PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE RNA EM *Apareiodon ibitiensis.*

Isabela Pereira de Oliveira (PIBIC-CNPq/PROVIC), Viviane Nogaroto Vicari, Matheus Azambuja dos Santos, Marcelo Ricardo Vicari (Orientador), e-mail: vicarimr@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) – Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Ciências Biológicas – Genética.

Palavras-Chave: *Amh, biologia molecular, determinação sexual, expressão gênica, qRT-PCR.*

Resumo

A determinação sexual é pouco compreendida em peixes. Como isso, esse estudo teve por objetivo padronizar a extração de RNA em *Apareiodon* aff. *ibitiensis* a fim de analisar a expressão do gene *Amh*, relacionado a diferenciação gonadal. Para isso, foi realizada a extração de RNA total, síntese de cDNA e qRT-PCR. A expressão *Amh* foi significativamente maior em gônadas masculinas. Nossas análises demonstraram que *Amh* tem atuação na diferenciação gonadal masculina em teleósteos.

Introdução

Peixes têm alta plasticidade na determinação sexual e variação nos genes chave que desencadeiam o mecanismo, além de fatores ambientais podendo influenciar no processo. O hormônio antimulleriano (Amh) possui papel importante na regressão do ducto de Müller durante a diferenciação sexual masculina em vertebrados tetrápodes (Josso et al., 2006). Já os teleósteos não possuem ductos müllerianos, mas possuem genes ortólogos *Amh*, que desempenham papéis essenciais na difenciação sexual e regulação das células germinativas. *Apareiodon* aff. *ibitiensis* tem sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW e foi utilizado nesse estudo para padronizar o método de extração de RNA total dos tecidos cérebro e gônada com finalidade de investigar a expressão do gene *Amh*.

Material e Métodos

Os tecidos cérebro e gônadas de exemplares machos e fêmeas de *A*. aff. *ibitiensis* foram submetidos ao método de extração de RNA total com o reagente Trizol. O RNA obtido foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando *GoScript™Reverse Transcription System*. Primers utilizando a estratégia éxon-exon foram desenhados para o gene *Amh* a partir do genoma de *Apareiodon* sp. e utilizados para os testes de eficiência de primers e ensaios de expressão gênica realizados por meio de *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR). A expressão relativa foi obtida utilizando o cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A análise estatística foi conduzida com os testes T independente, F e Tukey.

Resultados e Discussão

Os dados de concentração, qualidade e pureza do RNA extraído com o método Trizol demonstraram-se eficazes para a extração do RNA total dos tecidos cérebro e gônada, com a maioria das amostras apresentando razões de absorbância $A_{260/280}$ entre 1,8 e 2,2 (Tabela 1), considerados de alta qualidade.

Tabela 1- Quantificação de RNA total extraído de tecidos de *A.* aff. *ibitiensis*, bem como as razões de absorbância ($A_{260/280}$ e $A_{260/230}$).

Amostras	Tecido	Sexo	Concentração	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
1156	Gônadas	♂	715,63	2,038	1,426
1154		♂	4820,64	2,012	2,379
1161		♂	4508,15	2,009	2,368
1153		♀	11092,42	2,413	2,005
1155		♀	9733,80	2,316	1,788
1157		♀	8722,65	2,280	1,747
1158	Cérebro	♂	406,59	2,170	0,948
1159		♂	788,85	2,161	2,295
1161		♂	1000,57	2,156	2,214
1165		♀	676,34	2,150	2,199
1166		♀	778,02	2,139	2,233
1167		♀	910,15	2,098	2,211

Os ensaios de expressão gênica e análises estatísticas mostraram que a expressão *Amh* é significativamente maior em gônadas de machos (Figura 1).

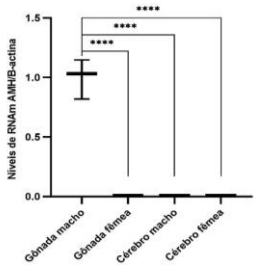


Figura 1. Expressão de mRNA AMH/β-actina em tecidos cerebrais e gonadais de machos e fêmeas. ** indica que há diferença significativa entre o grupo gônada macho e os demais grupos.**

A expressão *Amh* aumentada em gônadas masculinas em teleósteos foi descrita por Lin et al. (2021). Nossos achados corroboram a atuação do *Amh* para a diferenciação de gônadas masculinas em *Apareiodon*.

Conclusão

O método de extração de RNA total por trizol é eficaz para os tecidos gonadal e cerebral em *A.* aff. *ibitiensis*. A expressão *Amh* é significativamente maior em gônadas masculinas de *A.* aff. *ibitiensis*, corroborando o papel crucial desse gene na diferenciação gonadal masculina em teleósteos.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

JOSSO, N.; PICARD, J. Y.; REY, R.; DI CLEMENTE, N. Testicular Anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. **Pediatric Endocrinology**, v. 3, p. 347-358, 2006.

LIN C. J.; JENG S. R.; LEI Z. Y. et al. Involvement of Transforming Growth Factor Beta Family Genes in Gonadal Differentiation in Japanese Eel, Anguilla japonica, According to Sex-Related Gene Expressions. **Cells**, v. 10(11), p. 3007, 2021.