



Análise transcricional em diferentes condições de cultivo de *small RNAs* preditos em *Mycoplasma hyopneumoniae*

Gabriela Merker Breyer¹ e Irene Silveira Schrank²

1. Iniciação Científica, Biotecnologia Molecular, UFRGS

2. Orientadora, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, UFRGS

Introdução

Mycoplasma hyopneumoniae é uma bactéria de genoma diminuto, rico em conteúdo A+T, e cuja regulação transcricional ainda é pouco compreendida. Análises *in silico* realizadas recentemente sugeriram a existência de *small RNAs* (sRNAs) em seu genoma, os quais são RNAs reguladores não-codificantes envolvidos no controle da expressão gênica.

Objetivo

Analisar a transcrição dos sRNAs preditos, em diferentes condições de cultivo, mapeando sua posição no genoma de *M. hyopneumoniae*.

Metodologia

A partir de estudos *in silico*, 47 sRNAs foram preditos em *M. hyopneumoniae* 7448. Como este organismo possui um genoma rico em conteúdo A+T e com diversas repetições, foi possível construir *primers* específicos para 18 sRNAs, os quais foram empregados na análise experimental. No total foram construídos dois *primers* para cada possível orientação de cada sRNA predito, sendo um *primer* 3' específico, acrescido de um grampo que confere estabilidade ao mRNA, para a reação de transcrição reversa (RT), e um *primer* 5' específico para a reação em cadeia da polimerase (PCR); além disso, um *primer* 3' universal que anela internamente ao grampo foi utilizado na reação de PCR, como está mostrado na Figura 1.

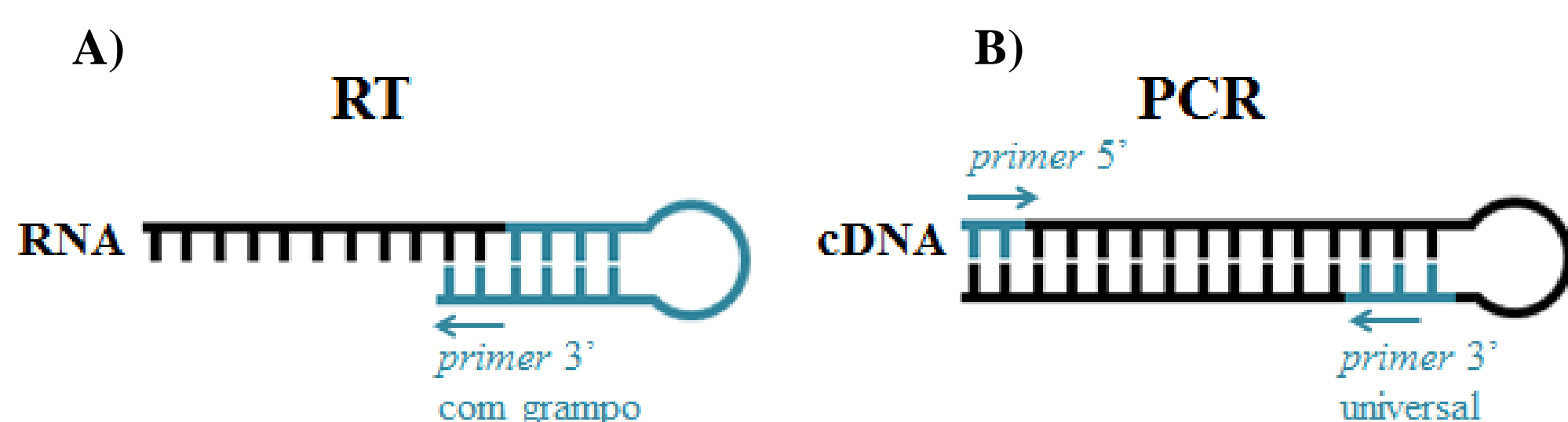


Fig. 1 Representação dos *primers* utilizados na metodologia de RT-PCR, considerando uma das possíveis orientações gênicas do sRNA. **A)** *primer* empregado na reação de RT. **B)** *primers* empregados na reação de PCR.

A extração de RNA de *M. hyopneumoniae* foi realizada em três condições distintas de cultivo:

- I. padrão:** cultivado a 37 °C, por 24 h;
- II. estresse térmico:** cultivado a 37 °C, por 24 h e incubado a 30 °C por 2 h 30 min, seguido de 30 min a 42 °C;
- III. estresse oxidativo:** cultivado a 37 °C, por 24 h e tratado com 1 % de peróxido de hidrogênio.

Todos os cultivos foram realizados em meio Friss. Para cada condição, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA extraído, através da reação de RT. Os cDNAs foram então amplificados através da reação de PCR, e os produtos amplificados foram analisados em géis de agarose 2 %. As reações foram realizadas em triplicatas.

Resultados e Discussão

Através da metodologia de RT-PCR foi possível confirmar experimentalmente a presença de transcritos para todos os 18 sRNAs testados. Dois sRNAs apresentaram expressão diferencial. São eles: sRNA 15, transcrito nas condições de estresse oxidativo e estresse térmico, porém não na condição padrão; e sRNA 30, transcrito na condição padrão e no estresse oxidativo, porém não após o estresse térmico. Ambos resultados podem ser vistos na Figura 2.

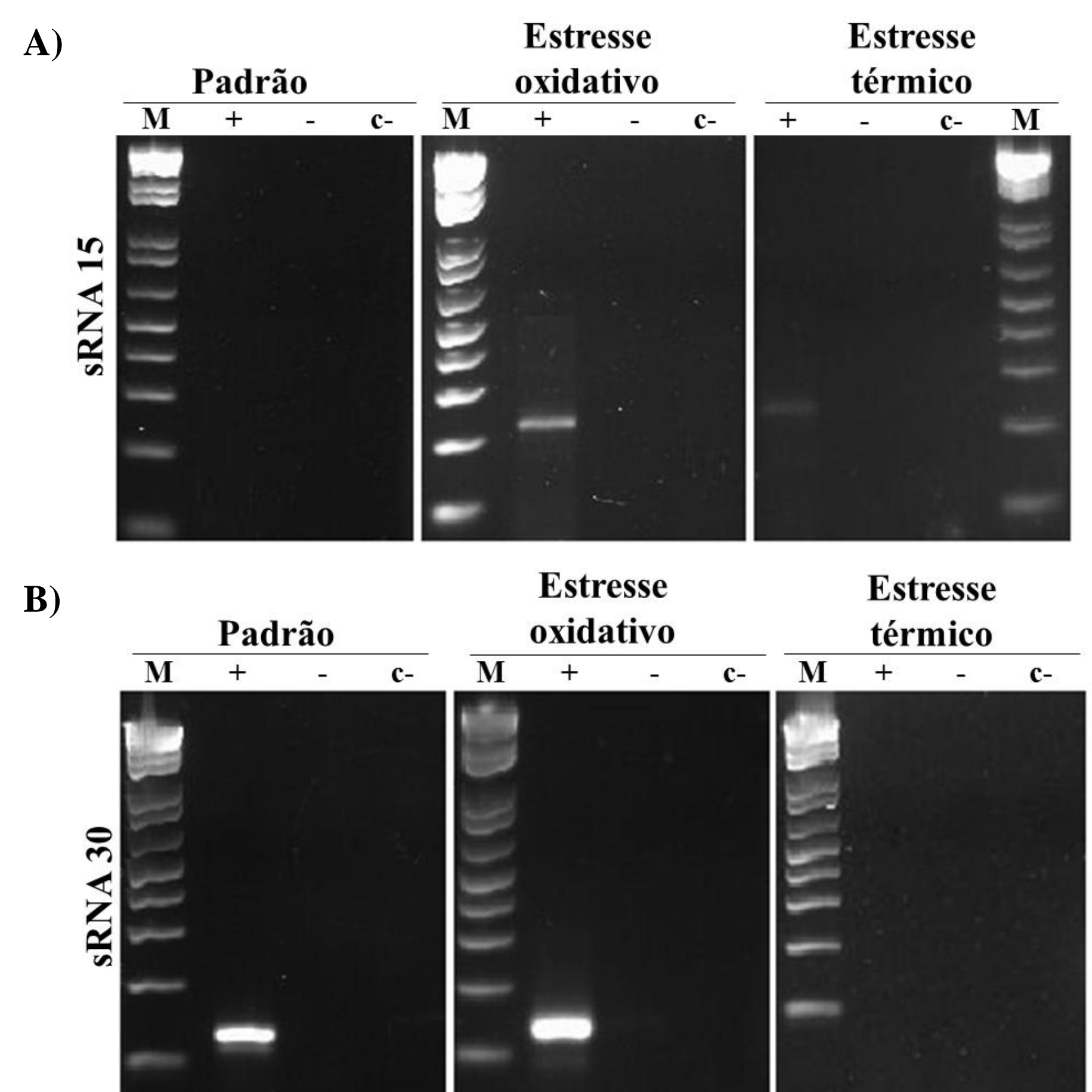


Fig. 2 Géis de agarose ilustrando a amplificação dos transcritos nas três condições de cultivo. **A)** sRNA 15 com 279 pb. **B)** sRNA 30 com 96 pb. M: marcador ladder 1 kb; c-: controle negativo da reação de PCR.

Com base nos resultados obtidos foi possível observar expressão condição-específica em dois sRNAs, sugerindo que seus transcritos possam estar envolvidos na regulação da expressão gênica nessas condições.

Perspectivas

Os resultados obtidos serão associados a informações que serão geradas na predição *in silico* de possíveis genes-alvo dos sRNAs, objetivando traçar hipóteses do seu envolvimento na regulação transcricional em *M. hyopneumoniae*.

Referência Bibliográfica

Godinho, C.P.S. Busca por RNAs não-codificantes em genomas ricos em AT. Dissertação de Mestrado, LNCC, Petrópolis, RJ, 2014.

Varkonyi-Gasic, E.; Wu, R.; Wood, M.; Walton, E.F.; Helens, R.P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 2007.

Apoio:

