

IDENTIFICAÇÃO DE GENES ALVO NA ESTEROIDOGENESE BOVINA POR RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi)

Pimenta, J.^{1,2*}, Nolasco, S.^{2,4}, Pires, V.² Marques C.C.¹, Castelo-Branco, P.⁵, Costa, L.², Prates, J.², Azevedo, R.¹, Pistola, M.¹ Fonseca E.,¹ Pereira R.M.L.N.^{1,2}

¹INIAV, National Institute for Agrarian and Veterinarian Research, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal

²CIISA, Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal

³CHUC, Coimbra Hospital and University Centre; Praceta Prof. Mota Pinto, 3000-075 Coimbra, Portugal

⁴ESTeSL, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

⁵Grupo de investigação em Terapêutica do Cancro e Desenvolvimento de Biomarcadores no Centro de Investigação Biomédica, Universidade do Algarve

Contacto:

*jorgepimenta7@gmail.com; jorge.pimenta@iniav.pt

Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar a interação entre a expressão de genes da família priónica (*prnp* e *sprn*), e genes ligados à esteroidogénese [CYP11A1(Pregnenolona) e CYP19A1(17β-Estradiol)], ao nível de células da granulosa (GCs) de bovinos.

Para tal, foi utilizado um mecanismo pós-transcricional de silenciamento de genes, a interferência por RNA (RNAi). Nesta técnica, pequenas moléculas sintéticas de dupla cadeia de RNA (21 a 25 pb, *small interfering RNAs*, siRNAs), complementares ao mRNA alvo do estudo, desencadeiam a degradação da respetiva molécula conduzindo ao silenciamento específico do gene-alvo. Este silenciamento dirigido permite o estudo da função de determinado mRNA e/ou da respetiva proteína. Neste âmbito, as GCs foram transfectadas com siRNAs específicos para os genes *prnp* e *sprn*. A eficiência de transfeção foi previamente otimizada utilizando “non-traget siRNAs” fluorescentes com localização nuclear, assim como diferentes concentrações de siRNA fluorescente *versus* diferentes quantidades do agente de lipofecção.

A melhor eficiência de transfeção (98%) foi obtida utilizando 25 pmol de siRNA e 2,5 µL do agente de lipofecção, por poço (P24). Após otimização das condições de transfeção, foram testadas as eficácias de silenciamento de cada siRNA por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Para cada gene foram testados (em separado e em conjunto) 2 siRNAs com sequências distintas (denominados P1 e P2 para o *prnp*, e S1 e S2 para o *sprn*). Os melhores resultados foram obtidos com os siRNAs P1 e S1, respetivamente para os genes *prnp* e *sprn*. Foi observado pela primeira vez, uma associação ($p < 0.05$) entre o silenciamento de um gene priónico (*sprn*), e a redução em cerca de 53% na expressão de um gene essencial à esteroidogénese (CYP11A1). Ainda de salientar que o método utilizado não causou citotoxicidade significativa a nível celular, tal como

verificado pela quantificação de Lactato Desidrogenase (LDH) no sobrenadante da cultura celular.

Os resultados obtidos reforçam a importância da inclusão de genes da família priónica no âmbito de estudos sobre esteroidogênese feminina, abrindo assim novos horizontes ao conhecimento da regulação da fisiologia reprodutiva.