

Padronização e comparação de métodos aplicados à extração de RNA total em serpentes do Gênero *Micrurus*

*Standardization and comparison of methods applied to total RNA extraction in snakes of the Genus *Micrurus**

Jéssica Cáceres Martins¹, Nelson Jorge da Silva Junior², Paula Carolina Rodrigues de Almeida³, Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa⁴, Vera Aparecida Saddi⁴

1 Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas.

2 Pontifícia Universidade Católica de Goiás - Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde - Laboratório de Genética e Biodiversidade

3 Coordenação de Zoologia, Laboratório de Herpetologia, Museu Paraense Emílio Goeldi

4 Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia da Associação de Combate ao Câncer em Goiás

Resumo: áreas de genoma e transcriptoma permitem a análise do perfil genético das toxinas produzidas por serpentes do gênero *Micrurus*, a partir da extração de RNA total das glândulas de veneno. A obtenção de RNA com boa qualidade é uma etapa fundamental para gerar dados de alto valor científico. Neste estudo, adaptações foram realizadas no processo de extração pelo método de Trizol, resultando em dois protocolos modificados que evidenciam a importância de cada etapa para a obtenção do material genético. O objetivo foi padronizar a metodologia utilizada para a extração de RNA total em glândulas de veneno de serpentes. O RNA total foi extraído de glândulas de veneno colhidas a fresco de espécimes de *Micrurus surinamensis*, acondicionadas em RNAlater® e purificados pela metodologia de Trizol. No protocolo 1 foi utilizado o homogeneizador, com a manutenção das amostras em gelo, e o protocolo 2 as especificações do método original proposto foram mantidas, excluindo apenas a etapa de homogeneização. O material obtido foi submetido à análise por espectrofotometria e eletroforese. Os dados foram analisados por estatística descritiva e comparativa, utilizando o teste T. Contrapondo a mesma quantidade de tecido, as amostras submetidas à extração pelo protocolo 1 apresentaram uma quantidade média de RNA superior àquela obtida pelo protocolo 2, com médias de 1560 ng (+366ng) e 132 ng (+31,5ng) de RNA ($p=0,0005$). Apesar das modificações nos protocolos, a integridade do produto extraído nos dois grupos foi equivalente, com valores de 1,94 (+0,022ng) e 1,96 (+0,013ng) ($p=0,55$). Conclui-se que o protocolo 1, que utiliza a homogeneização, deve permitir maior contato do Trizol com o tecido, garantindo melhor desnaturação das proteínas teciduais, enquanto as baixas temperaturas devem interromper a atividade enzimática das RNases, permitindo a obtenção de maiores concentrações de RNA e conservando a qualidade do material extraído..

Palavras-chave: Extração de RNA total. *Micrurus*. Glândula de veneno. Trizol.

Abstract: genome and transcriptome allow the analysis of the genetic profile of the toxins produced by snakes of the genus *Micrurus*, from the extraction of total RNA of the venom glands. To obtain RNA with good quality is a fundamental step to generate data of high scientific value. In this study, adaptations were made in the RNA extraction process by the Trizol method, with two modified protocols that highlight the importance of each step to obtain the genetic material. The objective of this study was to standardize the methodology used for the extraction of total RNA in the venom glands of coralsnakes. Total RNA was extracted from venom glands from specimens of *Micrurus surinamensis*, conditioned on RNAlater®, and purified by the Trizol methodology. In protocol 1 the homogenizer was used with the maintenance of the samples on ice, and protocol 2 the specifications of the original method proposed were maintained, excluding only the homogenization step. The material obtained was analyzed by spectrophotometry and electrophoresis. The data were analyzed by descriptive and comparative statistics, using the T-test. Comparing the same amount of tissue, the samples submitted to the extraction by protocol 1 presented an average amount of RNA superior to that obtained by protocol 2, with averages of 1560 ng (+ 366ng) and 132 ng (+ 31.5ng) RNA ($p = 0.0005$). Despite the modifications in the protocols, the integrity of the product extracted in the two groups was equivalent, with values of 1.94 (+ 0.022ng) and 1.96 (+ 0.013ng) ($p = 0.55$). It is concluded that protocol 1, which uses homogenization, should allow a greater contact of Trizol

DOI 10.18224/evs.v45i1.5724

Autor correspondente: jessica.casseres782@gmail.com

Recebido: junho, 2017 | Aceito: setembro, 2017 | Publicado: dezembro, 2018



Este artigo está licenciado com uma Licença Creative Commons. Atribuição Sem Derivações 4.0 CC BY-NC-ND.

with the tissue, guaranteeing better denaturation of the tissue proteins, while the low temperatures should interrupt the enzymatic activity of the RNases, allowing to obtain higher concentrations of RNA and preserving the quality of the extracted material of the female population.

Keywords: Total RNA extraction. *Micrurus*. Venom gland. Trizol.

Introdução

As cobras-corais verdadeiras (Família Elapidae) apresentam a maior diversidade de espécies dentre todas as serpentes venenosas da América, compreendendo 82 espécies, sendo 33 com ocorrência no Brasil, distribuídas nos gêneros *Leptomicrurus* Schmidt, 1928 e *Micrurus* Wagler, 1824. O gênero *Micrurus* é o mais diverso, com cerca de 79 espécies, distribuídas desde o sudeste dos Estados Unidos até a Província do rio Negro, na Argentina. *Micrurus surinamensis* é uma espécie amazônica adaptada para a vida aquática, que se alimenta basicamente de peixes¹.

Sabe-se que os venenos de serpentes do gênero *Micrurus* são extremamente tóxicos, responsáveis por induzir diferentes atividades farmacológicas, constituindo o envenenamento humano uma emergência médica. Estudos demonstram que um bloqueio neuromuscular progressivo constitui os sinais e sintomas resultantes do envenenamento, predominando as atividades neurotóxicas e miotóxicas, que em casos graves pode resultar em morte por parada respiratória^{1,2}.

Devido à variabilidade de habitats onde são encontradas e da variedade de itens alimentares³, uma considerável diversidade na composição do veneno desses animais é observada, o que provavelmente resulta na pouca reatividade do soro antielapídico disponível, tornando as cobras-corais um grupo de alto interesse médico. Porém, estudos sobre o mecanismo de ação do veneno ainda são limitados, ao julgar as relações evolutivas das espécies do gênero, bem como a diversidade ecológica das espécies¹, devido aos hábitos fossoriais ou semifossoriais destes animais, o que dificulta a obtenção do material para estudo, considerando também as dificuldades de se manter os animais em cativeiro por conta de sua dieta especializada, além do pouco rendimento do veneno e das dificuldades em sua extração^{4,5}.

Alguns estudos comparativos da composição do veneno de cobras-corais avaliam o nível de atividade enzimática comparando diferentes espécies de serpentes^{4,6}. Esses estudos demonstram que apesar de existir uma similaridade no perfil proteico dos venenos, o

veneno de *M. surinamensis* difere significativamente do veneno das demais espécies^{4,7}, certamente pela biologia desta espécie ser diferente e pelas características de hábitos aquáticos⁴. Compreender a composição do veneno destes animais é essencial, não só para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, mas, ao mesmo tempo, para a pesquisa básica sobre a evolução do veneno e sua bioatividade⁸.

A fim de avaliar se a composição do veneno é individualizada ou compartilhada com outros tecidos secretores, é necessário obter uma maior compreensão dos genes que são expressos nos diferentes tecidos. O conhecimento sobre genes que estão expressos no veneno é crucial para entender o processo de desenvolvimento do animal⁹. Neste tipo de análise, é fundamental que o RNA mensageiro (mRNA), derivado de um gene de interesse, esteja intacto no material biológico coletado¹⁰, e para conseguir isolar o mRNA da glândula de veneno é necessário fazer o sacrifício da serpente⁸.

A preservação da integridade do RNA durante qualquer manipulação ou metodologia aplicada ao isolamento é arriscada. Devido às suas características estruturais, o RNA é mais sensível à ruptura do que o DNA, quando em contato com as RNases, enzimas ubíquas que degradam o RNA¹¹. Sendo assim, cuidados especiais e precauções são necessários para o isolamento do RNA integro¹². Para isso são utilizados desnaturantes fortes para inibir as RNases endógenas¹³, como também são tomados todos os cuidados para uma boa técnica de laboratório livre de RNases¹⁴.

A extração de RNA com o TRI Reagent® (SIGMA-ALDRICH CORP, ST. LOUIS, MO, EUA) é uma das formas mais simples e mais usadas para extrair o RNA a partir de células ou tecidos. Uma metodologia relativamente recente que remove eficientemente grandes moléculas de DNA, porém não remove o DNA de plasmídeos ou fragmentos de DNA por completo, que por sua vez podem ser problemáticos para reações que dependem de um alto rendimento de RNA, como a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). No entanto, quando utilizados de forma adequada, o rendimento do RNA

é significativo. Posterior à purificação, é necessário avaliar a quantidade, bem como a qualidade do RNA obtido e estas etapas são essenciais para uma análise quantitativa comparativa¹⁵.

Estudos de transcriptomas realizados a partir das glândulas de venenos de serpentes são utilizados como uma importante ferramenta para a análise do perfil das toxinas^{16,17}. A vantagem dessa técnica é permitir uma análise vasta por meio de uma biblioteca de cDNAs utilizando uma pequena quantidade de RNA, requer pouco material biológico e consequentemente minimiza a necessidade de sacrifícios dos animais¹⁷. Para tal finalidade, a extração de RNA total de glândulas de veneno é essencial para analisar o perfil genético das toxinas produzidas por esses animais, tanto quanto a obtenção do material molecular com boa qualidade é uma etapa fundamental para gerar dados seguros e de alto valor científico.

Considerando esses aspectos, nosso estudo introduziu adaptações no processo de extração de RNA pelo método de Trizol, resultando em dois protocolos modificados, com o objetivo de padronizar a metodologia utilizada para a extração de RNA total em glândulas de veneno de *Micrurus surinamensis*, destacando a importância de cada etapa na obtenção de material genético com alta integridade e em quantidades satisfatórias.

Material e Métodos

1. Coleta das glândulas de veneno

A amostra incluiu 18 fragmentos de glândulas de veneno obtidas a partir de sete indivíduos da espécie *Micrurus surinamensis* devidamente identificadas, provenientes de levantamentos faunísticos (MZUSP/CTP/UHEBM 001 a 018, Coleção de Tecidos do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – Provisório) na Usina Hidrelétrica de Belo Monte (UHEBM) em Altamira, PA, Brasil. As amostras são provenientes de espécimes coletados durante o enchimento do reservatório dessa usina. Os animais tiveram o veneno extraído e acondicionado, após a recuperação de até cinco dias e foram sacrificados com uma dose letal de anestésico para a retirada das glândulas. Todas as atividades relacionadas com a coleta e manejo das serpentes foram devidamente autorizados (Licença 647/2015 - DILIC/IBAMA).

As glândulas extraídas por dissecação, foram fragmentadas e transferidas para criotubos contendo RNAlater® (1 mL para até 100 mg de tecido) e mantidas a 37°C por no máximo 3 dias ou a 25°C por uma semana, até que fosse possível o congelamento em freezer – 80°C.

2. Extração de RNA de glândulas de veneno utilizando trizol® (sigma)

Para a extração de RNA das glândulas de veneno de *M. surinamensis*, foram adotados dois tipos de protocolo (Figura 1). O reagente utilizado para os dois protocolos foi o TRI Reagent®. As amostras foram pesadas, transferidas para microtubos de 2 mL e identificadas de acordo com o número de registro do espécime capturado.

De acordo com o protocolo 1, para cada 50 a 100 mg de tecido, 1mL do reagente TRI Reagent® foi adicionado a cada amostra e os tubos incubados em gelo por 10 minutos. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados utilizando o homogeneizador Tissue Ruptor (QIAGEN N. V., HILDEN, ALEMANHA). A cada homogeneizado, foi adicionado clorofórmio, na proporção de 0,2 mL para cada 1 mL de TRI Reagent®. Cada mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos e incubada por 15 minutos em gelo, e em seguida centrifugadas em 12.000 rpm, 4° C, por 15 minutos. Cada amostra foi separada em três fases, sendo uma inferior, de coloração rosa contendo fenol clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa superior incolor. A fase aquosa superior foi transferida cuidadosamente para um novo microtubo, evitando a contaminação com a interfase e a fase fenólica. Para a precipitação do RNA, 0,5 mL de Isopropanol 100% gelado foi adicionado a cada tubo. As amostras foram agitadas por inversão, incubadas por 10 minutos em gelo e centrifugadas em 12.000 rpm, 4° C, por 10 minutos. O sobrenadante de cada tubo foi desprezado por inversão, com cuidado, e lavado com 1 mL de Etanol 75% gelado, sendo posteriormente centrifugado em 7.500 rpm, 4° C, por 5 minutos. O sobrenadante foi então desprezado e o excesso de álcool retirado da parede do tubo por capilaridade. O pellet resultante foi então suspenso em água milliQ (tratada com dietilpirocarbonato - DEPC) livre de RNases.

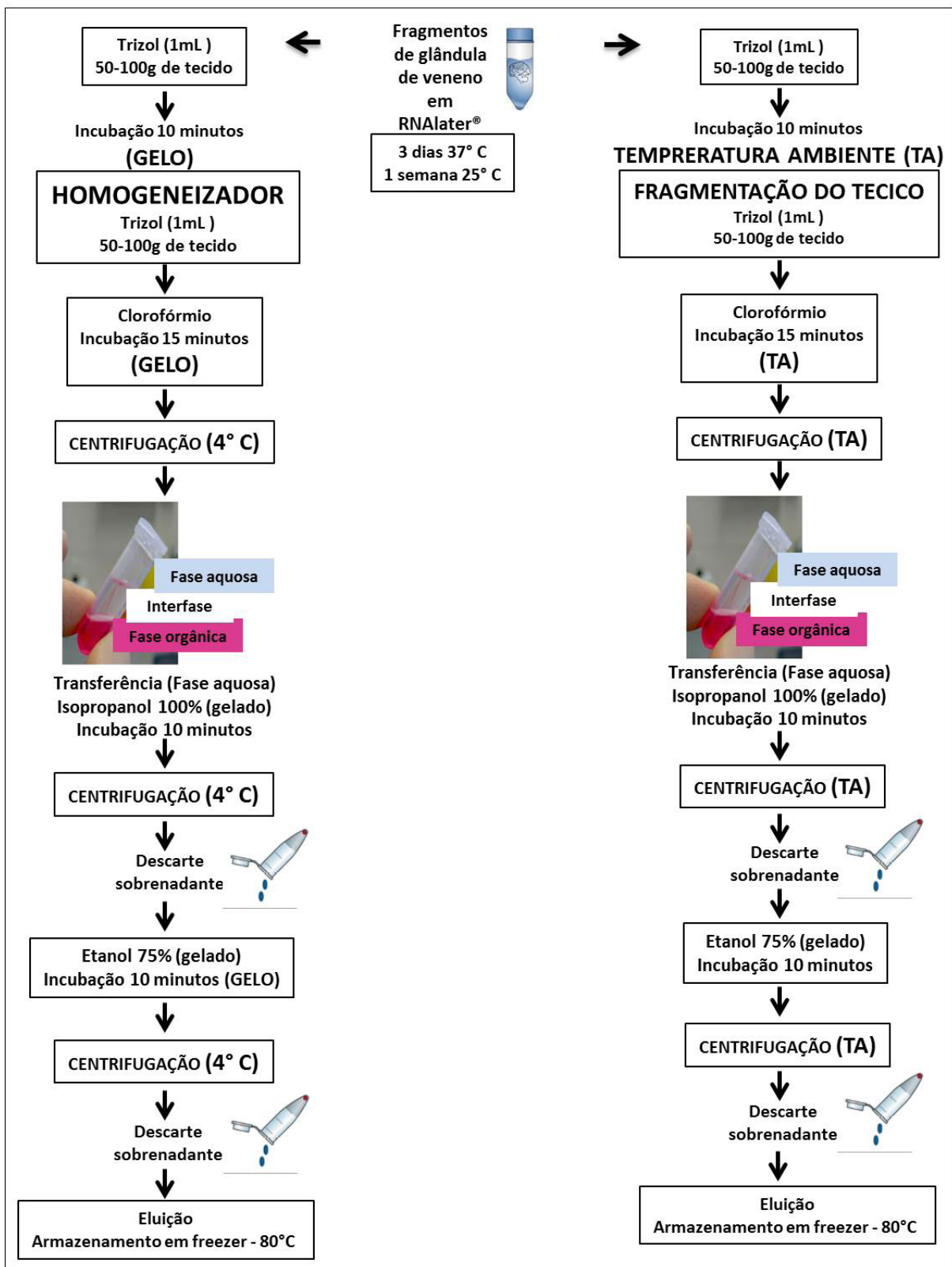


Figura 1. Fluxograma da metodologia adotada para os dois tipos de protocolos. Lado esquerdo protocolo 1 e lado direito da figura, protocolo 2

No protocolo 2 as especificações do método original proposto foram mantidas, com exceção ao uso do homogeneizador proposto pela fabricante do reagente, sendo que para cada 50 a 100 mg de tecido, 1 mL do reagente TRI Reagent® foi adicionado aos

fragmentos de tecido, que permaneceram incubados por 5 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado o clorofórmio na proporção de 0,2 mL para cada 1 mL de TRI Reagent®, e os tubos agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados

por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em 12.000 rpm, 4° C, por 15 minutos. Cada amostra foi separada em três fases, uma inferior contendo fenol clorofórmio, de coloração rosa, uma interfase e uma fase aquosa superior incolor. A fase aquosa superior foi transferida cuidadosamente para um novo microtubo, evitando a contaminação com a interfase e a fase fenólica. Para a precipitação do RNA, foi adicionado 0,5 mL de Isopropanol 100% gelado para cada amostra. Os tubos foram agitados por inversão e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugado em 12.000 rpm, 4° C, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão, com cuidado, e lavado com 1mL de Etanol 75% gelado, sendo posteriormente centrifugado a 7.500 rpm, 4° C, por 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, foi retirado o excesso de álcool da parede do tubo por capilaridade e o pellet resultante foi suspenso em água milliQ (tratada com DEPC) livre de RNases.

3. Análise quantitativa e qualitativa do RNA isolado

As amostras de RNA obtidas foram analisadas quantitativamente por espectrofotômetro NanoDrop® (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., WALTHAM, MA, EUA), de acordo com recomendações de Sambrook, J. e Russell, D. (2001), a razão da absorvância A260nm/A280nm foi avaliada para cada amostra, considerando o padrão de qualidade entre 1,8 a 2,0. Para análise qualitativa das amostras, foi realizada a separação eletroforética em gel de agarose 0,8% não desnaturante, corado com Brometo de Etídio (SIGMA-ALDRICH CORP, ST. LOUIS, MO, EUA) na concentração de 10 mg/ml em água destilada. Os dados foram tabulados e analisados por estatística descritiva e comparativa utilizando o teste T, pelo aplicativo Graphpad Prism 4.02 (GRAPHPAD SOFTWARE, INC., SAN DIEGO, CA, EUA), considerando significativo quando a hipótese α for $\leq 0,05$.

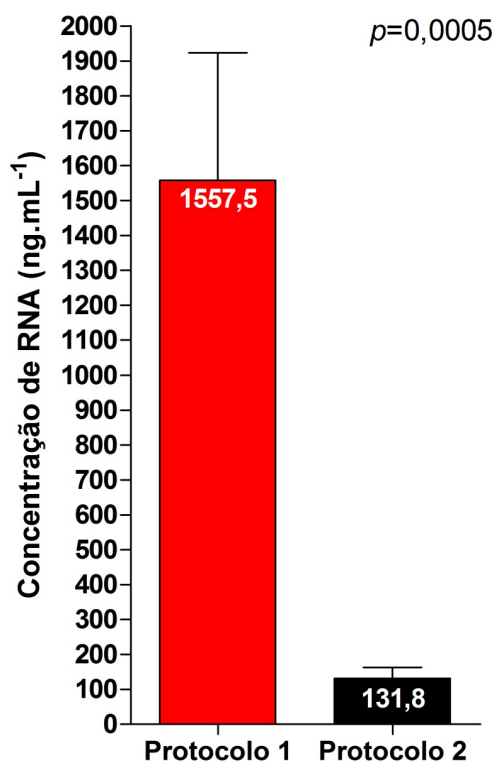


Figura 2. Comparação das concentrações de RNA obtidas pelo protocolo 1 (vermelho) e protocolo 2 (preto)

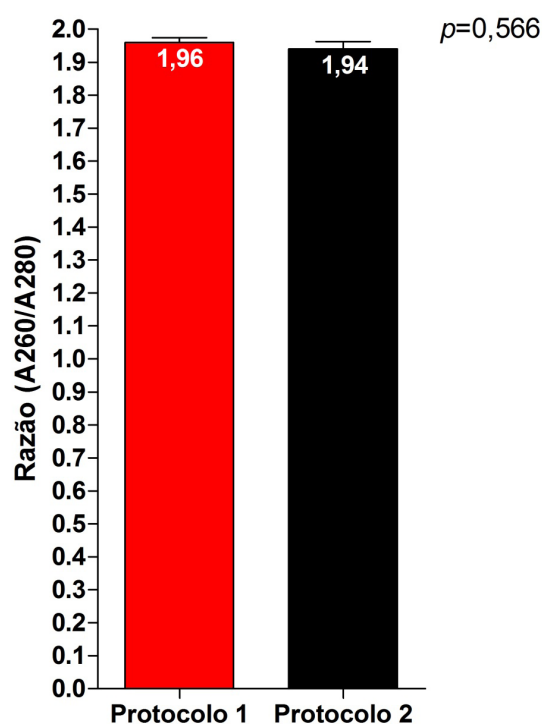


Figura 3. Comparação das razões de absorvância A260nm/A280nm das amostras de RNA obtidas pelo protocolo 1 (vermelho) e protocolo 2 (preto)

Resultados

A integridade das amostras de RNA obtidas pelos dois protocolos foi considerada satisfatória (Tabelas 1 e 2), mas as concentrações foram significativa-

mente diferentes (Figura 2). A qualidade das amostras de RNAs seguiu os padrões propostos por Sambrook e Russell¹⁸, com razões de absorvância A260nm/A280nm variando de 1,8 a 2,0 (Figura 3).

Tabela 1. Características das amostras de RNA extraídas pelo protocolo 1

Amostra	Espécie	Tecido	Rendimento de RNA (ng/μl)	260/280*
1	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	579,9	1,92
2	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	173,8	1,94
3	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	3526,7	1,94
4	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	1361,2	2,01
5	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	1910,4	2,01
6	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	2026,8	1,92
7	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	1850,3	1,98
8	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	1030,8	1,94

Legenda: 260/280 Razões de absorvância A260nm/A280nm.

Tabela 2. Características das amostras de RNA extraídas pelo protocolo 2

Amostra	Espécie	Tecido	Rendimento de RNA (ng/μl)	de	260/280*
1	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	101,1		1,92
2	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	102,3		2,02
3	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	119,6		1,94
4	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	23,5		1,79
5	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	62,7		1,98
6	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	140,2		1,86
7	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	55,7		1,98
8	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	108,2		1,92
9	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	248,2		1,99
10	<i>M. surinamensis</i>	Glândula	356,9		2,01

Legenda: 260/280 Razões de absorvância A260nm/A280nm.

Comparando a mesma quantidade de tecido de glândula de veneno, as amostras submetidas à extração de RNA por meio do protocolo 1 resultaram em quantidade média significativamente maior do que as obtidas pelo protocolo 2, com médias de 1560ng (\pm 366ng) e 132ng (\pm 31,5ng) de RNA, respectivamente ($p = 0,0005$) (Figura 2). É importante notar que, apesar das modificações introduzidas no protocolo, a pureza do RNA obtido a partir dos dois grupos foi equivalente,

com razões A260nm/A280nm médias variando de 1,94 ($+0,022$) a 1,96 ($+0,013$), respectivamente ($p = 0,55$) (Figura 3).

Discussão

O RNA é uma molécula especialmente instável e sensível à hidrólise, durante a coleta, manipulação e extração a partir de tecidos biológicos. Essas caracte-

terísticas dificultam a análise do padrão de expressão gênica dos diferentes tecidos¹⁹. A fim de garantir o sucesso de resultados biologicamente relevantes, devem ser tomadas medidas para minimizar a contaminação do material usado na manipulação com nucleases que podem ser produzidas por bactérias do ar ou pelo próprio técnico que manipula as amostras. Mesmo em quantidades mínimas, as RNases podem resultar em rendimentos muito baixos para as reações que utilizam RNA como moldes, como as reações de transcrição reversa, usadas na detecção e quantificação de transcritos e construção de bibliotecas de cDNA^{20,21}.

Para a coleta e preparo das amostras, os espécimes devem ser manipulados em local isolado, com proteção e sem grande fluxo de pessoas, vez que se tratam de ambientes com alta presença de nucleases, fontes primárias de RNases por microorganismos, ou seja, bactérias e fungos. O espaço de trabalho, como bancadas e equipamentos utilizados para a coleta, devem ser livres de contaminantes, sempre realizando sua higienização com produtos que degradam as RNases, como por exemplo o RNaseZap® (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., WALTHAM, MA, EUA), que é um excelente descontaminante a seco, capaz de remover eficientemente a contaminação por RNase de superfícies de vidro e plástico^{22,23}.

O uso de máscaras, luvas e jaleco ao manipular as amostras é obrigatório para prevenir contaminações²¹, vez que as RNases podem estar presentes em vários locais, como poeira, vidrarias tratadas incorretamente, pipetas contaminadas, corpo humano e líquidos biológicos, bactérias, mofo ou qualquer outro utensílio que entrou em contato com uma superfície contaminada. Muitas RNases são resistentes a agentes quelantes de metais e podem sobreviver à autoclavagem ou à ebulição. Detalhes como esses devem ser observados para evitar fontes potenciais de RNase^{11,23}.

Encontrar o método mais adequado para a lise de células ou tecidos, específicos de amostras biológicas é importante para maximizar o rendimento e a qualidade das preparações de RNA. Porém, quando um ambiente com baixas temperaturas não estiver disponível para o armazenamento e transporte das amostras, uma solução de estabilização das moléculas de RNA como RNAlater® é essencial^{19,21,23}.

A solução de estabilização de RNA, conhecida como RNAlater®, de acordo com o fabricante, é uma

solução estabilizadora de células que torna plausível o armazenamento de tecidos frescos, permeando rapidamente a maioria dos tecidos para estabilizar e proteger o RNA, em casos que não seja possível processar ou congelar imediatamente as amostras. Tais soluções estabilizadoras proporcionam mais flexibilidade e tempo para a purificação de RNA, retardando o processo de degradação e permitindo assim que o pesquisador adie o isolamento do RNA por dias, semanas ou mesmo meses após a coleta dos tecidos, sem sacrificar a integridade do RNA^{10,23,20}. Compatível com a maioria dos procedimentos de isolamento de RNA, os tecidos armazenados em RNA later podem ser simplesmente transportados e processados por homogeneização em tampão de lise específico²⁰.

O DEPC é um produto químico com a capacidade de inativar enzimas RNases sendo sensível à humidade e pH. Decompõe-se a 155° C, por etanol e dióxido de carbono em solução aquosa e também é sensível à amônia, que provoca uma decomposição gerando o uretano, um possível carcinógeno^{24,25}.

Para que a extração e o armazenamento de RNA sejam possíveis, é necessária exclusividade para todos os insumos e equipamentos utilizados para a extração, além de que o material utilizado deve ser preparado com o intuito de eliminar contaminantes e RNases presentes²¹. Para isso uma solução de DEPC a 0,1%, durante 1 hora, é utilizada para inativar as RNases, sendo considerado suficiente, 15 minutos em autoclave para sua inativação. Para a água utilizada nas extrações é necessário adicionar 0,2% de DEPC, agitar durante 30 minutos e em seguida, aquecer até a ebulição enquanto se agita até evaporar 1/4 do volume e autoclavar durante 20 min. A água tratada com DEPC precisa ser preparada em uma capela com exaustão adequada¹⁰.

Os métodos de extração orgânica são considerados o padrão ouro para a preparação de RNA. Durante este processo, a amostra é homogeneizada numa solução contendo fenol e em seguida centrifugada^{20,26}. O reagente trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianeto de guanidina que rompe as células e dissolve os componentes celulares. É usado para dissolver rapidamente células ou tecidos para a preparação do RNA²⁰. Para todas as aplicações envolvendo pellet ou tecidos celulares, a solução de trizol é utilizada numa proporção de 10:1 volume / volume de material a ser extraído. As vantagens de usar trizol são que os rea-

gentes são prontos para uso e o procedimento é rápido e direto, promovendo a desnaturação rápida de nucleases e estabilização do RNA. As desvantagens incluem a possível contaminação com DNA e as concentrações de sal excepcionalmente elevadas na fase aquosa, tornando um processamento laborioso e manualmente intensivo^{11,20}.

As amostras em TRI Reagent® incubadas em gelo durante o procedimento do protocolo 1 (Tabela 1) permitem uma alta capacidade de lise das células, desnaturação de proteínas, degradação de RNases, além de manter a integridade do RNA²⁷. A utilização do homogeneizador proporciona economia de tempo e acelera o processo de dissociação dos tecidos, principalmente de amostras mais resistentes. A homogeneização aumenta a capacidade de lise, o que torna esta etapa primordial para uma purificação reprodutível de RNA de alta qualidade^{19,28}.

O uso do clorofórmio seguido de centrifugação auxilia na desnaturação de proteínas e separa o fenol residual, que em contato com a solução, forma três fases, sendo uma fase orgânica e rósea (contendo proteínas e lipídeos celulares), uma interfase (contendo DNA de alto peso molecular) e uma fase superior aquosa e clara contendo o RNA total^{11,20}.

Como o RNA é o alvo de interesse, na transferência da fase aquosa para um novo tubo livre de contaminação, é importante evitar a contaminação com a interfase e a fase fenólica. Para estar absolutamente seguro e evitar a contaminação é recomendável deixar uma pequena quantidade de fase aquosa para trás, sendo que o volume mínimo de extração deve ser de 200 µL para minimizar a perda¹¹. Se necessário, o tubo original pode ser armazenado para posteriores extrações de DNA e proteínas, segundo o fabricante do reagente TRI Reagent®.

A precipitação do RNA ocorre devido às trocas de polaridades quando em contato com o sal da solução utilizada na extração. Quando é adicionado o isopropanol, a molécula torna-se insolúvel, formando o pellet no fundo do tubo após a centrifugação, sendo assim quanto mais gelado, maior melhor a insolubilidade^{11,20}.

Na etapa de lavagem o etanol faz a remoção de contaminantes que ainda se encontram presentes. Se necessário, o material pode ser lavado mais de uma vez para a retirada de impurezas que venham interferir nos resultados. Se os procedimentos forem seguidos como

descritos acima, o RNA será puro e intacto. Para uso imediato, recomenda-se que o RNA seja suspenso em água isenta de RNase ou em tampão Tris-EDTA (TE). O RNA pode então ser dividido em alíquotas para concentrações apropriadas e armazenado em freezer – 80°C para análise posterior¹¹.

A quantificação de ácidos nucleicos é essencial em muitas pesquisas e o padrão de qualidade do RNA purificado é variável em cada extração e durante o armazenamento por longo prazo²⁹. No entanto, a determinação exata das concentrações de RNA pode ser difícil, principalmente quando a pureza da amostra é incerta. Em muitos casos, a forma mais rápida e precisa para determinar a concentração de ácidos nucleicos e proteínas é a medida de absorvância por espectrofotometria. A quantidade de luz absorvida por uma amostra é diretamente proporcional à concentração de proteína ou ácido nucleico na amostra³⁰. Quanto à pureza do RNA extraído, cada amostra é avaliada de acordo com razões de absorvância A260nm/A280nm, sendo aceito para o RNA um intervalo de 1,8 a 2,0. Se a proporção for sensivelmente mais baixa em qualquer dos casos, pode indicar a presença de contaminantes de proteína, fenol ou outras substâncias que absorvem fortemente ou perto de 280nm^{21,30,31}.

É possível verificar a qualidade do RNA por análise eletroforética em gel de agarose em conjunto com marcadores 28S rRNA e 18S rRNA universais¹⁸ e a coloração com brometo de etídio. A presença de bandas de RNA ribossomal nítidas e brilhantes (28 S e 18 S) indicam boa qualidade e integridade do RNA extraído^{21,32}.

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que o uso do homogeneizador no protocolo de extração de RNA permitiu uma melhor dissociação dos tecidos, aumentando a capacidade de lise celular e facilitando a extração de RNA total. O tratamento para evitar a degradação do RNA pode influenciar diretamente na qualidade e concentração das amostras resultantes durante o processo de extração. O uso de tampões de extração combinados com reagentes desnaturantes, isotiocianato de guanidina e fenol (TRI Reagent®), garante a integridade do RNA após a extração do material¹⁸. Nossos resultados mostram que a manutenção das amostras de tecido em baixas temperaturas, especialmente durante o processo de extração de RNA, é um fator importante para inibir as atividades de RNases e permitir a extração de moléculas de RNA íntegras.

De acordo com as alterações realizadas nos dois protocolos, foi possível isolar o RNA total das amostras e padronizar os procedimentos, evidenciando a importância de cada etapa, para a obtenção do material genético e garantindo sua integridade.

Comparando a mesma quantidade de tecido das glândulas de veneno, as amostras submetidas à extração pelo protocolo 1 apresentaram uma quantidade média de RNA superior àquela obtida pelo protocolo 2, com médias de 1560 ng (± 366 ng) e 132ng ($\pm 31,5$ ng) de RNA, respectivamente ($p=0,0005$).

É importante ressaltar que, apesar das modificações introduzidas no protocolo modificado, as

razões que traduzem a pureza do produto extraído nos dois grupos foram equivalentes, com valores de 1,94 ($\pm 0,022$ ng) e 1,96 ($\pm 0,013$ ng), respectivamente ($p=0,55$).

Conclui-se que o protocolo 1, que utiliza a homogeneização das amostras de tecido, deve permitir maior contato do Trizol com o tecido, garantindo melhor desnaturação das proteínas teciduais, enquanto as baixas temperaturas devem interromper a atividade enzimática das RNases, permitindo a obtenção de maiores concentrações de RNA e conservando a integridade e qualidade do material extraído.

Referências

1. Silva Jr, N. J., Pires, M. G. & Feitosa, D. T. 2016. Diversidade das cobras-coraís do Brasil. *In: As cobras coraís do Brasil: biologia, taxonomia, venenos e envenenamentos*. Pp. 78-167. PUC Goiás, Goiânia. 416 p.
2. Cecchini A. L., Marcussi S., Silveira L. B., Borja-Oliveira C. R., Rodrigues-Simioni L., Amara S. 2005. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (coral) snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140(1):125-134.
3. Rey-Suárez P., Núñez V., Gutiérrez J. M. & Lomonte B. 2011. Proteomic and biological characterization of the venom of the redtail coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *Journal of Proteomics* 75(2):655-667.
4. Aird S. D. & Silva Jr. N. J. 1991. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snakes (*Micrurus*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99(2):287-294.
5. Almeida, P. C. R., Prudente, A. L. C., Curcio, F. F. & Rodrigues, M. T. U. 2016. Biologia e história natural das cobras-coraís. *In: As cobras coraís do Brasil: biologia, taxonomia, venenos e envenenamentos*. Pp. 168-215. PUC Goiás, Goiânia. 416 p.
6. Silva Jr. N. J., Griffin P. R. & Aird S. D. 1991. Comparative chromatography of Brazilian coral snakes (*Micrurus*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Comparative Biochemistry* 100(1):117-126.
7. Aird, S. & Silva Jr, N. J. 2016. Química dos venenos de cobras-coraís. *In: As cobras coraís do Brasil: biologia, taxonomia, venenos e envenenamentos*. Pp. 242-301. PUC Goiás, Goiânia. 416 p.
8. Whiteley G., Logan R. A., Leung K. Y., Newberry F. J., Rowley P. D., Dunbar J. P. 2016. Stabilising the Integrity of Snake Venom mRNA Stored under Tropical Field Conditions Expands Research Horizons. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(6):1-17.
9. Junqueira-De-Azevedo I. L. M., Bastos C. M. V., Lee Ho P., Luna M. S., Yamanouye N. & Casewell N. R. 2015. Venom-Related Transcripts from Bothrops Jararaca Tissues Provide Novel Molecular Insights into the Production and Evolution of Snake Venom. *Molecular Biology and Evolution* 32(3): 754-766.
10. Ramalho A. S., Beck S., Farinha C. M., Clarke L. A., Heda G. D., Steiner B. 2004. Methods for RNA extraction, cDNA preparation and analysis of CFTR transcripts. *Journal of Cystic Fibrosis* 3(2):11-15.
11. Nilsen T. W. 2013. The Fundamentals of RNA Purification. *Cold Spring Harb Protoc* 7:618-624.
12. Buckingham L. & Flaws M. L. 2007. *Molecular diagnostics: fundamentals, methods, & clinical applications*. 2 ed. F.A. Davis Company, Philadelphia. 576 p.
13. Doyle K. (Org). 1996. *The source of discovery: protocols and applications guide*. 3 ed. Promega, Madison. 404 p.
14. Tan S. C. & Yiap B. C. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009(2009):ID 574398, 10p.

15. Rio D. C., Ares M. Jr., Hannon G. J. & Nilsen T. W. 2010. Determining the Yield and Quality of Purified RNA. *Cold Spring Harbor Protocols* 2010(6):pdb.top82
16. Margres M. J., Aronow K., Loyacano J. & Rokyta D. R. 2013. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveal high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics* 14(531):18.
17. Leão L. I., Ho P. L. & Junqueira-De-Azevedo I. L. M. 2009. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics* 10:12.
18. Sambrook J. & Russell D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2344p.
19. Biocompare. 2012. *Tools for optimal RNA prep: from homogenization and cell lysis to extraction and purification*. Acesso em 09/12/2016. Disponível em <http://www.biocompare.com/editorial-articles/41847-tools-for-optimal-rna-prep-from-homogenization-and-cell-lysis-to-extraction-and-purification/>.
20. Thermo Fisher Scientific Inc. 2014. *The basics: RNA isolation*. Acesso em 09/12/2016. Disponível em <https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html>.
21. Wong P. B., Wiley E. O., Johnson W. E., Ryder O. A., O'brien S. J., Haussler D. 2012. Tissue Sampling Methods and Standards for Vertebrate Genomics. *GigaScience* 1(8):1-12.
22. Ambion Inc. 2008. *RNaseZap® Solution: RNase decontamination solution*. Acesso em 12/02/2017. Disponível em https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_056889.pdf.
23. Life Technologies. 2012. *Working with RNA: the basics avoiding, detecting, and inhibiting RNase*. Acesso em: 09/12/2016. Disponível em <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/files/dna-rna-purification-analysis/pdfs.par.91610.file.dat/co24813%20-%20rna%20basics1-final-high.pdf>.
24. Fennema O. R., Damodaran S. & Parkin K. L. 2010. *Química de alimentos de Fennema*. 4 ed. Artmed, Porto Alegre. 900 p.
25. SIGMA-ALDRICH, INC. 1999. *Diethyl pyrocarbonate: product information*. Acesso em 09/10/2016. Disponível em http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d5758pis.pdf.
26. Chomczynski P. & Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 1(2):581-585.
27. Luz A. C., Pretti I. R. & Batituc M. C. P. 2016. Comparação de métodos para extração de RNA de folhas de *Passiflora edulis* SIMS. *Revista Brasileira de Fruticultura* 38(1):226-232.
28. Qiagen. 2006. *TissueRuptor user manual*. Acesso em 11/02/2017. Disponível em <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=f053098a-bbae-46f9-9012-d1c65b2f35d2&lang=en>.
29. Bustin S. A., Benes V., Nolan T. & Pfaffl M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR— a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34(3):597-601.
30. Teare J. M., Islam R., Flanagan R., Gallagher S., Davies M. G. & Grabau C. 1997. Measurement of Nucleic Acid Concentrations Using the DyNA Quant™ and the GeneQuant™. *BioTechniques* 22:1170-1174.
31. Thermo Fisher Scientific Inc. 2009. *Nanodrop 2000/2000c spectrophotometer v1.0 user manual*. Acesso em 09/12/2016. Disponível em http://rai.unam.mx/manuales/lgen_ND2000_user-manual.pdf.
32. Choudhary S. B., Kumar M., Chowdhury I., Singh R. K., Pandey S. P., Sharma H. K. 2016. An Efficient and Cost Effective Method of RNA Extraction from Mucilage, Phenol and Secondary Metabolite Rich Bark Tissue of tossa Jute (*C. Olitorius* L.) Actively Developing Phloem Fiber. *3 Biotech* 6(1):100.