

25

CAPÍTULO

DESAFIOS DA EXTRAÇÃO DO RNA DO VÍRUS DA DENGUE (LIGAÇÃO E EXTRAÇÃO AO DNA: MÉTODOS, APLICAÇÕES E LIMITAÇÕES)

Raquel Spinassé Dettogni
Lúri Drumond Louro

25.1 INTRODUÇÃO

Em muitos países, a dengue é uma das doenças infecciosas mais preocupantes e frequentes desde o final do último século¹. Trata-se de uma arbovirose humana importante em termos de morbidade e mortalidade e constitui um problema de saúde pública no mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem a proliferação dos seus vetores, os mosquitos do gênero *Aedes*. Estima-se que acima de 2,5 bilhões de pessoas vivam em área de risco e mais de cem países possuam transmissão endêmica da doença^{2,3}. Essa infecção pode ser assintomática ou

promover quadros clínicos que variam de síndrome gripal leve, conhecida como febre da dengue, a uma doença grave e por vezes fatal denominada febre da dengue hemorrágica/síndrome de choque da dengue.

Os surtos de dengue são causados por quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus da dengue (DENV), denominados vírus da dengue tipo 1 a 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4)⁴. Esses vírus pertencem à família *Flaviviridae*, ao gênero *Flavivirus* e possuem genoma de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 11 quilobases de tamanho e massa molecular de 4×10^6 daltons⁵. O vírion dos flavivírus tem formato esférico e diâmetro de 40 a 60 nanômetros (nm) (Figura 25.1).

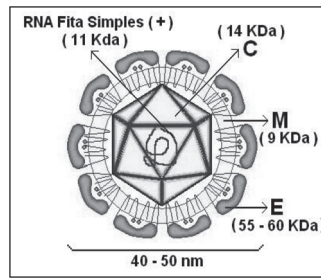


Figura 25.1 Morfologia do vírion de um *Flavivirus*⁶. Legenda: Kda, quilodaltons; C, proteína do capsídeo; M, proteína da membrana; E, proteína do envelope; nm, nanômetros.

A presença do DENV pode ser detectada para fins clínicos e de pesquisa por técnicas sorológicas e moleculares de isolamento viral. Os métodos sorológicos detectam anticorpos contra o DENV e podem ser realizados somente após a fase aguda da doença (após o sexto dia de sintomas aproximadamente). Além disso, não permitem a sorotipagem e a quantificação viral^{7,8}. O isolamento viral permite a detecção e a sorotipagem do DENV já na fase aguda da doença, porém não permite a quantificação viral. O isolamento também apresenta a desvantagem de ter seu sucesso afetado por muitos problemas de manipulação e armazenamento das amostras, além da grande demanda de tempo, trabalho e instalações especiais. As metodologias moleculares, cujo objetivo é a detecção do genoma viral, tornaram-se excelentes ferramentas para diagnóstico e pesquisa do DENV, por serem mais rápidas e sensíveis que as outras metodologias⁷⁻¹⁰. Com o uso de técnicas moleculares, podem ser feitos testes diagnósticos sensíveis e variados estudos específicos

do genótipo viral, importantes em muitas áreas¹¹. Dentre os métodos moleculares para detecção de vírus com genoma de RNA, como o DENV, está a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (do inglês, *reverse transcription-polymerase chain reaction* – RT-PCR). Nessa técnica, a transcrição reversa produz ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir do RNA viral, e a posterior PCR amplifica esse DNA. A RT-PCR apresenta várias modificações com etapas pós-reação em cadeia da polimerase (PCR), como *nested*-PCR, hibridização dos produtos com sondas de oligonucleotídeos tipo-específicas (*Southern blot/Dot blot*), reações de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (do inglês, *restriction fragment length polymorphism* – RFLP), eletroforese de campo pulsado (do inglês, *pulsed field gel electrophoresis* – PEGF), microarranjos de DNA e sequenciamento dos nucleotídeos dos produtos da PCR. Todas essas modalidades permitem rapidamente detectar e sorotipar o DENV na fase aguda da dengue. Uma modificação mais recente da RT-PCR é a RT-PCR em tempo real, que possui mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência, de modo que a amplificação, a detecção e a quantificação do DNA acontecem em uma única etapa. Essa metodologia permite, além de detectar e sorotipar o DENV nos primeiros dias de sintomas, quantificar o vírus, ou seja, medir a carga viral presente na amostra^{9,10}. A RT-PCR em tempo real que disponibiliza resultados de quantificação se chama RT-PCR em tempo real quantitativa (do inglês, *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction* – qRT-PCR)¹²⁻¹⁸.

A primeira etapa necessária para a realização de qualquer metodologia molecular para estudo do DENV é a extração/purificação do RNA viral. A extração do RNA é um passo crítico para a detecção segura do vírus^{19,20} e é o elemento-chave para o sucesso das análises moleculares.

25.2 HISTÓRICO

Na década de 1960, Kurland e colaboradores desenvolveram o isolamento de RNA por centrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl)²¹, e, desde então, novos protocolos para extração de RNA de variadas amostras foram desenvolvidos. Modificações a esse método foram feitas, sendo umas das mais usadas e iniciais a ultracentrifugação em CsCl disponibilizada por Glisin e colaboradores em 1974²². Embora a extração por gradiente de CsCl tenha sido o primeiro método de purificação do RNA, atualmente é pouco usado, principalmente entre as formas comerciais de extração²¹.

Em 1968, Kirky, Later e Chirgwin aperfeiçoaram a extração de RNA usando tiocianato de guanidina, um forte desnaturante, e β -mercaptoetanol (β -met), um agente redutor, em conjunto ou com extração por etanol ou com ultracentrifugação em CsCl²³. Posteriormente, Feramisco e colaboradores, em 1982, descreveram o sucesso da combinação da guanidina com fenol para a extração de RNA²⁴. Devido às várias desvantagens e baixa reprodutibilidade das técnicas desenvolvidas até então, foram necessários novos aperfeiçoamentos, e em 1987 Piotr Chomczynski e Nicoletta Sacchi publicaram o método de extração orgânica com tiocianato ácido de guanidina-fenol-clorofórmio, no qual, em uma única etapa, foi possível a extração do RNA dentro de quatro horas²⁵. Devido à sua maior agilidade, maior facilidade, sensibilidade, pureza do RNA, reprodutibilidade e diminuição da quantidade de amostra necessária, esse método tornou-se padrão ouro na extração de RNA, sendo usado como princípio de muitos reagentes comerciais^{9,21,26,27}.

O conhecimento da capacidade do ácido nucleico de se ligar a partículas magnéticas, de sílica e de vidro na presença de agentes caotrópicos é anterior ainda ao desenvolvimento da primeira técnica de extração de RNA²⁶. Em 1982, Marko e colaboradores usaram essa propriedade para a extração de ácido nucleicos por meio de partículas de vidro na presença de percolato de sódio²⁸. Em 1990, essa técnica foi aperfeiçoada por Boom e colaboradores²⁹ com uso de tiocianato de guanidina como agente caotrópico para ligação do ácido nucleico a partículas de sílica. Posteriormente, foram desenvolvidos vários protocolos de adsorção do RNA a esferas magnéticas. Devido à sua rapidez e facilidade, a técnica de Boom e colaboradores²⁹ foi usada como base para grande parte dos kits comercialmente disponíveis que usam minicolunas de sílica em tubos de ensaio para adsorção e isolamento do ácido nucleico.

25.3 EXTRAÇÃO DE RNA DO VÍRUS DA DENGUE

O RNA do DENV pode ser detectado em soro, plasma, líquido cerebrospinal e tecidos frescos ou fixados em parafina. Um estudo realizado por Mizuno e colaboradores em 2007³⁰ detectou o DENV-1 em amostras de urina e saliva de um paciente com dengue, mostrando que outros tipos de amostras também podem ser usados. Prado e colaboradores, em 2005³¹, conseguiram detectar o genoma viral em amostras de sangue coletado em papel de filtro, com manutenção da integridade do RNA por até nove semanas após a coleta do sangue. Esse é um método de coleta fácil e vantajoso;

porém, muitos laboratórios ainda não conseguem isolar com sucesso o genoma viral a partir do sangue em papel filtro, e para isso são necessários mais estudos que aprimorem um protocolo reprodutível.

O RNA pode estar presente nessas amostras em baixas titulações, e a qualidade após a extração é crucial para as reações subsequentes⁷. Embora alguns vírus possam ser detectados no plasma, sem qualquer purificação anterior³², esse não é o caso do DENV. Assim, é importante atenção especial à etapa de extração do seu RNA.

25.4 QUALIDADE DA EXTRAÇÃO

Primeiramente, deve-se levar em consideração que o RNA é uma molécula instável e de fácil degradação, pois, além de ser fita simples, a presença do grupo hidroxila no carbono de número 2 na sua ribose (Figura 25.2) facilita a sua reação com enzimas degradativas. Como o pré-requisito para o funcionamento das técnicas moleculares é a extração de um RNA puro, íntegro e de qualidade³³, os métodos de extração de RNA são otimizados para a sua proteção durante todo o processo.

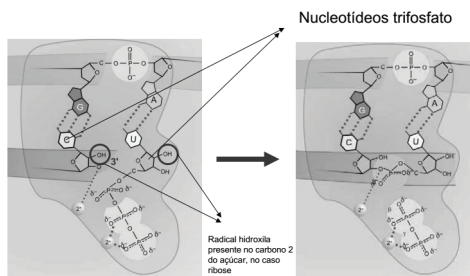


Figura 25.2 Esquema do ataque nucleofílico e formação da ligação fosfodiéster. Nos círculos estão destacadas as hidroxilas livres do carbono de número 2 das riboses.

Antes da extração devem ser observadas as necessidades de cuidado na coleta e armazenamento das amostras. Para amostras de sangue, a extração deve ser procedida rapidamente após a coleta da amostra (entre quatro e seis horas). Caso a extração não possa ser realizada nesse período, o sangue coletado em tubo sem gel separador de plasma deve ser centrifugado e o soro/plasma transferido para outro tubo dentre quatro e seis horas para

que seja congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração do RNA³⁴. O plasma de sangue coletado em tudo com gel separador pode ser mantido refrigerado por até 5 dias, quando então deve ser congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou submetido à extração do RNA. Tecidos devem ser congelados em nitrogênio líquido, embebidos em solução de preservação de RNA ou submetidos à extração do RNA em até uma hora após a coleta³⁴. Geralmente, amostras de tecidos são coletadas de falecidos, sendo importante limitar o tempo entre o falecimento e a coleta²¹. Amostras de líquido cerebrospinal devem sempre permanecer em banho de gelo e o RNA deve ser extraído em até quatro horas após a coleta³⁴ (Figura 25.3).

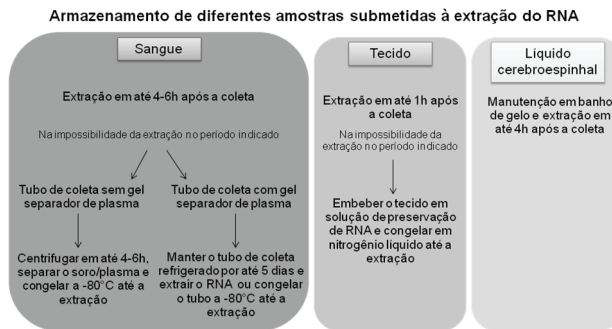


Figura 25.3 Fluxograma mostrando o período ideal para realização da extração do RNA após a coleta das diferentes amostras e o modo de armazenamento destas até a extração.

Resultados moleculares falsos negativos (resultados negativos por erro na detecção do RNA, e não pela ausência do vírus) são frequentemente causados pela ação de ribonucleases (RNAses), enzimas que degradam o RNA e impossibilitam a amplificação do DNA na PCR. Essas enzimas são motivo de preocupação, uma vez que, além de possuírem grande capacidade de degradação, são estáveis, não precisam de cofatores, estão presentes em muitos locais (amostra, soluções, manipulador e ambiente) e são resistentes a vários tratamentos, inclusive térmicos, como fervura e autoclavagem^{26,35,36}. Por isso, durante todas as etapas de extração do RNA devem ser tomadas precauções rigorosas contra a contaminação com RNAses: luvas devem ser usadas a todo o momento e trocadas frequentemente para evitar a contaminação com RNAses presentes nas mãos; todo material de plástico

utilizado deve ser estéril, livre de RNAses e não deve ser reutilizado; é recomendado o uso de ponteiras com filtro; pipetas devem ser de uso exclusivo para extrações de RNA; vidrarias devem ser bem lavadas, tratadas com o inibidor de RNAses chamado dietilpirocarbonato (DEPC), autoclavadas e secas em estufa; utensílios tratados com DEPC devem ser posteriormente submetidos à total remoção do DEPC, pois este pode inibir reações moleculares subsequentes; água e soluções a serem usadas devem ser tratadas com DEPC e autoclavadas (com exceção de soluções contendo tris(hidroximetil)aminometano, pois este inativa o DEPC); se possível, as soluções devem ser filtradas em membrana de nitrocelulose (0,22 μm) para melhor retirada de RNAses; tubos, amostras e soluções devem ser abertos somente quando necessário e, por fim, RNAses endógenas da amostra devem ser inativadas no primeiro passo de qualquer protocolo de extração de RNA²¹. Em adição a esses cuidados, os protocolos podem usar um “sistema repórter”, um RNA sintético marcado com radiação, como, por exemplo, fósforo-32 (³²P). A recuperação desse RNA intacto ao final da extração indica que o protocolo funcionou corretamente, sem degradação por RNAses²¹.

Outra importante consideração a se fazer sobre o RNA é que, uma vez extraído, é recomendado que seja armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, idealmente, em alíquotas, pois além de ser instável devido à degradação por RNAses, o RNA também é facilmente degradado por processos de congelamento seguidos de descongelamento. O congelamento do RNA em alíquotas permite que ele seja submetido apenas uma vez ao descongelamento³⁶.

Para evitar resultados falsos negativos ou até mesmo falsos positivos, é recomendado o uso de controles positivos e negativos desde a extração do RNA³⁶. O controle positivo é uma amostra que se sabe que contém o vírus, de preferência uma amostra diluída para uma concentração viral que esteja no limite de detecção da técnica de extração. Esse controle é importante para a garantia da sensibilidade da técnica. Já o controle negativo é uma amostra na qual se sabe que o vírus está ausente. Essa amostra sempre deve ser manipulada por último, após as amostras serem analisadas e após os controles positivos, de modo a garantir que não houve contaminação entre as amostras durante o processo de extração.

As técnicas de extração de RNA podem ser qualificadas quanto à quantidade e pureza do RNA por meio da espectrofotometria. Nessa análise, um espectrofotômetro como o NanoDrop (Thermo Scientific), por exemplo, mede a absorbância do RNA, o qual absorve a luz no comprimento de onda de 260 nm. Inicialmente uma alíquota da solução com o RNA extraído é diluída em água deionizada e submetida à leitura da absorbância pelo

espectrofotômetro. A medida da absorbância a 260 nm (A260) possibilita o cálculo da quantidade do RNA extraído por meio da fórmula:

$$\text{(Equação 25.1)} \quad [\text{RNA}] = (\text{A260} \times \text{Fc} \times \text{fd})/1000$$

em que Fc corresponde ao fator de conversão que é de valor 40 (A260 nm = 1 corresponde a 40 microgramas por mililitros ($\mu\text{g/mL}$) de RNA); fd corresponde ao fator de diluição da amostra em água para a leitura do espectrofotômetro e o resultado é dividido por mil para uma concentração em microgramas por microlitro ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Proteínas absorvem a luz no comprimento de onda de 280 nm, e o espectrofotômetro já disponibiliza a razão da A260 pela absorbância a 280 nm (A280) da solução de RNA. Razões A260/A280 maiores ou iguais a 1,75 indicam que a técnica de extração do RNA conseguiu disponibilizar um RNA com pureza satisfatória. Uma razão com valor entre 1,8 e 2,0 é a ideal para qualquer análise de RNA, pois indica um alto grau de pureza da solução de RNA extraído. Já razões abaixo de 1,75 indicam presença de contaminantes como proteínas e DNA ou acidez da solução contendo o RNA, ou seja, indicam que a técnica de extração não disponibilizou um RNA com pureza satisfatória. Metodologias posteriores à extração do RNA mais simples, como a RT-PCR, podem ser realizadas com sucesso, mesmo após uma extração de um RNA impuro, no entanto, técnicas mais elaboradas, como sequenciamento ou medidas de expressão gênica com microarranjos, requerem um RNA puro.

25.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO RNA

As variadas técnicas aplicadas na extração do RNA viral podem ser divididas em três grandes grupos: (1) técnicas baseadas no uso de fortes agentes desnaturantes e componentes orgânicos, como as técnicas derivadas da técnica de Chomczynski-Sacchi (1987)²⁵; (2) métodos baseados na adsorção do RNA a superfícies específicas na presença de sais caotrópicos, como os kits comercialmente disponíveis baseados na afinidade do RNA a membranas de sílica/gel chamadas colunas ou as técnicas derivadas da metodologia de Boom e colaboradores (1990)²⁹; e (3) protocolos que exploram a separação do RNA em gradiente de centrifugação isopícnico^{21,26}.

As técnicas de extração são variadas, mas usam etapas básicas para a extração do RNA. Inicialmente as membranas lipídicas são lisadas por uma solução detergente. Em seguida, é feita a purificação do RNA: remoção de

restos celulares; desnaturação proteica; remoção de contaminantes como proteínas, DNA e fenol e separação do RNA dos outros componentes. Depois de purificado, o RNA é precipitado ou isolado, e a última etapa é a dissolução ou eluição do RNA com água ou tampão. A eluição pode ser antecedida pela reidratação do RNA quando necessário.

25.6 EXTRAÇÃO ORGÂNICA

Nos protocolos de extração orgânica do RNA a amostra é lisada por agentes químicos desnaturantes como tiocianato de guanidina e redutores como o β -met^{37,38} e, posteriormente, a solução é submetida à extração orgânica com fenol e clorofórmio e à precipitação com álcool. A centrifugação da solução (amostra, fenol, clorofórmio e agente desnaturante) resulta na formação de três fases com cor, conteúdo e localização diferentes no tubo: uma fase aquosa superior de cor clara, que contém os ácidos nucleicos; uma pequena camada esbranquiçada intermediária, que contém proteínas dissolvidas em fenol e uma fase orgânica inferior de coloração rósea, que contém lipídeos dissolvidos em clorofórmio e fenol (Figura 25.4). Por precipitação com álcool, o RNA é recuperado da fase aquosa.

O tiocionato de guanidina e o β -met desnaturam proteínas por quebra de ligações não covalentes que mantêm a estrutura terciária e quaternária das proteínas, fazendo-as precipitar, perder a estabilidade e conseqüentemente perder a atividade biológica. O primeiro reagente é um agente caotrópico³⁹, que quebra ligações hidrofóbicas, e o segundo é um agente redutor, que



Figura 25.4 Fases formadas na extração orgânica do RNA.

desfaz as ligações dissulfeto⁴⁰. Desse modo, ambos conseguem efetivamente inativar as RNAses presentes na amostra.

O fenol utilizado deve ser livre de nucleases e hidratado ou saturado com água. Esse fenol é uma solução de 72% de fenol e 28% de água, com pH ajustado para 4²⁶. Esse pH ácido é importante para manter o RNA na fase aquosa e remover o DNA dessa fase, uma vez que a extração de ácidos nucleicos por fenol é pH-dependente: em pH básico o DNA fica na fase aquosa, e em pH ácido o DNA é desnaturado e precipita para a fase orgânica, ficando somente o RNA na fase aquosa⁴¹.

Clorofórmio é um solvente orgânico que, além de ajudar na desnaturação proteica e facilitar na formação das três fases, também tem o papel fundamental de remover o fenol residual da fase aquosa. O clorofórmio é em torno de 10 vezes mais solúvel em água que o fenol e, portanto, consegue separar o fenol da fase aquosa. O álcool isoamílico pode ser usado juntamente com o clorofórmio para ajudar na separação das fases, uma vez que diminui a formação de espuma²⁶.

O RNA é recuperado da fase aquosa por precipitação com etanol e sal catiônico. Após centrifugações é formado um *pellet* esbranquiçado no fundo do tubo contendo o RNA. Essa coloração branca deve-se à presença de sais precipitados juntamente com o RNA, os quais devem ser removidos por lavagens com etanol²¹. O etanol induz a transições estruturais nas moléculas de RNA, de modo a causar a formação de agregados que precipitam. Assim, ocorre a concentração do RNA e sua separação dos outros componentes da fase aquosa. Os sais catiônicos usados podem ser cloreto de sódio, acetato de sódio e acetato de amônio, sendo os dois últimos preferenciais, pois o cloreto de sódio tem baixa afinidade pelo etanol, sendo mais difícil de ser retirado do *pellet*²⁶. O isopropanol pode ser usado no lugar do etanol na precipitação, sendo importante para casos nos quais a capacidade de volume do tubo usado na extração é limitada, pois a quantidade de isopropanol usada para precipitar certa concentração de RNA é menor que a quantidade de etanol necessária. No entanto, atenção especial deve ser dada ao se usar isopropanol, pois este coprecipita sais com o RNA e é menos volátil que o etanol. Assim, o *pellet* formado por precipitação com isopropanol precisa ser lavado com etanol para a retirada do isopropanol e sais²⁶.

O RNA extraído é dissolvido em água livre de RNAses ou tampões apropriados e deve ser armazenado em tubos estéreis, hidrofóbicos, não manipulados por mãos sem luvas e tratados com água tratada com DEPC. O armazenamento deve ser feito em temperaturas de -80 °C ou menores, para garantir a inatividade de RNAses e a estabilidade do RNA³⁴.

A extração orgânica é realizada com variadas modificações e representa o “padrão ouro” nas rotinas de laboratório. A técnica de Chomczynski-Sacchi (1987)²⁵, uma das mais conhecidas técnicas de extração orgânica de RNA, foi desenvolvida para extração de RNA a partir de amostras de células cultivadas ou tecidos. Esses autores conseguiram purificar RNA não degradado e com boa quantificação dentro de 4 horas²⁵. Em seu protocolo, Chomzysnki e Sacchi usaram como solução desnaturante (solução D), uma solução feita com 4 M de tiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sódio em pH 7,0, 0,5% de sarcosil e 0,1 M de β -met. Inicialmente, a solução D é homogeneizada com a amostra e então são adicionados o acetato de sódio, o fenol saturado com água e uma mistura de clorofórmio com álcool isoamílico (na proporção 49:1). A mistura passa por resfriamento e uma centrifugação, após a qual o RNA encontra-se na fase aquosa e os outros componentes nas fases intermediária e orgânica. A porção contendo o RNA é misturada com isopropanol, e a precipitação do RNA é feita a -20 °C. O *pellet* de RNA formado após uma centrifugação é misturado com solução D e a precipitação é repetida. Após uma última centrifugação, o *pellet* de RNA é lavado com etanol 70% a 80%, passa pela secagem e é dissolvido em dodesil sulfato de sódio 0,5%²⁵.

Reagentes como TRI Reagente® (Sigma-Aldrich), TRIzol® Reagents (Invitrogen-Life Technologies), Brazol (LCG Biotecnologia), TRIsure (Bio-line), dentre outros, são baseados na técnica de Chomczynski-Sacchi e estão comercialmente disponíveis. O TRI Reagente® e o TRIzol® LS Reagente permitem extração de RNA de origem viral a partir de plasma/soro humanos e oferecem a possibilidade de extração simultânea do DNA e das proteínas presentes na amostra.

A extração orgânica apresenta algumas desvantagens, como a possível separação incompleta das proteínas do RNA e a contaminação da fase aquosa pela fase orgânica. Além disso, as técnicas baseadas nesse tipo de extração podem ser demoradas, são trabalhosas, usam reagentes perigosos, necessitam de muita vidraria e utensílios plásticos e, por fim, podem ser inadequadas para manipulação de muitas amostras^{7,21}. Por outro lado, essa é uma das técnicas que apresenta maior sensibilidade e pureza do RNA. É uma técnica adequada para purificação de RNAs pequenos (menos de 200 nucleotídeos) e que serão usados posteriormente em métodos que requerem muita pureza do RNA.

Os reagentes comercialmente disponíveis baseados nessa técnica reduzem o tempo necessário para a extração do RNA e, por isso, permitem a extração do RNA de muitas amostras facilmente. No entanto, podem não ter a

mesma sensibilidade da extração orgânica realizada com reagentes preparados adequadamente no laboratório²⁶.

25.7 MÉTODOS BASEADOS NA ADSORÇÃO DO RNA

Métodos baseados na adsorção do RNA usam a propriedade desse ácido nucleico de se ligar em superfícies como esferas magnéticas⁴², sílica^{21,43}, materiais de látex de poliestireno⁴⁴, matriz de celulose ou fibras de vidro⁴⁵, na presença de determinados sais ou agentes caotrópicos. Estes possuem a propriedade de desorganizar a estrutura tridimensional de ácidos nucleicos e proteínas, desnaturando essas macromoléculas. Dentre esses métodos, encontra-se a técnica de Boom e colaboradores (1990)²⁹, que usa esferas de sílica, kits que usam partículas de vidro como o *High pure viral nucleic acid kit* (Roche Applied Science), kits que usam esferas magnéticas como o *InviMag® vírus RNA Mini Kit* (STRATEC Molecular) e os kits comercialmente disponíveis que usam minicolunas de sílica.

Boom e colaboradores²⁹ desenvolveram um protocolo para extração de RNA de soro e urina baseado em dois fundamentos: a inativação das RNAses pelo tiocianato de guanidina e a ligação do RNA a partículas de sílica ou diatomáceas (algas unicelulares cuja parede celular é de sílica) na presença de altas concentrações de tiocianato de guanidina. Nesse protocolo, a amostra é lisada por tiocianato de guanidina e é misturada às partículas de sílica para adsorção do RNA. Os complexos de RNA + sílica são sedimentados, e os contaminantes retirados por centrifugação/descarte do sobrenadante. O RNA adsorvido à sílica é lavado com etanol e acetona e posteriormente é deixado para secar. Por fim, o RNA é eluído em um tampão aquoso livre de sal, e a sílica é removida por centrifugação^{7,21,29}. De acordo com os autores do protocolo, essa técnica é barata, não exige muitos equipamentos do laboratório e disponibiliza RNA livre de RNAses, portanto, não degradado⁷. Desvantagens desse método são a dificuldade na remoção das partículas de sílica após a eluição do RNA e a baixa eficiência na extração de pequenos RNAs.

Os kits comercialmente disponíveis baseados em colunas, representadas na Figura 25.5, permitem a extração de RNA em fase sólida a partir de pequenas quantidades de amostra⁴⁶. A amostra é adicionada à coluna e o RNA se liga a ela em pH ácido e alta concentração de sal no tampão de ligação, o qual ainda pode conter agentes desnaturantes, detergentes, isopropanol e indicador de pH. A lavagem das colunas para purificação do RNA

a elas aderido é feita com tampões de lavagem contendo fosfato de potássio ou etanol, e o RNA é eluído com tampão de eluição ou água livre de RNAses^{7,21}. As principais etapas da extração de RNA com uso de colunas estão ilustradas na Figura 25.6.



Figura 25.5 Colunas usadas para extração de RNA.

Várias empresas disponibilizam kits baseados em colunas, como a Qia-gen, que apresenta 11 tipos de kits disponíveis para extração de RNA viral, a Invitrogen-Life Technologies (atual Thermo Fisher Scientific – Life Technologies) que possui o *PureLink® RNA/DNA viral purification*, a Axygen, que possui o kit de purificação de DNA/RNA viral, dentre várias outras.

O uso de coluna acelera, facilita, garante o lucro da extração e reduz o risco de contaminação durante o processo. No entanto, assim como a técnica de Boom e colaboradores²⁹, não é adequada para a extração de pequenos RNAs. Alguns pesquisadores descrevem ainda que pode resultar na extração de RNA menos puro se comparado à extração orgânica⁴⁷. A principal desvantagem do uso de kits de colunas é o alto preço. Com o objetivo de solucionar esse problema, Siddappa e colaboradores⁴⁸ publicaram um artigo

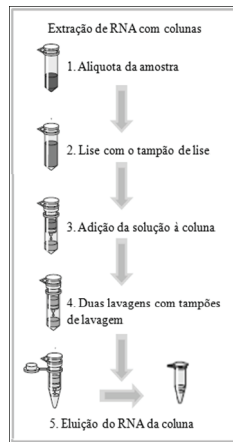


Figura 25.6 Principais etapas da extração de RNA com uso de colunas. (1) Uma pequena quantidade da amostra é adicionada a um microtubo. (2) A amostra é incubada com uma solução de lise para que ocorra a lise das membranas celulares e digestão proteica. (3) A solução resultante é adicionada à coluna e esta é centrifugada. O RNA permanecerá ligado à coluna. (4) Um tampão de lavagem é adicionado à coluna e esta centrifugada. O processo é repetido e, assim, a coluna é lavada duas vezes para retirada de moléculas, diferentes do RNA, que passam a ela estar aderidas. A lavagem dupla permite que apenas o RNA permaneça ligado à coluna. (5) Um tampão de eluição (ou água livre de RNAses) é adicionado à coluna e esta é centrifugada. Ao final do processo, o RNA é eluído da coluna e encontra-se dissolvido no tampão.

em 2007, no qual descreveram uma técnica para reutilizar as colunas para várias extrações (acima de 20 extrações), sem que elas percam a capacidade de adsorção ou purificação do ácido nucleico⁴⁸. Segundo esses autores, a incubação das colunas usadas em solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M por 24 horas pode eficientemente eliminar qualquer ácido nucleico a elas ligado e deixá-las prontas para uso em uma nova extração. Como os kits fornecem o volume dos reagentes condizente com o número de colunas, os autores relatam que, com a composição correta das soluções necessárias, os laboratórios conseguem fazê-las para reutilizarem as colunas.

25.8 EXTRAÇÃO DE RNA POR GRADIENTE ISOPÍCNICO

A extração de RNA por gradiente isopícnico ou por equilíbrio de gradiente de densidade, como também é chamada, consegue isolar o RNA por ultracentrifugação ou centrifugação em altas velocidades por longo período de tempo, com uso de sais que apresentam gradiente de densidade como

o CsCl ou o trifluoroacetato de cério (CsTFA). Ao longo do processo de extração, o RNA se posiciona no gradiente de densidade desses sais, em uma faixa que corresponde à sua própria densidade²¹ e, assim, pode ser isolado.

É usada uma grande concentração dos sais do metal pesado cério, cujos íons são lentamente levados para o fundo do tubo durante a centrifugação, formando um gradiente contínuo de densidade na coluna líquida presente no tubo. Com o tempo, a tendência de os íons se concentrarem no fundo é contrabalanceada pela tendência de eles se dispersarem por difusão, estabilizando o gradiente. À medida que o gradiente se forma, as moléculas de RNA são levadas para o fundo do tubo ou flutuam até encontrarem uma posição, onde sua densidade de flutuação equivale à sua densidade natural e onde ficam paradas com estabilidade⁴¹.

Para a extração do RNA, inicialmente a amostra é misturada com tiocianato de guanidina e CsCl ou CsTFA e, posteriormente, submetida à centrifugação. A fração de densidade correspondente ao RNA é separada, e o RNA é precipitado com etanol. O uso da guanidina permite, assim como nos outros métodos de extração, inibir a ação das RNases. A sensibilidade e precisão do gradiente de densidade formado permite a separação de moléculas puras de RNA^{21,22}. Essa técnica é tão sensível que pode separar RNAs com pequenas diferenças na composição de bases. As desvantagens desse método são a necessidade de tempo prolongado para centrifugação ou de uma ultracentrífuga.

25.9 SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE EXTRAÇÃO DE RNA

Existem empresas que disponibilizam equipamentos que permitem a extração de ácidos nucleicos de modo totalmente automatizado, ou com uso dos kits comerciais ou com protocolos próprios para os equipamentos. Por meio dessas tecnologias, um maior número de amostras pode ser processado ao mesmo tempo e com menor possibilidade de erro.

Um sistema universal de extração automatizado de RNA da Qiagen chama-se BioRobot. Esse sistema é baseado na ligação do RNA à fase sólida, lavagem desta e eluição do RNA, e permite o processamento de 96 amostras por análise. A Qiagen também possui o sistema robótico QIAcube, que automatiza a extração com os kits baseados em coluna*.

* Ver www.qiagen.com.

A Invitrogen-Life Technologies possui o iPrep™, o qual faz extração automatizada de ácidos nucleicos usando a tecnologia de adsorção a esferas magnéticas. Esse equipamento permite o processamento de 12 amostras em até 30 minutos*.

A Promega possui o sistema Maxuell®, que também usa a tecnologia de esferas magnéticas para extração de até 16 amostras em menos de 45 minutos**.

A Roche Diagnostics possui o equipamento MagnaPure, que realiza até 32 extrações por corrida***.

Além dessas empresas, outras também oferecem sistemas automatizados não só para extração do RNA, mas também para amplificação, quantificação e detecção do RNA, como a Roche Diagnostics, que possui a plataforma Cobas® Ampliprep/Cobas TaqMan.

Embora esses equipamentos tenham custo elevado, manutenção dispendiosa e grande gasto de descartáveis e reagentes próprios, fornecem uma alternativa eficiente para laboratórios com alta demanda de análises.

25.10 COMPARAÇÃO ENTRE AS PRINCIPAIS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE RNA

A técnica ideal de extração seria aquela que disponibilizasse grande quantidade de RNA puro e intacto, de modo rápido e reprodutível, com pouco custo e capaz de permitir extração de grande número de amostras simultaneamente. No entanto, nem todas as técnicas disponíveis apresentam todas essas qualidades juntas. Cada técnica tem vantagens e desvantagens que devem ser revisadas antes de um laboratório decidir qual delas lhe é mais adequada. Abaixo, será feito um resumo dos achados de vários trabalhos que comparam diferentes técnicas de extração de RNA quanto às características de quantidade e pureza do RNA, qualidade da inativação de RNAses, custo, rapidez e reprodutividade que cada técnica apresenta. Vale lembrar que dentro da mesma técnica, os variados protocolos também apresentam diferenças.

Poma e colaboradores⁴⁹ compararam três kits comerciais baseados em minicolunas de sílica quanto à quantidade de RNA recuperada, eficiência da posterior amplificação e presença de inibidores de reações moleculares no

* Ver www.lifetechnologies.com.

** Ver www.promega.com.br.

*** Ver www.roche.com.br.

RNA extraído. Os kits comerciais foram *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qia-gen), *PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit* (Invitrogen-Life Technologies) e *NulceoSpin® RNA Virus* (Macherey-Nagel). Segundo os autores, o kit da Invitrogen-Life Technologies apresentou maior eficiência na amplificação do RNA extraído por qRT-PCR, mesmo na presença de inibidores da PCR nas amostras. Isso se deve à maior capacidade desse kit de eliminar contaminantes e, portanto, de purificar o RNA. Substâncias que inibem a PCR e devem ser eliminadas no processo de extração do RNA são: íons de ferro e cálcio, ácido húmico⁵⁰, tanino⁵¹, grupo heme, heparina, anticorpos, lipídeos^{52,53} e tiocianato de guanidina. Essas variações na eficiência da amplificação do RNA entre kits de extração pode ser ocasionada por diferenças na natureza das colunas e dos tampões de lise e lavagem⁴⁹.

Kurar e colaboradores⁵⁴ compararam cinco protocolos para extração de RNA, sendo três baseados na extração orgânica (TRIzol – Invitrogen-Life Technologies, TRIityd – Applichem e EZ-RNA – Omega Bio-Tek) e dois baseados em colunas (UltraClean™ – MO-BIO Laboratories e E.Z.N.A.® – Biological Industries). A comparação foi feita em relação à quantidade e qualidade do RNA e à eficiência da amplificação na RT-PCR. O protocolo que disponibilizou menor quantidade de RNA foi o EZ-RNA, e o que disponibilizou maior quantidade foi o UltraClean™. Os protocolos baseados em colunas precisaram de digestão com enzima que digere DNA (DNase-I), pois apresentaram muita contaminação com DNA. Os cinco protocolos extraíram RNA puro (após digestão com DNase-I), diferindo na quantidade do RNA isolado⁵⁴. Quanto a esse fato, Deng e colaboradores³³ afirmaram que protocolos de extração de RNA orgânica podem ter menor contaminação com DNA quando a coleta da fase aquosa ocorre sem nenhum contato com as outras fases, e o trabalho de Phongsisay e colaboradores⁵⁵ afirma que independentemente do protocolo deve ser usada a digestão com DNase-I para evitar contaminação com DNA e futuros erros na interpretação da RT-PCR. No uso de colunas, o erro do manipulador é bem menos frequente e o processo de extração é simples, mas, como mostrado no trabalho de Kurar e colaboradores⁵⁴, a digestão com DNase-I é indispensável. Esses autores, assim como Bustin⁵⁶, ainda sugerem que o tratamento com DNase-I seja feito apenas na alíquota de RNA a ser usada na análise molecular, e que o RNA a ser armazenado não deve passar pela digestão até ser usado. Isso para evitar que a solução de DNase-I, que pode estar contaminada com RNase, degrade também o RNA. Kurar e colaboradores⁵⁴ também sugerem que o melhor método para conservação do RNA extraído é a produção do

DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa e o armazenamento deste, que é bem mais estável que o RNA.

Em 2011, Dettogni e Louro⁷ compararam a extração do RNA do DENV-2 a partir de plasma humano com uso do *QIAamp® UltraSens Virus Kit* (Qiagen) e do método de Chomzynski e Sacchi (1987)²⁵. No estudo, de 47 amostras de pacientes com diagnóstico clínico da dengue, 34 foram positivas para a presença do DENV-2 pela RT-PCR com o RNA extraído pela extração orgânica e 27 com o RNA extraído pelo kit. Além disso, o estudo mostrou que a extração orgânica isolou RNA com quantificações maiores que o kit⁷.

De Paula e colaboradores¹² compararam três métodos para extração do RNA do DENV: *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*, método de Chomzynski-Sacchi e TRIzol®. De cem amostras analisadas pela RT-PCR, nenhuma foi positiva após extração do RNA por TRIzol® ou pelo método de Chomzynski e Sacchi e seis foram positivas após extração do RNA pelo kit. Assim, segundo os autores, o método mais indicado para extração do RNA para diagnóstico molecular da dengue é o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*.

Um trabalho desenvolvido por Verheyden e colaboradores e publicado em 2003²⁰ comparou três métodos para extração de RNA viral: método de Chomczynski-Sacchi, o kit PURE-SCRIPT® (Gentra Systems), baseado na precipitação diferencial do RNA e o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*. Nesse trabalho, o método menos sensível foi o de Chomczynski-Sacchi e o mais indicado também foi o kit da Qiagen, por sensibilidade e rapidez na extração do RNA.

Fransen e colaboradores, em 1998¹⁹, publicaram um trabalho comparando sete diferentes métodos para extração do RNA do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os métodos foram: *High Pure Viral* (Boehringer), *RNA kit* (Mannheim), *RNA Insta-Pure LS* (Eurogentec), *PANext RNA Extraction Kit I* (NTL/PAN systems), *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*, técnica de Chomczynski-Sacchi, extração descrita por Boom e colaboradores em 1990²⁹ e extração descrita por Mathy e colaboradores (1996)⁵⁷. O estudo recomendou o kit da Qiagen como o método mais rápido, sensível e de preço acessível para extração do RNA de grande número de amostra.

Verhofstede e colaboradores em 1996²⁷ compararam oito métodos para extração do RNA do HIV: TRIzol®, técnica de Boom e colaboradores²⁹, RNeasy (Qiagen), NASBA (Organon Teknika), Isoquick (Microprobe), técnica de Chomczynski-Sacchi²⁵, RNAID (Bio-101) e Ultraspec (Biotex). Segundo o estudo, a técnica de Chomczynski-Sacchi foi o método que apresentou melhores resultados após análise pela RT-PCR, com maior

sensibilidade e reprodutividade. Os autores lembram, no entanto, que esse método é demorado, pouco vantajoso quando existem muitas amostras a serem analisadas e fácil de passar por erros de contaminação, mistura de amostras e manipulação. Para laboratórios de ampla escala, o estudo recomendou o uso do TRIzol[®], que consegue extrair o RNA com bons resultados em apenas duas horas e com menos trabalho.

Fanson e colaboradores (2000)⁴⁷ compararam a extração do RNA de vírus causadores de hepatites por um método orgânico e pelo *QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit*. Nesse trabalho, o kit comercial apresentou uma sensibilidade aproximadamente dez vezes menor que a extração orgânica, apesar de ser finalizado em um tempo consideravelmente menor. Assim, os autores recomendam que quando a sensibilidade é indispensável para análises futuras, a extração orgânica é a melhor escolha; e caso um processo menos trabalhoso e demorado seja a prioridade, o kit baseado em colunas de sílica é o método mais indicado⁴⁷.

Inúmeros outros trabalhos científicos comparam diferentes técnicas para extração do RNA viral e apresentam conclusões variadas, ora indicando um método, ora indicando outro. Essa situação ocorre porque há muitas variáveis envolvidas no sucesso ou não de alguma técnica. Um exemplo de variável que influencia as conclusões dos trabalhos é a época específica em que os vírus estão presentes nas amostras. Uma técnica de extração somente terá sucesso caso a coleta da amostra seja feita no período adequado. O DENV, por exemplo, permanece na circulação sanguínea até o sexto dia de sintomas da dengue; após esse tempo a quantidade de vírus na circulação é tão pequena que a extração não é mais possível e o método de diagnóstico passa a ser a sorologia, para detecção de anticorpos contra o DENV. Assim, trabalhos que não coletaram as amostras no período certo podem ter cometido erros em suas conclusões. A comparação de métodos que usam quantidades iniciais diferentes de amostra também pode levar a conclusões equivocadas, como relatado por de Paula e colaboradores, uma vez que a quantidade inicial da amostra pode influenciar o resultado das análises moleculares, através da presença relativa de inibidores da PCR¹². Um terceiro exemplo importante de variável é a ocorrência de erros de manipulação durante o processo de extração, os quais podem levar a resultados falsos negativos, como já descrito anteriormente neste capítulo, por degradação do RNA por RNAses, por pipetagem errada etc.

De modo geral, com o auxílio dos variados trabalhos mostrando as vantagens e desvantagens de cada método disponível para extração do RNA

viral, cada laboratório deve escolher dentre os métodos e protocolos o que mais atende às suas necessidades.

25.11 POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS E/OU INDUSTRIAIS

Qualquer técnica molecular para detecção de vírus com genoma de RNA, como o DENV, é iniciada, como já dito, pela etapa da transcrição reversa, na qual uma enzima chamada transcriptase reversa produz uma molécula de DNA usando o RNA viral como molde. Essa enzima atua como uma DNA polimerase dependente de RNA, ou seja, uma enzima que é capaz de realizar um processo contrário à transcrição comum às células, em que uma RNA polimerase DNA dependente produz uma molécula de RNA a partir de uma molécula de DNA. O isolamento da transcriptase reversa de um retrovírus (vírus com genoma de RNA e que utiliza a transcriptase reversa para a replicação do seu material genético), como o vírus da mieloblastose aviária (*avian myeloblastosis virus* – AMV) ou o vírus da leucemia murina de Moloney (*Monoley murine leukemia virus* – MMLV), permitiu que a transcrição reversa fosse feita *in vitro*, em uma etapa anterior à PCR, a qual, então, amplifica o DNA. Inicialmente, em um tubo de polipropileno mistura-se o RNA extraído, um segmento pequeno de ácido nucleico chamado *primer*, que irá servir como iniciador para a enzima sintetizar o fragmento de interesse, e água ultrapura. A solução é incubada a 75 °C para que o RNA seja aberto, ou seja, desenrolado e, portanto, esteja disponível para servir como molde para a síntese do DNA. Posteriormente adiciona-se ao tubo um tampão adequado para a atividade enzimática, a transcriptase reversa, didesoxinucleotídeos (dNTPs) e água ultrapura se necessário. A solução é então incubada a uma temperatura ideal para a atividade enzimática, para a síntese do DNA e, posteriormente, a uma temperatura elevada, para que a enzima seja inativada e pare a síntese. A molécula de DNA de fita simples produzida *in vitro* pela transcrição reversa chama-se cDNA, o qual, amplificado, pode ser usado nas inúmeras técnicas moleculares.

O diagnóstico das doenças transmitidas por vírus foi revolucionado pelo desenvolvimento das técnicas moleculares de detecção viral, principalmente as variadas formas de uso da PCR. Com sua sensibilidade, agilidade e facilidade na detecção de sequências genômicas virais, as técnicas moleculares têm hoje uma grande aplicação nos ramos clínico e científico. Uma grande mudança da PCR convencional foi a invenção da chamada PCR em tempo real, que, como já dito, melhorou a contribuição da PCR ao diagnóstico

viral, no sentido de ter maior sensibilidade, maior capacidade de amplificação genômica e ainda potencial de quantificar, além de qualificar, a sequência amplificada. Na qRT-PCR em tempo real, as sequências virais são, além de detectadas, quantificadas a cada ciclo de amplificação por contínua determinação de um sinal de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade de DNA presente após cada ciclo da PCR.

A sensibilidade de muitas técnicas moleculares é grande o suficiente para conseguir detectar o vírus em amostras com até menos de dez cópias virais, caso a amostra seja coletada na época certa, armazenada corretamente e o método de extração seja eficiente^{36,58}. Essa vantagem é importante na detecção dos vírus em formas assintomáticas e em pacientes submetidos a terapias, situações nas quais, possivelmente, a carga viral no paciente está baixa.

Em determinadas análises, uma única reação da PCR, de 25 a 40 ciclos, é capaz de detectar o vírus, porém em várias ocasiões a sensibilidade na detecção precisa ser maior. Nesses casos, são aplicadas outras técnicas moleculares além da PCR convencional, para que ciclos adicionais de amplificação possam aumentar em até cem vezes a sensibilidade da detecção do vírus³⁶.

A PCR e suas variações têm grande importância não só no diagnóstico da dengue, mas também na vigilância epidemiológica e em estudos de eficácia de vacinas testes e de drogas antivirais. Muitos protocolos da PCR são chamados de PCR Multiplex, pois possuem uma combinação de iniciadores para a DNA polimerase que permite detectar a presença dos quatro vírus da dengue de uma só vez, em um só tubo de ensaio. Com a PCR, amostras estocadas por longos períodos podem ter o vírus detectado, e os sorotipos virais circulantes em um determinado momento de local podem ser identificados. Os protocolos da RT-PCR em tempo real permitem, além de todas essas aplicações da PCR convencional, medir a carga viral de uma amostra. Assim, permite a obtenção de informações da dinâmica de uma infecção, da interação do homem com o vírus e da resposta de algum antiviral, o que é importante no prognóstico de um paciente, servindo como um guia do sucesso da terapia^{9,10,59}.

Além dessas técnicas importantes no diagnóstico, um método molecular pós-PCR, denominado sequenciamento nucleotídico, tem importante participação nos estudos virais. O sequenciamento de nucleotídeos dos produtos da PCR permite estudar a variabilidade genética das cepas virais, identificar a rota de origem de uma epidemia e determinar marcadores de virulência, além de fornecer dados para que medicamentos possam acompanhar a alta frequência de mutação viral sem perder sua eficácia. Com as sequências virais estabelecidas por sequenciamento, também podem ser feitos estudos

filogenéticos, que determinam a relação evolutiva entre organismos por meio de seus dados moleculares. Esses estudos podem classificar os quatro sorotipos do DENV em subtipos e genótipos virais, facilitando a caracterização do vírus circulante em uma epidemia¹.

25.12 TÉCNICA PASSO A PASSO

25.12.1 Método de extração por tiocianato ácido de guanidina-fenol-clorofórmio desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987)²⁵, com modificações

Chomczynski e Sacchi²⁵ desenvolveram o protocolo para extração de RNA a partir de células cultivadas ou tecidos e, com modificações, essa técnica pôde ser aperfeiçoada para extração de RNA do DENV a partir de plasma humano. A técnica desenvolvida para a extração do RNA do DENV a partir de plasma humano está descrita a seguir e ilustrada na Figura 25.7.

Soluções usadas no protocolo

- Solução desnaturante ou solução D (tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sódio 25 mM, pH 7,0; sarcosil líquido 0,5% e água deionizada). Para o preparo da solução estoque, os reagentes são dissolvidos por 10 minutos a 37 °C. A solução deve ser congelada ou usada em até três meses se mantida em temperatura ambiente.
- β -met 0,1 M. Antes do uso da solução D no protocolo de extração, essa deve ser misturada com o β -met.
- Fenol saturado com água (20 mililitros (mL) de fenol de alto grau de pureza e 20 mL de água destilada). O fenol deve ser descongelado a 60 °C e então adicionado à água e a solução é misturada por vórtex. A solução é centrifugada a 600 \times g por 10 minutos e posteriormente a parte aquosa é removida. O fenol saturado com água pode ser estocado por 30 dias a 4 °C) acetato de sódio 2 M pH 4,0 (acetato de sódio triidratado e água destilada). O acetato deve ser dissolvido na água e o pH ajustado com uso de ácido acético glacial.
- Clorofórmio.
- Álcool isoamílico.
- Isopropanol.

- Solução de glicogênio.
- Etanol 70%.

Procedimentos

- 1) Inicialmente uma alíquota de 900 μL de plasma é dividida igualmente em 3 tubos de polipropileno de 1,5 mL de capacidade (300 μL de plasma em cada tubo).
- 2) A solução D é descongelada a 37 °C e o β -met é adicionado à quantidade de solução D que será usada, na concentração de 0,1 M. Estando a solução preparada, 300 μL de solução D (com o β -met) são adicionados aos tubos com o plasma e a mistura é homogeneizada.
- 3) O próximo passo é o preparo da solução de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 49:1. Aos tubos são então adicionados: 600 μL de fenol saturado com água; 60 μL de acetato de sódio e 120 μL de clorofórmio/álcool isoamílico. A mistura é homogeneizada em vórtex por 10 segundos (s) e incubada a -20 °C por 15 minutos.
- 4) Após esse tempo, os tubos são centrifugados a 13.150 \times g por 15 minutos para a formação das três fases: a fase orgânica inferior, a fase aquosa superior e a fase esbranquiçada intermediária. A fase aquosa (aproximadamente 600 μL) é transferida cuidadosamente para outros três tubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL e a eles é adicionado igual volume de isopropanol, ou seja, se em cada tubo forem adicionados 600 μL de fase aquosa, também serão adicionados 600 μL de isopropanol a cada tubo. Uma quantidade de 2,0 μL de solução de glicogênio pode ser acrescentada para facilitar a visualização do *pellet* de RNA que será formado no próximo passo.
- 5) Para a precipitação do RNA, os tubos são incubados a -20 °C por 16 horas e posteriormente centrifugados a 13.150 \times g por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante é descartado e o *pellet* com o RNA estará formado e, se visível, terá aspecto esbranquiçado.
- 6) Para hidratação do RNA é adicionado 1,0 mL de etanol 70% aos tubos, os quais são centrifugados a 13.150 \times g por 2 minutos. Esse etanol é então cuidadosamente descartado por completo, e os tubos são virados com a abertura para baixo para secarem completamente à temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos).
- 7) Estando os tubos secos, o RNA pode ser dissolvido: o *pellet* de um dos tubos é dissolvido em 30 μL de água livre de RNAses e posteriormente o *pellet* dos outros dois tubos são dissolvidos com essa mesma água para

concentrar o RNA dos três tubos em um só. Esse RNA extraído deve ser usado imediatamente nas análises moleculares ou armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para não ser degradado. Caso as análises moleculares não possam ser realizadas todas ao mesmo dia, uma opção é sintetizar o cDNA a partir do RNA extraído por transcrição reversa e então armazenar esse cDNA, que por ser estável, pode ficar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sem ser degradado.

Extração Orgânica do RNA do Vírus da Dengue

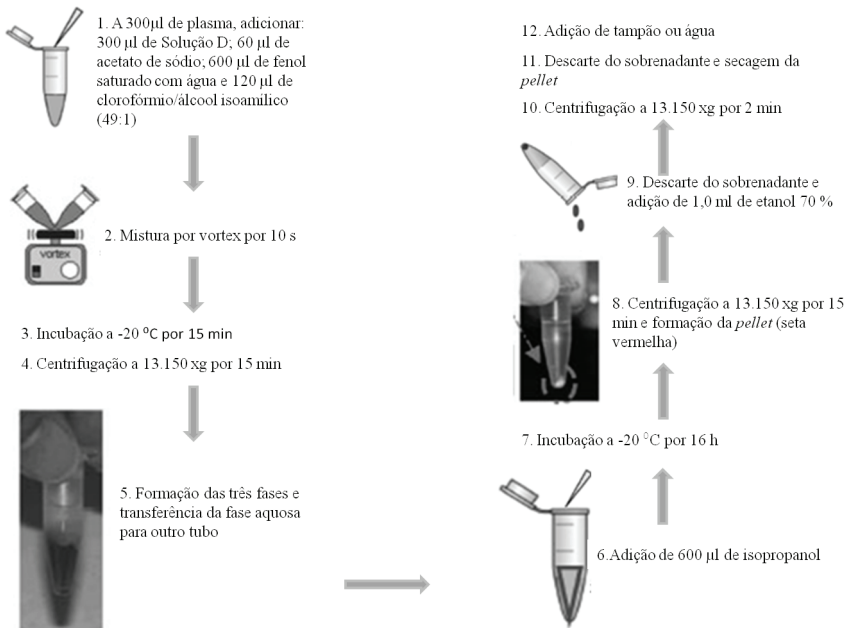


Figura 25.7 Etapas da extração orgânica do RNA do vírus da dengue.

25.13 CONCLUSÕES

Devido à falta de uma vacina eficaz e às dificuldades na erradicação do mosquito vetor, as opções para prevenção e controle das epidemias de dengue são limitadas. Assim, o rápido e eficiente diagnóstico molecular da dengue e a epidemiologia molecular viral são indispensáveis. Um diagnóstico precoce é importante para o início adequado do tratamento e acompanhamento dos pacientes. Estudos da genética viral são imprescindíveis para o

desenvolvimento de vacinas e terapias, e para o conhecimento geral do vírus. Os estudos de vigilância epidemiológica e monitoramento viral são fundamentais para o conhecimento das epidemias, da circulação dos sorotipos e subtipos e, conseqüentemente, para a implementação de medidas de controle da infecção. Todas essas análises moleculares iniciam-se pela etapa crucial comentada neste capítulo, a extração do material genético viral. Assim, pode-se ver a importância do estudo detalhado dos métodos aplicados na extração do RNA, da comparação entre eles, do modo como solucionar os problemas envolvidos no processo de extração, das necessidades especiais envolvidas na manipulação de RNA e, por fim, da disponibilização de dados suficientes para que laboratórios clínicos e de pesquisa possam escolher o método mais adequado em suas extrações.

25.14 PERSPECTIVAS FUTURAS

O rápido crescimento do número de publicações sobre análises moleculares tanto qualitativas como quantitativas demonstra o aumento da importância dessas análises nas áreas científica e clínica. Uma vez que a biologia molecular evoluiu e contribuiu de maneira importante para a pesquisa viral e para o diagnóstico das viroses, há um aumento da consciência sobre a necessidade da garantia da qualidade das análises moleculares. A natureza da PCR apresenta várias limitações difíceis de controlar, particularmente em virologia, campo em que a heterogeneidade do genoma viral, além da variedade de amostras, pode levar a desempenhos inadequados das análises. Assim, é clara a necessidade não só na garantia da qualidade, mas também do estabelecimento de processos moleculares totalmente automatizados, para reduzir o tempo de análise e, principalmente, os erros por variação de manipulador ou laboratório. Essas necessidades deverão levar a um aumento de estudos para melhorar a compreensão do que envolve as tecnologias moleculares e explorar ainda mais essas ferramentas a favor do controle das infecções virais.

REFERÊNCIAS

1. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002;2(1):33-42.
2. WHO. State of the art of new vaccines: research and development initiative for vaccine research. World Health Organization. 2003:1-74.
3. Satish NVT, Abraham P, Sridharan G. Dengue fever: it's laboratory diagnosis with special emphasis on IgM detection. *WHO Dengue Bull*. 2003;27:106-25.
4. Holmes EC. The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Foundation Symposium*. 2006;277:177-87. Discussion 87-92, 251-3.
5. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, et al. *Flaviviridae*. *Intervirology*. 1985;24(4):183-92.
6. WC B. Mapeamento das arboviroses no estado de Rondônia. Manaus: Universidade Federal do Amazonas (UFAM); 2007.
7. Dettogni RS, Louro ID. Dengue virus RNA purification from human plasma: a comparison of two techniques. *Molecular Biology Reports*. 2011;38(8):4979-83.
8. Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *Journal of Biosciences*. 2008;33(4):617-28.
9. Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(2-3):254-98.
10. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(11):5189-98.
11. Zhong JF, Weiner LP, Burke K, Taylor CR. Viral RNA extraction for in-the-field analysis. *Journal of Virological Methods*. 2007;144(1-2):98-102.
12. De Paula SO, Nunes C, Matos R, de Oliveira ZM, Lima DM, da Fonseca BA. Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 2001;98(2):119-25.
13. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(9):2634-9.
14. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30(3):545-51.
15. Deubel V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. In: Gubler DJ KG, editor. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. London: CAB International; 1997. p. 335-66.

16. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000;181(1):2-9.
17. Vorndam V, Kuno G, Rosado N. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *Journal of Virological Methods*. 1994;48(2-3):237-44.
18. Wang WK, Lee CN, Kao CL, Lin YL, King CC. Quantitative competitive reverse transcription-PCR for quantification of dengue virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(9):3306-10.
19. Fransen K, Mortier D, Heyndrickx L, Verhofstede C, Janssens W, van der Groen G. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of seven different methods for extraction (part two). *Journal of Virological Methods*. 1998;76(1-2):153-7.
20. Verheyden B, Thielemans A, Rombaut B, Kronenberger P. RNA extraction for quantitative enterovirus RT-PCR: comparison of three methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003;33(4):819-23.
21. Vomelova I, Vanickova Z, Sedo A. Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biologica*. 2009;55(6):243-51.
22. Glisin V, Crkvenjakov R, Byus C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*. 1974;13(12):2633-7.
23. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979;18(24):5294-9.
24. Feramisco JR, Smart JE, Burridge K, Helfman DM, Thomas GP. Co-existence of vinculin and a vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(18):11024-31.
25. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
26. Dettogni RS, Louro ID. Dengue Virus RNA Extraction Challenges. In: Zhou C LX, editor. *DNA Binding and DNA Extraction: Methods, Applications and Limitations*. New York: Nova Science Publishers; 2011. p. 155-64.
27. Verhofstede C, Fransen K, Marissens D, Verhelst R, van der Groen G, Lauwers S, et al. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods. *Journal of Virological Methods*. 1996;60(2):155-9.
28. Marko MA, Chipperfield R, Birnboim HC. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Analytical Biochemistry*. 1982;121(2):382-7.
29. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(3):495-503.

30. Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(7):738-9.
31. Prado I, Rosario D, Bernardo L, Alvarez M, Rodriguez R, Vazquez S, et al. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. *Journal of Virological Methods*. 2005;125(1):75-81.
32. Ravaggi A, Primi D, Cariani E. Direct PCR amplification of HCV RNA from human serum. *PCR Methods and Applications*. 1992;1(4):291-2.
33. Deng MY, Wang H, Ward GB, Beckham TR, McKenna TS. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2005;17(6):574-8.
34. Melo MR, Martins AR, Barbosa IV, Romano P, Shcolnik W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2010;46(5):375-81.
35. Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*. 1997;276(5318):1558-60.
36. Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. Molecular diagnosis of medical viruses. *Current Issues in Molecular Biology*. 2007;9(2):87-102.
37. Gordon JA. Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins. *Biochemistry*. 1972;11(10):1862-70.
38. Nozaki Y, Tanford C. The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *The Journal of Biological Chemistry*. 1970;245(7):1648-52.
39. Mason PW, McAda PC, Mason TL, Fournier MJ. Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. *Virology*. 1987;161(1):262-7.
40. Nelson DL, Cox M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed; 2011.
41. Karp G. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos*. São Paulo: Manole; 2005.
42. Ovcharenko D, Jarvis R, Hunicke-Smith S, Kelnar K, Brown D. High-throughput RNAi screening in vitro: from cell lines to primary cells. *RNA*. 2005;11(6):985-93.
43. Huang C, Zhang X, Lin Q, Xu X, Hu Z, Hew CL. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*. 2002;1(3):223-31.

44. Iwami M, Tanaka A, Hano N, Sakurai S. Bombyxin gene expression in tissues other than brain detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ hybridization. *Experientia*. 1996;52(9):882-7.
45. Fenton RA, Chou CL, Stewart GS, Smith CP, Knepper MA. Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(19):7469-74.
46. Tolosa JM, Schjenken JE, Civiti TD, Clifton VL, Smith R. Column-based method to simultaneously extract DNA, RNA, and proteins from the same sample. *BioTechniques*. 2007;43(6):799-804.
47. Fanson BG, Osmack P, Di Bisceglie AM. A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *Journal of Virological Methods*. 2000;89(1-2):23-7.
48. Siddappa NB, Avinash A, Venkatramanan M, Ranga U. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. *BioTechniques*. 2007;42(2):186, 8-92.
49. Poma HR, Davies C, Gutierrez Cacciabue D, Mora MC, Basombrio MA, Rajal VB. Comparison of nucleic acid extraction efficiency using different commercial kits and qPCR. Effect of inhibitors. *Revista Argentina de microbiologia*. 2012;44(3):144-9.
50. Schriewer A, Wehlmann A, Wuertz S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *Journal of Microbiological Methods*. 2011;85(1):16-21.
51. Kontanis EJ, Reed FA. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *Journal of Forensic Sciences*. 2006;51(4):795-804.
52. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(2-3):95-125.
53. Nolan T, Hands RE, Ogunkolade W, Bustin SA. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Analytical Biochemistry*. 2006;351(2):308-10.
54. Kurar E, Atlı MO, Guzeloglu A, Ozsensoy Y, Semacan A. Comparison of Five different RNA isolation methods from equine endometrium for gene transcription analysis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2010;16(5):851-5.
55. Phongsisay V, Perera VN, Fry BN. Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*. 2007;68(2):427-9.
56. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2002;29(1):23-39.

57. Mathy NL, Lee RP, Walker J. Removal of RT-PCR inhibitors from RNA extracts of tissues. *BioTechniques*. 1996;21(5):770, 2, 4.
58. Prada-Arismendy J, Castellanos JE. Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombia Médica*. 2011;42(2):243-8.
59. Yeh HY, Yates MV, Chen W, Mulchandani A. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2009;20(1):49-54.