

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 012
Próxima revisão:		Versão: 01
01/07/2019		Página 1

EXTRAÇÃO DE MICRORNAS CIRCULANTES (por kit comercial)

Introdução

(Retirado do texto de Dissertação de Mestrado de Getúlio Pereira de Oliveira Junior, Brasília, 2012).

Os microRNAs (miRNAs) pertencem a uma classe de pequenos RNAs não-codificadores de filamento único, que contém aproximadamente 22 nucleotídeos (BARTEL, 2004). MiRNAs estão envolvidos na regulação da expressão gênica pós-transcricional por meio da ligação à região 3' não traduzida (UTR), sequência codificadora ou 5'UTR de RNAs mensageiros (mRNA) alvos e conduzindo à inibição da transcrição ou degradação do mRNA em animais, plantas e vírus (ALMEIDA et al., 2011; DAVIS-DUSENBERY & HATA, 2010). Nos seres humanos, prevê-se que a expressão de aproximadamente 50% de genes codificadores de proteínas são regulados por miRNAs (ZHOU et al., 2012).

Os miRNAs controlam genes envolvidos em vários processos biológicos, entre eles, apoptose, proliferação, diferenciação e metástase (ALMEIDA et al., 2011).

Um dos primeiros estudos que mediram os níveis de miRNA no soro demonstrou que os níveis de miR-21 no soro estão associados com sobrevida livre de recidiva em pacientes com linfoma difuso de grandes células B, assim, miR-21 poderia ter potencial como um biomarcador de diagnóstico para esta doença (LAWRIE et al., 2008).

Os miRNAs circulantes, presentes no soro, plasma e outros fluidos corporais podem ser potencialmente utilizados como biomarcadores não-

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 012
Próxima revisão:		Versão: 01
01/07/2019		Página 2

invasivos para diversas doenças humanas, uma vez que eles podem suportar ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento (MITCHELL et al., 2008). Alguns miRNAs específicos de tecidos com câncer são capazes de ser liberados na circulação e esses miRNAs circulantes presentes no soro ou plasma podem ser usados como novos biomarcadores para diversos tipos de câncer. No entanto, um método para medir a quantidade absoluta de miRNA no sangue ainda não está bem estabelecido, devido a falta de controle estável de RNAs neste tecido, especialmente sob condições de doença (CHENG et al., 2010).

A notável estabilidade de miRNAs em amostras de plasma sanguíneo levantou questões importantes sobre o mecanismo pelo qual os miRNAs são protegidos da atividade de RNases endógenas. Resultados preliminares mostraram que miRNAs têm uma incomum alta estabilidade em tecidos fixados em formalina, plasma e soro. Esta estabilidade pode ser explicada pela associação de miRNA à lipoproteínas de alta densidade (HDL), proteção por meio de outras moléculas (RNA- complexo de proteínas), modificações nos miRNAs que os tornam resistentes a atividade de RNases endógenas ou associação dos miRNAs à microvesículas, tais como exossomas (MITCHELL et al., 2008).

Análise da expressão de miRNAs circulantes por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Para a quantificação dos miRNAs foi utilizado o método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Este método é um modelo matemático que calcula as alterações na expressão de genes como diferenças relativas

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 012
Próxima revisão:		Versão: 01
01/07/2019		Página 3

entre uma amostra experimental e calibrador. A normalização dos dados utilizou genes de referência análogos em humanos de 3 miRNAs de *C. elegans* (cel-miR-39, -54, -238), conforme descrito anteriormente (MITCHELL et al., 2008). Pelo fato de serem análogos em humanos, a quantificação destes miRNAs no plasma deve-se apenas à quantidade inserida durante a extração. Este método de quantificação relativa é o mais aceito em amostras de plasma, já que não foram descritos genes de referência endógena de miRNA eficientes nesta amostra biológica. Os cálculos de quantificação relativa foram feitos conforme descrito por Kroh e colaboradores (2010) onde foi calculada a mediana de todas as médias dos genes de referência de *C. elegans*, considerando todas as amostras. Em seguida, o fator de normalização foi calculado pela subtração da média dos Ct de miRNA sintético de *C. elegans* da amostra de interesse pelo valor da mediana obtido no passo anterior. O fator de normalização foi adicionado ao valor da média do Ct obtido de cada amostra e foi chamado de Ct normalizado. O delta Ct (ΔCt) foi calculado subtraindo o valor do Ct normalizado pelo valor da mediana dos genes de referência. O delta deltaCt ($\Delta\Delta Ct$) foi calculado pela subtração de dois deltas Ct que se queira analisar, de modo que no grupo controle, é calculado o valor de média dos ΔCt s das amostras deste grupo, fixando-se esse valor (amostra calibradora) para ser subtraído do ΔCt de cada amostra alvo do grupo a ser estudado: ΔCt amostra grupo de estudo – média dos ΔCt s amostras grupo controle. Finalmente, a expressão relativa é obtida pelo algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Referências

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 012
Próxima revisão:		Versão: 01
01/07/2019		Página 4

Almeida ML, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2011.

Bartel, DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 2004; 116(2):281-297,

Cheng Y, Tan N, Yang J, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. Clinical science. 2010; 119(2):87-95.

Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. Journal of biochemistry, v. 148, n. 4, p. 381-392, 2010.

Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). Methods. 2010; 50(4):298-301.

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. British journal of haematology. 2008; 141(5):672-5.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(30):10513-8.

Diluição dos Oligonucleotídeos de RNA (Sigma, EUA) **miRNAs de *Caenorhabditis elegans***

1 – cel-miR-39 (96,3nmol)

2 – cel-miR54 (82,9nmol)

3 – cel-miR-238 (88,5nmol)

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 012
		Versão: 01
		Página 5

- Os 3 oligos foram ressuspensos em água ultrapura (MilliQ) nos seguintes volumes, respectivamente: 963uL (39), 829uL (54) e 885uL (238). No final, estavam a uma concentração de 100uM ou 100pmol.
- A diluição dos oligos que serão utilizados para a normalização da variação das amostras durante a extração e controle da reação de qRT-PCR, foi seguida conforme descrito por Mitchell e col. (2008) e por Kroh e col. (2010): é feito um “pool” contendo 5uL de cada um dos 3 oligos numa concentração final de 5fmol/uL.
 - Se 1pmol é 10.000fmol, tem-se 100.000fmol de cada oligo (tubo mãe). Quer-se uma [] final de 5fmol, então:
 - TUBO I = 20pmol (200uL tubo mãe + 800uL água MilliQ)
 - TUBO II = 0,25uL TUBO I + 999,75uL água MilliQ = [5]fmol/uL

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 012
		Versão: 01
		Página 6

Procedimento: Kit miRNeasy Serum / Plasma (Qiagen, EUA)

- **Cuidado ao manusear o Qiazol. O Qiazol (Qiagen, EUA) contém fenol e tiocianato de guanidina. Consultar a tabela FISPQ do produto antes de iniciar o procedimento.**
- **As amostras de soro ou plasma devem ser retiradas previamente do freezer -80°C para o freezer -20°C, no dia anterior ao procedimento.**

- ✓ colocar luvas, máscara e óculos de proteção.
- ✓ limpar a bancada com hipoclorito, álcool 70% e por fim, RNase away.
- ✓ pegar as pipetas específicas para o isolamento de RNA (limpá-las com uma gaze embebida em álcool 70% e deixá-las por 15 minutos no banho de UV no fluxo).
- ✓ pegar todo o material plástico a ser utilizado, estéril e autoclavado: ponteiros com filtro (específicas para RNA), microtubos autoclavados; gaze e reagentes também autoclavados ou específicos para RNA (consulte a sessão Tratamento DNase/RNase-free com água DEPC).
- ✓ Retirar as amostras de soro ou plasma do freezer -20°C para irem se estabilizando a temperatura ambiente.
- ✓ Acrescentar os volumes correspondentes de etanol absoluto, conforme descrito nos próprios frascos das soluções (“RWT” e “RPE”) a serem usadas do Kit.

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 012
		Versão: 01
		Página 7

Fase de Separação

1. A extração de RNA total, incluindo a extração de miRNAs, é iniciada adicionando-se 1mL de Qiazol (Qiagen, EUA) para 200uL de plasma ou soro de cada amostra (5 x o volume). As amostras são homogeneizadas (por vórtex ou por inversão) e devem ficar sob a bancada por 5 minutos.
2. Em seguida foram adicionados 5uL do “pool” formado por 3 sequências de oligonucleotídeos de miRNAs do organismo *C. elegans* (Sigma, EUA) na concentração final de 5pmol/uL.
3. Adicionar 0,2mL de clorofórmio para cada 1mL de Qiazol. O mesmo volume da amostra de soro ou plasma que se iniciou o procedimento.
4. Agitar vigorosamente com as mãos ou no vórtex por 15 segundos.
5. Deixar sob a bancada por 2-3 minutos.
6. Ligar a microcentrífuga refrigerada.
7. Centrifugar as amostras a 12000xg por 15 minutos a 4°C.

**Nesta fase o RNA será separado das proteínas e de restos celulares através da ação do clorofórmio. Neste processo observamos 3 fases distintas:*

- Fenol-clorofórmio (rosada), onde estão contidos os restos celulares.*
- Fase intermediária (branca), onde estão as proteínas.*
- Fase translúcida (superior/sobrenadante), onde está presente o RNA.*

***Após a centrifugação, deixar a centrífuga esquentar (15-25°C) para as etapas seguintes.*

Fase de Precipitação

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 012
		Versão: 01
		Página 8

8. Transferir a fase sobrenadante (cerca de 600uL) para um novo microtubo de 2,0mL estéril previamente identificado tomando cuidado ao pipetar, não deixando a ponteira tocar em nenhuma outra fase).

9. Adicionar 1,5 volume de etanol absoluto (900uL para 600uL de fase aquosa) e misturar por inversão ou durante a pipetagem.

10. Pipetar aproximadamente 700uL dessa mistura, incluindo qualquer precipitado, para a coluna “RNeasy MinElute Spin Column” apoiada em um microtubo de 2mL fornecido pelo kit (“collection tube”).

11. Feche a tampa da coluna e centrifugue por 15 segundos a uma rotação ≥ 10.000 rpm a temperatura ambiente.

12. Descarte o que passou da coluna (o filtrado) para o tubo, e volte o mesmo para a coluna. Adicione mais 700uL da mistura (amostra + etanol) à coluna e centrifugue nas mesmas condições anteriores. Repita esses passos, até que toda a mistura tenha passado pela coluna.

**Importante salientar que não se deve passar um volume > que 700uL na coluna para que o volume não transborde e se perca material.*

Fase de Lavagem

13. Adicione 700uL do tampão RWT à coluna. Feche a tampa e centrifugue por 15 segundos a uma rotação ≥ 10.000 rpm a temperatura ambiente.

14. Descarte o filtrado e volte à coluna no mesmo tubo.

15. Acrescente 500uL do tampão RPE à coluna. Feche a tampa e centrifugue por 15 segundos a uma rotação ≥ 10.000 rpm a temperatura ambiente.

16. Descarte o filtrado e volte à coluna no mesmo tubo.

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 012 Versão: 01 Página 9

17. Acrescente 500uL de etanol 80% à coluna. Feche a tampa e centrifugue por 2 minutos a uma rotação ≥ 10.000 rpm a temperatura ambiente.

18. Descarte o tubo de apoio à coluna e insira a mesma em um novo tubo ("collection tube").

19. Coloque-o para centrifugar novamente, mas desta vez, com a tampa aberta*, na rotação máxima (14.000 rpm), por 5 minutos, para que todo o excesso de etanol ou qualquer reagente da extração possa ser retirado e a coluna ficar bem seca e livre desses contaminantes. Descartar o tubo ("collection tube").

**Sugere-se que se identifiquem os tubos, caso a tampa se rompa do tubo durante a centrifugação. Para que isso não aconteça, caso tenha espaço no rotor, é aconselhável colocar um tubo e pular o seguinte no rotor (um sim e um não) e as tampas devem estar voltadas para fora do rotor no sentido oposto à rotação (sentido horário x sentido anti-horário).*

Fase de Eluição do RNA

20. Coloque a coluna em um novo tubo do kit ("1.5mL collection tube") previamente identificado com o nome da sua amostra e data de extração.

21. Adicione 14uL* de água livre de RNases fornecida pelo kit ("RNase-free water") bem no centro da coluna, tomando cuidado para não encostar a ponteira na coluna e perfura-la. Feche a tampa e centrifugue por 1 minuto à rotação máxima.

22. Terminada a centrifugação, a coluna é desprezada e o filtrado é o produto da extração (RNA/miRNA).

23. Armazenar o produto a -80°C .

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 012
		Versão: 01
		Página 10

**É possível adicionar no mínimo 10uL de água, mas não menos que isso, caso queira concentrar mais seu RNA. Deve-se levar em conta que há uma perda de cerca de 20% do volume pipetado (volume morto da “RNeasy MinElute Spin Column” é de 2uL). Assim, pipetando-se 14uL, você terá um volume final de 12uL de RNA.*

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	