–PCR quantification due to tissue-specific contaminants. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, n. 1, p. 45–50, 2004.

TICHOPAD, A.; DILGER, M.; SCHWARZ, G.; PFAFFL, M. W. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 20, 2003.

WU, D. Y.; UGOZZOLI, L.; PAL, B. K.; QIAN, J.; WALLACE, R. B. The Effect of Temperature and Oligonucleotide Primer Length on the Specificity and Efficiency of Amplification by the Polymerase Chain Reaction. **DNA and Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 233–238, 1991.