

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MURILLO EMERY DE CARVALHO NETO

dsRNA: estudo com concentrações de IPTG, meios de produção e viabilidade de uso após armazenamento em diferentes temperaturas

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MURILLO EMERY DE CARVALHO NETO

dsRNA: estudo com concentrações de IPTG, meios de produção e viabilidade de uso após armazenamento em diferentes temperaturas

Relatório final, apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2025

MURILLO EMERY DE CARVALHO NETO

dsRNA: estudo com concentrações de IPTG, meios de produção e viabilidade de uso após armazenamento em diferentes temperaturas

Relatório final, apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

APROVADO EM:

Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes
(Orientador)
(UFV)

Dr. Pedro Augusto Braga dos Reis
(UFV)

Dra. Isabela Malaquias Dalto de Souza
(UFV)

MURILLO EMERY DE CARVALHO NETO


dsRNA: estudo com concentrações de IPTG, meios de produção e viabilidade de uso após armazenamento em diferentes temperaturas

Relatório final, apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biologia.


Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

APROVADO EM: 05/12/2025

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 MURILLO EMERY DE CARVALHO NETO
Data: 12/12/2025 09:40:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Murillo Emery de Carvalho Neto
Autor

Documento assinado digitalmente
 TIAGO ANTONIO DE OLIVEIRA MENDES
Data: 12/12/2025 09:20:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Tiago Antônio de Oliveira Mendes
Orientador

RESUMO

NETO CARVALHO, Murillo Emery, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025.
dsRNA: estudo com concentrações de IPTG, meios de produção e viabilidade de uso após armazenamento em diferentes temperaturas. Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

O RNA de fita dupla (dsRNA) apresenta grande potencial como tecnologia alternativa a ser utilizada em diversas áreas do conhecimento, inclusive para a produção de insumos agrícolas, sendo usado para o controle de pragas (bioinseticidas) e doenças em plantas, além de poder auxiliar no desenvolvimento de plantas com características agronômicas desejáveis ou, ainda, serem usados como promotores de crescimento. Entretanto, a manutenção de sua estabilidade durante o armazenamento é um desafio para sua aplicação, sendo necessário estudos que avaliem qual temperatura é ideal para que sua eficácia seja mantida durante um maior período de tempo. Neste estudo, avaliou-se a estabilidade do dsRNA produzido em *Escherichia coli* HT115, cultivada nos meios LB e TB, submetida à indução com diferentes concentrações de IPTG (0,5 mM; 0,75 mM; 1 mM) em temperaturas de 30 °C e 37 °C. As amostras foram extraídas, quantificadas e armazenadas em três diferentes temperaturas: 4 °C, -20 °C e -80 °C, sendo analisadas por eletroforese em gel de agarose após 15, 30 e 45 dias; nesse mesmo intervalo de tempo foi realizada a quantificação das amostras pelo NanoDrop™ 2000. Após 45 dias de avaliações qualitativas e quantitativas, verificou-se que o dsRNA produzido a 37 °C apresentou a maior estabilidade, independentemente da temperatura de armazenamento, permanecendo íntegro por todo o período analisado. Concentrações menores de IPTG (0,5 mM) aceleraram a degradação do dsRNA, e o meio LB mostrou-se mais eficiente do que o TB na preservação da estabilidade. Em contraste, o dsRNA produzido a 30 °C apresentou baixa atividade já no momento da extração e sofreu degradação acentuada em todas as condições avaliadas. Esses achados contribuem para definir parâmetros mais adequados de produção, formulação e armazenamento de dsRNA para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: dsRNA, otimização, RNA de interferência.

ABSTRACT

NETO, Murillo Emery C., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025. **dsRNA: study with IPTG concentrations, production means and viability of use after storage at different temperatures.** Advisor: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

Double-stranded RNA (dsRNA) holds great potential as an alternative technology to be used in various fields of knowledge, including the production of agricultural inputs. It can be used for pest control (bioinsecticides) and plant disease management, as well as assisting in the development of plants with desirable agronomic traits or even functioning as growth promoters. However, maintaining its stability during storage remains a challenge for its application, making it necessary to conduct studies to determine the ideal temperature to preserve its effectiveness over longer periods. In this study, the stability of dsRNA produced in *Escherichia coli* HT115 was evaluated. The bacteria were cultured in LB and TB media and induced with different IPTG concentrations (0.5 mM; 0.75 mM; 1 mM) at temperatures of 30 °C and 37 °C. The samples were extracted, quantified, and stored at three different temperatures: 4 °C, -20 °C, and -80 °C. They were analyzed by agarose gel electrophoresis after 15, 30, and 45 days. During the same time intervals, the samples were quantified using a NanoDrop™ 2000. After 45 days of qualitative and quantitative evaluations, it was found that the dsRNA produced at 37 °C showed the highest stability, regardless of storage temperature, remaining intact throughout the analyzed period. Lower IPTG concentrations (0.5 mM) accelerated dsRNA degradation, and LB medium proved more efficient than TB in preserving stability. In contrast, the dsRNA produced at 30 °C showed low activity already at the time of extraction and underwent significant degradation under all evaluated conditions. These findings contribute to defining more suitable parameters for the production, formulation, and storage of dsRNA for biotechnological applications.

Keywords: dsRNA, optimization, RNA interference.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	9
1. REVISÃO DE LITERATURA	10
1.1. Fundamentos do RNA de interferência (RNAi) e do dsRNA.....	10
1.1.1. Mecanismo de ação do RNAi: papel do dsRNA na regulação gênica.....	10
1.1.2. Aplicações do RNAi em pesquisa biológica, controle de pragas, terapias e biotecnologia.....	11
1.1.3. Características estruturais e funcionais do dsRNA: tamanho, conformação, estabilidade intrínseca.....	12
1.2. Fatores que afetam a estabilidade do dsRNA.....	12
1.2.1. Influência de variáveis ambientais (temperatura, pH, luz, umidade, íons metálicos).....	12
1.3. Métodos de armazenamento e análise da integridade do RNA.....	13
1.3.1. Estratégias para conservar dsRNA (temperaturas -80 °C, -20 °C, 4 °C).....	13
1.3.2. Técnicas para avaliação da integridade: eletroforese em gel, quantificação em nanodrop.....	14
2. OBJETIVOS	14
3. METODOLOGIA	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Concentrações do dsRNA.....	16
4.2 Integridade do dsRNA.....	24
5. CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráficos com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a 4°C, incubadas a 37°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.....	18
Figura 2 – Gráfico com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a -20°C, incubadas a 37°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.....	19
Figura 3 – Gráfico com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a -80°C, incubadas a 37°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.....	20
Figura 4 – Gráfico com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a 4°C, incubadas a 30°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.....	21
Figura 5 – Gráfico com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a -20°C, incubadas a 30°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.....	22
Figura 6 – Gráfico com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a -80°C, incubadas a 30°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.....	23
Figura 7 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 37°C com 1mM de IPTG.....	25
Figura 8 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 37°C com 0.75 mM de IPTG.....	27
Figura 9 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 37°C com 0,5 mM de IPTG.....	28
Figura 10 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 30°C com 1mM de IPTG.....	29
Figura 11 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 30°C com 0,75 mM de IPTG.....	31
Figura 12 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 30°C com 0,5 mM de IPTG.....	32

INTRODUÇÃO

Os RNA de interferência (RNAi) são RNAs não codificantes, com cerca de 20 a 30 nucleotídeos e, através das suas proteínas associadas, são capazes de controlar a expressão da informação genética, sendo capazes de formar uma ribonucleoproteína de silenciamento gênico (WILSON et al., 2013)

Diferentes tipos de materiais genéticos, como microRNAs (miRNAs), RNAs pequenos de interferência (siRNAs) e RNAs fita-dupla (dsRNAs) são capazes de desencadear o processo de RNAi (Schnettler et al 2014). Esse processo tem a habilidade de regular a expressão gênica e pode ser aplicado em diversos campos de estudo, como por exemplo vacinologia, oncologia e combate de doenças (NOORAEI et al., 2021). Outra possível aplicação é o combate de patógenos, pragas e parasitas na área de produção vegetal (PIRES et al., 2023).

A estabilidade do RNA, assim como do dsRNA, é influenciada por múltiplos fatores ambientais, A temperatura e a atividade de RNases são os principais determinantes da degradação: temperaturas elevadas aceleram drasticamente a hidrólise e atividade enzimática (KORNIENKO et al., 2024).

Outros fatores exercem efeitos moduladores. O pH do meio deve ser controlado, pois ambientes alcalinos catalisam a hidrólise das ligações fosfodiéster, enquanto variações extremas de pH, mesmo em meio ácido, podem comprometer a integridade da molécula (BAI et al., 2022). A exposição a luz UV promove danos fotoquímicos diretos, como a formação de dímeros de pirimidina e geração de radicais livres, que levam à desnaturação (KORNIENKO et al., 2024).

Moléculas de RNA de fita simples, apresentam menor estabilidade que o DNA *in vitro*, necessitando que o RNA seja armazenado em temperaturas extremamente baixas para que sua atividade seja preservada. Tendo como exemplo mais atual, as vacinas de mRNA desenvolvidas pela Pfizer-BioNTech e Moderna contra a COVID-19 demandam de ser armazenadas mantidas a -80, -60 ou -20°C para evitar a degradação e preservar sua estabilidade. Apesar da estrutura de fita-dupla do dsRNA conferir uma maior estabilidade, há incertezas quanto a sua viabilidade após longos períodos de armazenamento e ciclos de congelamento e descongelamento (BAI et al., 2022).

De acordo com Rosa et al. (2024) para avaliar a estabilidade do dsRNA após diferentes tempos e temperaturas de armazenamento, podem ser utilizadas técnicas como espectrofotometria por Nanodrop a 260nm e eletroforese em gel de agarose.

Dada a importância dessa tecnologia para diversos segmentos, faz-se necessário estudos que comprovem a estabilidade e a viabilidade do dsRNA após armazenamento em diferentes temperaturas e, também, após um período de tempo.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Fundamentos do RNA de interferência (RNAi) e do dsRNA

1.1.1. Mecanismo de ação do RNAi: papel do dsRNA na regulação gênica

Segundo MacRae et al. (2006) o RNAi é um mecanismo responsável pela regulação da expressão gênica pós-transcricional, cujo sinal chave é o dsRNA, seja de origem endógena (como precursores de miRNA) ou exógena (como genomas virais). O processo inicia-se com o reconhecimento e clivagem do dsRNA longo pela enzima Dicer, que gera pequenos fragmentos de 21 a 23 nucleotídeos, conhecidos como siRNA, ou microRNAs, quando derivados de dsRNA exógeno ou miRNA, quando originados de transcritos endógenos em estrutura *hairpin*.

Como demonstrado por Song et al. (2004) os pequenos fragmentos de RNA associam-se ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) onde a uma proteína da família *Argonaute* atua como catalisador central. No RISC, a fita guia do siRNA liga-se complementarmente ao RNA mensageiro (mRNA) alvo, direcionando sua degradação ou inibindo sua tradução, o que garante a especificidade do silenciamento. Em organismos como plantas e nematoides, ocorre uma amplificação via RNA polimerase dependente de RNA, que sintetiza dsRNAs a partir do mRNA alvo, aumentando a resposta de silenciamento (ZAMORE et al., 2000).

As funções do RNAi mediadas pelo dsRNA são diversas, incluindo a defesa antiviral, em que o dsRNA viral é convertido em siRNA que degradam genomas invasores (DING e VOINNET, 2007), e a regulação endógena de processos como desenvolvimento, metabolismo e apoptose, modulada por miRNAs (BARTEL et al., 2004). O dsRNA é essencial para o silenciamento, além de ser significativamente mais eficaz no silenciamento do que o RNA de fita simples (FIRE et al. 1998), sendo produzido principalmente por duas vias: a síntese química *in vitro*, que oferece alta pureza e especificidade de sequência, ideal para aplicações que demandam precisão (CHRISTIAENS et al 2020). Por outro lado, a produção por expressão recombinante, utilizando vetores plasmidiais ou linhagens de

bactérias, como *E. coli*, e leveduras, representam uma alternativa escalonável e de baixo custo, viabilizando o uso do RNAi em larga escala na agricultura, seja para o desenvolvimento de plantas resistentes ou para o controle de pragas por pulverização (ZHANG et al., 2017; PALLI, 2014).

1.1.2. Aplicações do RNAi em pesquisa biológica, controle de pragas, terapias e biotecnologia

Na pesquisa biológica, o RNAi revolucionou a identificação e análise de funções gênicas através de screenings genômicos. Essa abordagem possibilita uma análise sistemática em organismos-modelo, facilitando o mapeamento de genes envolvidos em vias de sinalização, ciclo celular e desenvolvimento (BOUTROS e AHRINGER, 2008). A capacidade do RNAi de silenciar genes com alta precisão permitiu o avanço de bibliotecas de shRNAs utilizadas em *screenings* de larga escala. Com essa abordagem, Schneider et al. (2021) identificaram 20 genes humanos essenciais para a replicação do SARS-Cov-2. Da mesma forma, o silenciamento em *Drosophila melanogaster* permitiu mapear genes associados a doenças neurodegenerativas (Dietzl et al., 2007). O RNAi também atua na regulação epigenética, como demonstrado em *Schizosaccharomyces pombe*, onde o complexo RITS, guiado por siRNAs, promove a metilação de histonas H3-K9 para silenciar regiões heterocromáticas (Verdel et al., 2004).

Na agricultura, formulações de dsRNA oferecem uma alternativa sustentável aos pesticidas químicos. O dsRNA direcionado a genes essenciais de insetos reduz drasticamente os danos às culturas (Baum et al., 2007). Exemplos incluem o feijão-caupi resistente ao vírus do mosaico dourado (BGMV), onde o RNAi silencia o RNA viral (Bonfim et al., 2007), e o milho modificado que expressa dsRNA contra o gene *Snf7* da *Diabrotica virgifera*, resultando em mortalidade larval (Bachman et al., 2013). Estratégias avançadas, como sprays com dsRNA encapsulado em nanopartículas de quitosana, protegem a molécula da degradação e aumentam sua eficácia (Abenaim et al., 2023). No entanto, desafios persistem, como a variabilidade na suscetibilidade entre espécies; a mariposa *Helicoverpa armigera*, por exemplo, expressa dsRNases que degradam o dsRNA exógeno (Christiaens et al., 2020).

No âmbito da medicina, terapias baseadas em RNAi já são uma realidade. O fármaco Patisiran (Onpattro®), um siRNA encapsulado em nanopartículas lipídicas, silencia o gene da transtirretina (TTR) para tratar amiloidose hereditária, com resultados clínicos satisfatórios (Adams et al., 2018). Na oncologia, siRNAs contra a mutação KRASG12D suprimiram o desenvolvimento tumoral em modelos de câncer de pâncreas (Zorde Khvalevsky et al., 2013).

Durante a pandemia de COVID-19, demonstrou-se que a encapsulação de siRNAs pode silenciar genes virais essenciais e bloquear a replicação do SARS-CoV-2 (Idris et al., 2021).

O RNAi também promove a segurança alimentar e a sustentabilidade industrial. Em soja geneticamente modificada, o silenciamento do alérgeno *Gly m Bd 28K* resultou em uma variedade hipoalergênica (Herman et al., 2003). Na biotecnologia, o fungo *Trichoderma reesei* teve sua produção de celulases aumentada pelo silenciamento de reguladores negativos, otimizando processos de biorremediação (Liu et al., 2021). Já na indústria de biocombustíveis, a expressão de shRNAs em leveduras, direcionada contra genes de armazenamento de lipídios, elevou a produção de biodiesel, destacando o potencial econômico da tecnologia (Xie et al., 2015).

1.1.3. Características estruturais e funcionais do dsRNA: tamanho, conformação, estabilidade intrínseca

Segundo Fraser et al. (2022) o dsRNA possui uma conformação helicoidal A, que difere estruturalmente da estrutura helicoidal B do DNA, possui também um diâmetro maior, sulco menor profundo e sulco maior raso, com pares de base inclinados em aproximadamente 20° em relação ao eixo helicoidal. Essa conformação permite o reconhecimento específico por proteínas-chave como a enzima Dicer e receptores como TLR3 e MDA5. De acordo com Hur S (2019), a conformação A, com 11 pares de bases por volta helicoidal, confere ao dsRNA uma resistência superior a nucleases comparada ao DNA.

Fragmentos de 21-25 pares de base são os produtos ideais da atividade da enzima Dicer, conforme demonstrado por Bernstein et al. (2001), dsRNAs com menos de 19pb não são suficientemente clivados, enquanto moléculas acima de 30pb geram múltiplos siRNAs.

A estabilidade do dsRNA é governada por múltiplos fatores: composição de bases, como demonstrado por Turner & Mathews (2010) pares de **G-C** aumentam a estabilidade térmica em 4°C por par comparado a pares de **A-C** e íons bivalentes como Mg²⁺ neutralizam cargas negativas de fosfatos, elevando a temperatura de *melting* em até 20°C.

1.2. Fatores que afetam a estabilidade do dsRNA

1.2.1. Influência de variáveis ambientais (temperatura, pH, luz, umidade, íons metálicos)

De acordo Fabre et al. (2014) a temperatura é um fator crítico para a estabilidade e viabilidade das moléculas de dsRNA, uma vez que temperaturas elevadas aceleram o processo de hidrólise do RNA e baixas temperaturas conferem melhor estabilidade para a molécula. Em pH baixo, ácido, pode ocorrer quebra das ligações de hidrogênio quando na presença de agentes caotrópicos levando o RNA a sofrer hidrólise (MOLBERT et al., 2004). Em pH elevado, básico, os íons de hidróxido quebram as ligações de fosfodiéster levando a uma cadeia de reação de quebra e a degradação da molécula, caracterizando uma hidrólise alcalina (LEMIRE et al., 2016).

Segundo Lin et al (2020) a umidade relativa do ar acima de 50% promove a hidrólise e a ação de RNases, ocasionando a degradação da molécula. Em condições moderadas, variando de 20% a 50% de umidade relativa do ar, ainda há um aumento na suscetibilidade de hidrólise e desnaturação, por outro lado baixa umidade relativa do ar, abaixo de 20%, aumentam as chances da molécula se manter estável, porém aumentam também a possibilidade de sofrer oxidação (HENEGHAN et al., 2021).

A presença de íons metálicos tem efeitos contrastantes. Íons como Cu^{2+} , Fe^{2+} e Co^{2+} atuam como catalisadores para a degradação via estresse oxidativo e hidrólise (Harris et al., 2009). Em oposição, íons como Mg^{2+} estabilizam a molécula ao neutralizar as cargas negativas do fosfato da cadeia (MULLER, 2010). Outros íons, como Mn^{2+} e Zn^{2+} , também contribuem para a estabilização estrutural e modulam a atividade de enzimas relacionadas ao RNA (STEFAN, 2006). Por fim, a exposição à luz é um fator de risco. Kornienko et al. (2024) recomendam o armazenamento no escuro, uma vez que a luz pode desencadear reações fotoquímicas que levam à degradação da molécula de RNA.

1.3. Métodos de armazenamento e análise da integridade do RNA

1.3.1. Estratégias para conservar dsRNA (temperaturas -80 °C, -20 °C, 4 °C)

Bai et al. (2022) demonstraram que o dsRNA armazenado em água livre de nucleases é rapidamente degradado à temperatura ambiente (~25 °C), perdendo completamente sua atividade em cerca de duas semanas. Em temperaturas mais baixas, como 4 °C, o dsRNA manteve integridade e atividade por até 180 dias, embora variações na concentração e pureza tenham sido observadas, provavelmente devido à degradação parcial que interfere nas leituras espectrofotométricas. Os autores também verificaram que o armazenamento a -20 °C e -80 °C preserva igualmente o dsRNA por 180 dias, sem diferenças significativas entre essas

condições. Além disso, mesmo após vários ciclos de congelamento e descongelamento, o dsRNA permaneceu estável e ativo, indicando excelente estabilidade in vitro

1.3.2. Técnicas para avaliação da integridade: eletroforese em gel, quantificação em nanodrop

A avaliação da integridade e pureza do dsRNA é uma etapa fundamental para validar o sucesso dos experimentos de RNAi. As técnicas mais utilizadas para esta finalidade são a eletroforese em gel de agarose e a espectrofotometria, esta última frequentemente realizada com equipamentos como o NanoDrop. A eletroforese em gel permite uma verificação visual direta da integridade da molécula. Uma banda única e bem definida, correspondente ao tamanho molecular esperado, confirma que o dsRNA não sofreu degradação significativa. Por outro lado, a presença de bandas difusas ou de baixa intensidade é um indicativo claro de degradação, conforme descrito por Terenius et al. (2011).

Paralelamente, a quantificação por espectrofotometria estima a concentração e avalia a pureza da amostra através das razões de absorvância. De acordo com Sambrook & Russel (2001) e Ferreira et al. (2018), uma razão A260/A280 entre 1,9 e 2,1 é considerada ideal para RNA puro, indicando baixa contaminação por proteínas. Já uma razão A260/A230 superior a 2,0 sugere contaminantes mínimos de sais ou solventes orgânicos.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Testar, visando a otimização de produção de dsRNA, diferentes meios de crescimento de bactéria, temperaturas e concentrações de IPTG e, também, avaliar durante 45 dias, o efeito de diversas temperaturas de armazenamento na viabilidade do dsRNA.

Objetivos específicos:

- 1) Analisar melhor meio de cultura para crescimento.
- 2) Avaliar a viabilidade do dsRNA de HT 115 em diferentes temperaturas de armazenamento.
- 3) Avaliar como a diferença de concentração de IPTG afeta na produção de dsRNA.

4) Avaliar qual temperatura ideal para a produção de dsRNA.

3. METODOLOGIA

3.1. Extração de dsRNA

Para a extração do dsRNA foram utilizadas células transformadas de *E. coli* HT 115, de acordo com o protocolo de Sambrook et al. (1989). Seguindo o protocolo de Papić et al (2018), foram feitos pré-inóculos das células transformadas de *E. coli* HT 115 utilizando 12 mL de meio líquido LB e TB e adicionados 12 µg/mL de ampicilina, 30 µg/mL de tetraciclina e 12 µg de HT 115 transformada. A solução foi colocada em agitação a 180 rpm por 16 horas em duas temperaturas diferentes, à 30°C e 37°C. A partir do pré-inóculo, foram feitos os inóculos, em falcons de 50 mL, utilizando 30 mL de meio LB e TB líquido, 30 µg/mL de ampicilina e 75 µg/mL de tetraciclina. Após leve agitação, foi descartado 1,5 mL da mistura e adicionado 1,5 mL do pré-inóculo, realizando-se em triplicata.

O inóculo foi levado para o espectrofotômetro para leitura da DO600 nm em cubetas, a DO inicial foi medida utilizando 1 mL de meio LB e TB para definir o branco e, após, foi utilizado 1 mL do inóculo sendo que a DO600 nm inicial deveria estar próxima de 0,05. Após a primeira leitura, o inóculo foi submetido a agitação de 180 rpm, por 3 horas, nas temperaturas de 30°C e 37°C. Em seguida foi realizada nova leitura da DO600 nm, utilizando-se as mesmas quantidades de meios e de inóculo que a leitura inicial sendo que, dessa vez, a DO600nm deveria estar entre 0,4 e 0,8.

Após a leitura, foi realizada a indução dos inóculos com diferentes concentrações de IPTG, sendo elas 0,5 mM, 0,75 mM e 1 mM e realizada outra agitação de 180 rpm, por 3 horas nas temperaturas de 30°C e 37°C.

Os falcons contendo os inóculos foram centrifugados à 4500 rpm por 10 minutos a 4°C e, após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante. O pellet contido no falcon foi ressuscitado em 5 mL de etanol 70% diluído em PBS e incubado por 5 minutos a 4°C, em seguida foram centrifugados a 10000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuscitado em 2 mL de NaCl 150 mM em água Milli-Q, incubado por 1 hora a 4°C e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo falcon onde foi adicionado 2 mL de etanol absoluto para ser novamente incubado a -20°C por, em média, 16 horas. Após esse período, o falcon foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco em

temperatura ambiente. Após secagem, o pellet foi ressuspensionado em 100 µg/mL de água livre de nuclease.

3.2. Armazenamento

O dsRNA, em triplicata técnica, foi armazenado em três diferentes temperaturas, sendo elas: 4°C, -20°C e -80°C e, a cada 15 dias, até completar 45 dias, foram realizadas avaliações de viabilidade do material (BAI et al., 2022).

3.3. Avaliações

Aos 0, 15, 30 e 45 dias após produção, o dsRNA foi quantificado em NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) para avaliar a concentração, e também foi realizada a avaliação da qualidade e integridade do material por eletroforese com gel de agarose a 2% (ROSA et al., 2024).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentrações do dsRNA

A leitura realizada no NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™), foi utilizada para analisar a concentração (ng/µl) das triplicatas de dsRNA a fim de comparar qual concentração de IPTG e temperatura obteve uma maior produção de dsRNA. As análises quantitativas foram conduzidas por meio de média aritmética simples, calculada a partir dos valores de concentração obtidos para cada conjunto de triplicatas ao longo do período experimental de 45 dias, sendo eles dia 0, dia 15, dia 30 e dia 45. Os cálculos foram realizados utilizando o software Google Sheets, empregando a função nativa: MÉDIA().

Para a comparação relativa entre os tratamentos e a expressão dos resultados em termos percentuais, foi aplicada a fórmula abaixo, onde: $\Delta\%$ representa a variação percentual, C_{lb} é a concentração de dsRNA obtida no meio LB, C_{tb} é a concentração de dsRNA obtida no meio TB.

$$\Delta\% = \left(\frac{C_{lb} - C_{tb}}{C_{tb}} \right) \times 100\%.$$

Para as amostras incubadas a 37°C, observou-se uma inversão de eficiência dos meios de cultura dependendo da concentração de IPTG. Em todas as amostras, a indução com 1 mM de IPTG favoreceu fortemente o meio LB, que produziu entre 146% e 186% a mais de dsRNA do que o meio TB (Figura 1A, 2A, 3A). Por outro lado, à medida em que a concentração do indutor diminuiu para 0,75 mM e 0,5 mM, a relação inverteu, e o meio TB passou a ser mais produtivo que o meio LB variando de 11% a 69% (Figura 1B, 1C, 2B, 2C, 3B, 3C). Em contrapartida, as amostras incubadas a 30°C demonstraram que nesta temperatura o meio LB é superior na produção de dsRNA em todas as concentrações de IPTG testadas. A vantagem do LB foi notavelmente alta, principalmente com 1 mM de IPTG, onde a produção variou entre 276% a 316% (Figura 4A, 5A, 6A). Mesmo em concentrações baixas o LB manteve sua superioridade com a produção variando entre 15% e 195% (Figura 4B, 4C, 5B, 5C, 6B, 6C) maior do que TB.

A variação observada na produtividade dos meios LB e TB em resposta a diferentes concentrações de IPTG e temperaturas de incubação está alinhada com estudos que demonstram a sensibilidade de sistemas de expressão bacteriana a parâmetros físico-químicos (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A superioridade do meio LB a 37 °C sob alta indução (1 mM de IPTG) pode ser explicada pela rápida metabolização de nutrientes simples, permitindo uma resposta imediata e intensa à indução. Esse fenômeno é crucial para a produção eficiente de moléculas de dsRNA, cuja estabilidade e funcionalidade são dependentes das condições de síntese e armazenamento (BAI et al., 2022).

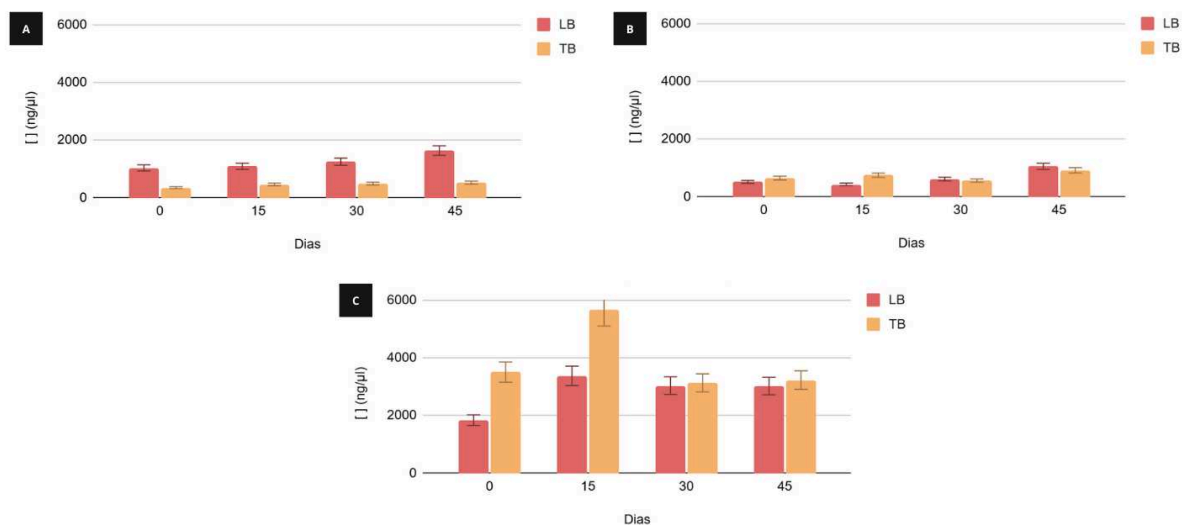
No entanto, a inversão de eficiência em concentrações mais baixas de IPTG (0,75 e 0,5 mM) a 37 °C, com o meio TB tornando-se mais produtivo, sugere que, sob uma pressão metabólica reduzida, o ambiente mais rico em nutrientes e tamponado do TB favorece a manutenção da viabilidade celular e a expressão sustentada de dsRNA. Essa relação é consistente com observações de que altas concentrações de indutor podem induzir estresse celular e afetar negativamente a integridade do RNA (ZHANG et al., 2017; LIN et al., 2020).

Por outro lado, a consistente superioridade do meio LB em todas as concentrações de IPTG a 30 °C ressalta o papel fundamental da temperatura na modulação do metabolismo bacteriano. Temperaturas mais baixas frequentemente reduzem a taxa de crescimento, mas podem aumentar a solubilidade e a estabilidade de proteínas recombinantes e, por extensão, de produtos de expressão como o dsRNA (FRASER et al., 2022). A notável vantagem produtiva a 30 °C, especialmente sob 1 mM de IPTG (aumentos de 276% a 316%), indica uma condição de cultivo otimizada onde a cinética de indução e a fisiologia celular no meio LB atingem um sinergismo máximo. Esse achado é relevante para aplicações biotecnológicas

que demandam grandes quantidades de dsRNA funcional, como o desenvolvimento de biopesticidas (BAUM et al., 2007; PALLI, 2014) e formulações terapêuticas (ADAMS et al., 2018).

A produção média de dsRNA nos meios LB e TB mostrou uma influência direta da concentração de IPTG. Quando induzida com 1 mM, a produção no meio LB foi superior, gerando 145,6% a mais de dsRNA em comparação com o TB (Figura 1A). Contudo, essa relação se inverteu em concentrações menores: com 0,75 mM, o meio LB foi 18,9% menos produtivo que o TB (Figura 1B), e com 0,5 mM, a produção no LB foi 10% menor (Figura 1C).

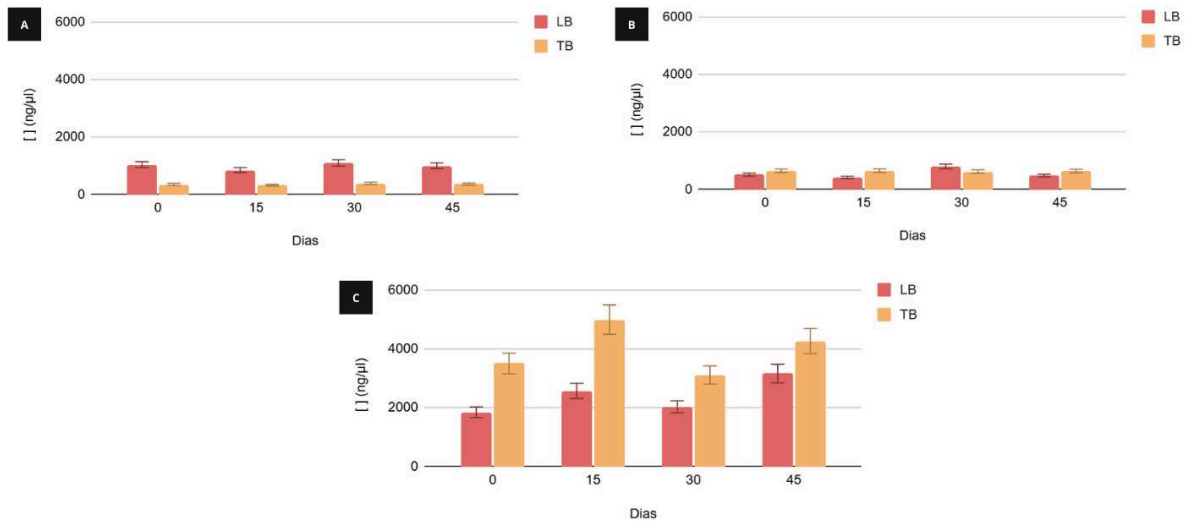
Figura 1 – Gráficos com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a 4°C, incubadas a 37°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.



Fonte: Elaboração própria.

A geração média de dsRNA nos meios LB e TB demonstrou ser diretamente afetada pela concentração de IPTG. Sob indução de 1 mM, o meio LB mostrou-se mais produtivo, produzindo 185,9% a mais de dsRNA que o TB (Figura 2A). Entretanto, com concentrações inferiores, os resultados se inverteram: a 0,75 mM, o LB produziu 22,6% a menos que o TB (Figura 2B), e a 0,5 mM, sua produção foi 40,8% inferior que TB (Figura 2C).

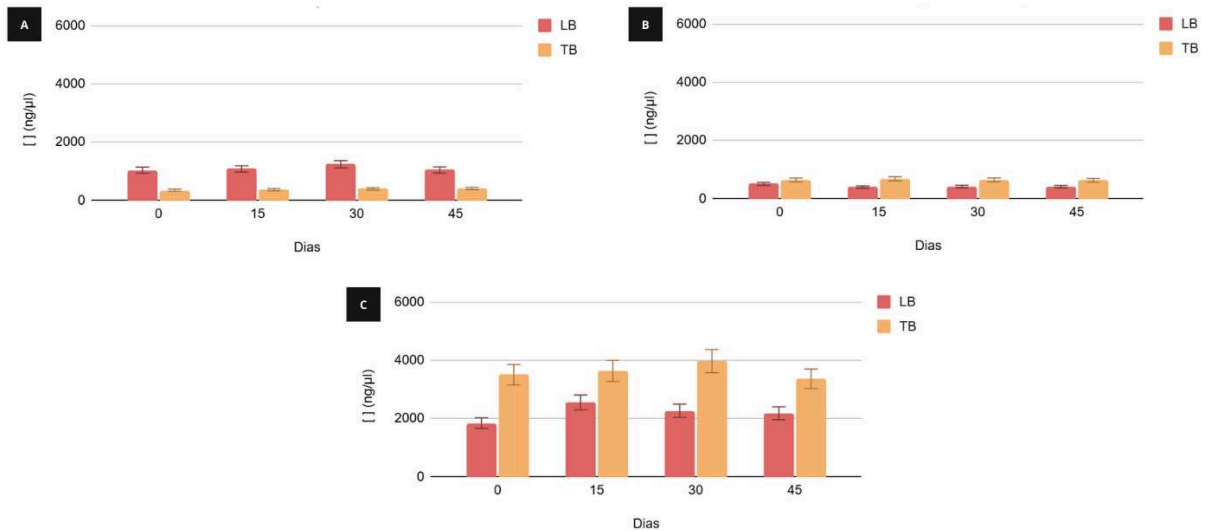
Figura 2 – Gráfico com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a -20°C, incubadas a 37°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.



Fonte: Elaboração própria.

A produção média de dsRNA nos meios LB e TB, demonstrou ser diretamente influenciada pela concentração de IPTG. Na indução com 1 mM, o meio LB foi mais produtivo, gerando 178,8% a mais de dsRNA que o TB (Figura 3A). No entanto, em concentrações menores o valor se inverteu, com 0,75 mM o meio LB produziu 35,3% a menos que o TB (Figura 3B), e com 0,5 mM o LB produziu 37,7% a menos (Figura 3C).

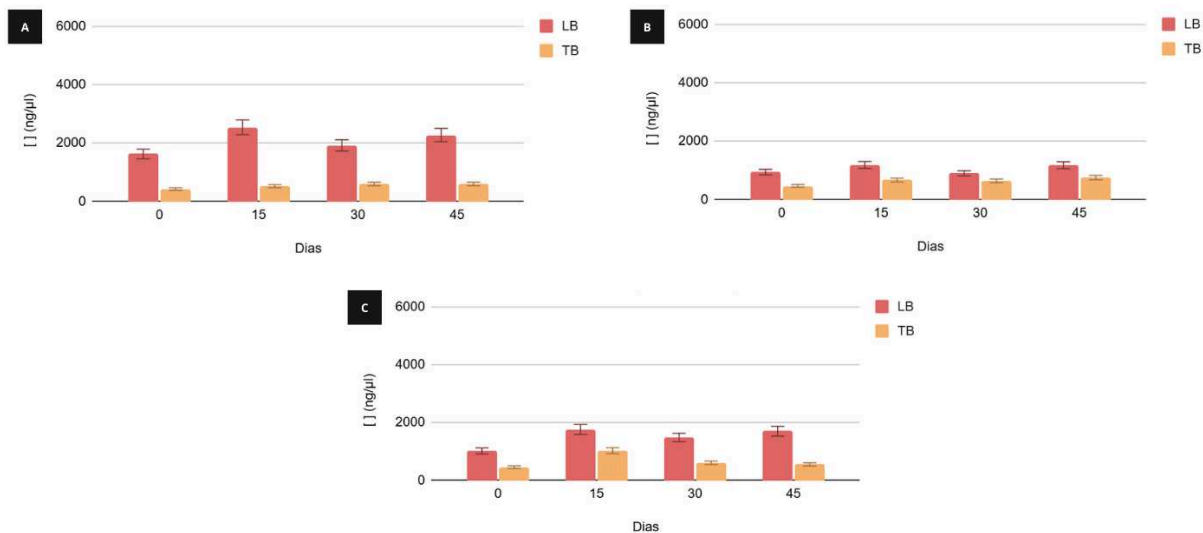
Figura 3 – Gráfico com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a -80°C, incubadas a 37°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.



Fonte: Elaboração própria.

A produção de dsRNA nos meios LB e TB mostrou-se fortemente influenciada pela concentração de IPTG. Com 1 mM de indutor, o meio LB foi notavelmente mais eficiente, gerando 275,7% a mais de dsRNA que o TB (Figura 4A). Diferente dos experimentos anteriores, a superioridade do LB manteve-se nas concentrações mais baixas: com 0,75 mM, sua produção foi 62,3% maior (Figura 4B), e com 0,5 mM, foi 174,8% superior (Figura 4C).

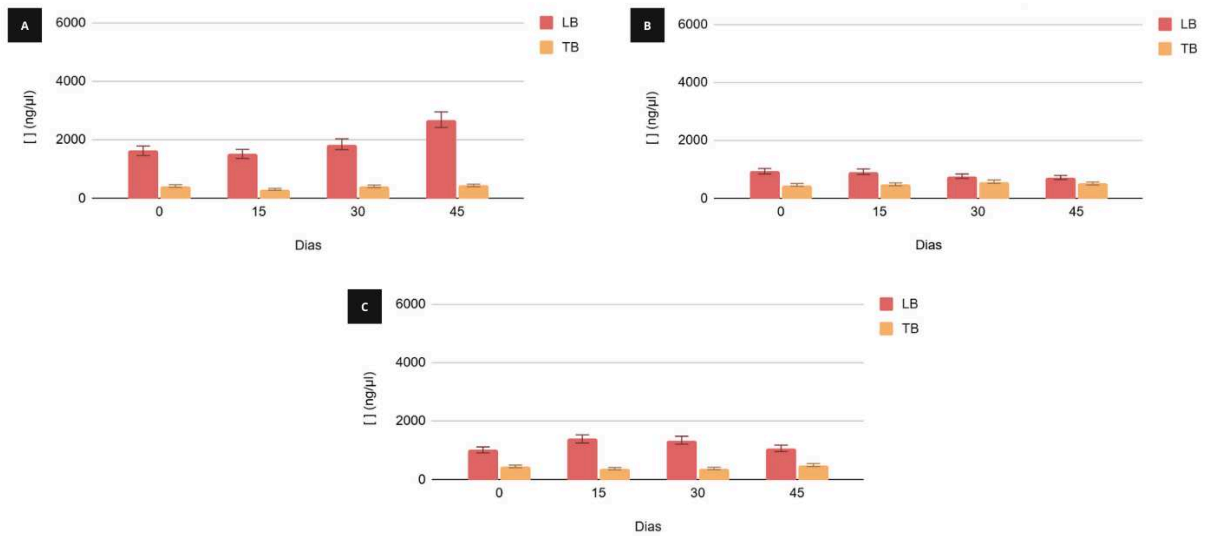
Figura 4 – Gráfico com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a 4°C, incubadas a 30°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.



Fonte: Elaboração própria.

A produtividade de dsRNA nos meios LB e TB confirmou ser diretamente impactada pela concentração de IPTG. Na presença de 1 mM, o meio LB foi mais produtivo, sintetizando 316,5% a mais de dsRNA que o TB (Figura 5A). A vantagem do LB persistiu nas demais concentrações: a 0,75 mM, sua produção foi 68,7% maior (Figura 5B), e a 0,5 mM, foi 190,1% superior (Figura 5C).

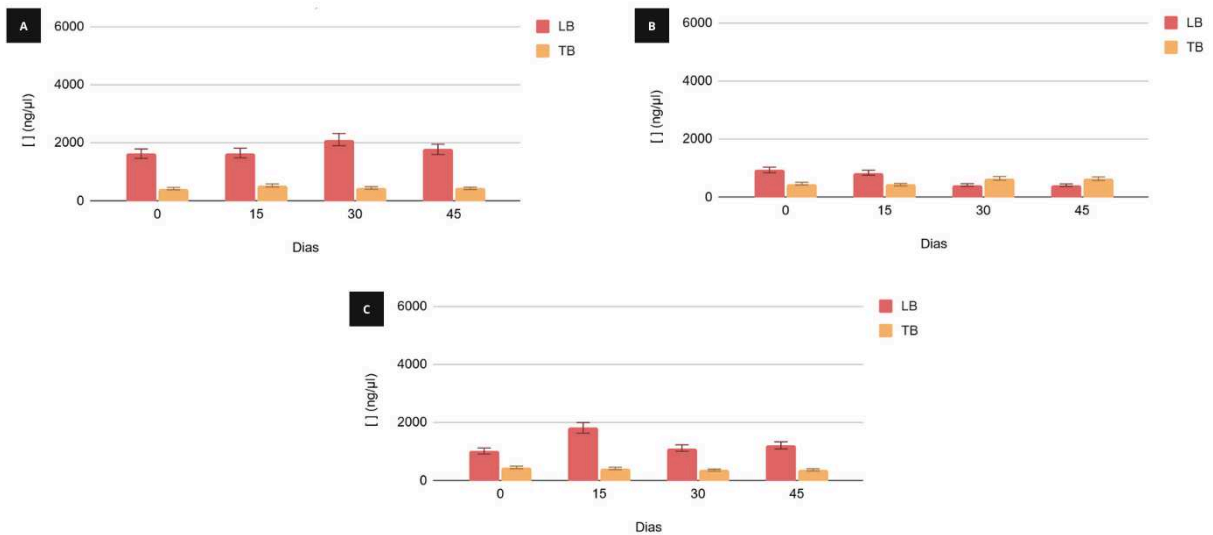
Figura 5 – Gráfico com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a -20°C, incubadas a 30°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.



Fonte: Elaboração própria.

A geração de dsRNA nos meios LB e TB, mais uma vez, demonstrou uma correlação direta com a concentração de IPTG. Com indução de 1 mM, o meio LB superou o TB, produzindo 289,4% a mais de dsRNA (Figura 6A). A predominância do LB continuou evidente nas concentrações menores: a 0,75 mM, sua produção foi 14,5% maior (Figura 6B), e a 0,5 mM, foi 195,4% superior (Figura 6C).

Figura 6 – Gráfico com a concentração de dsRNA (eixo y) e os dias após decorridos após a produção do dsRNA (eixo x). Triplicatas armazenadas a -80°C , incubadas a 30°C em meio de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth). (A) Triplicatas induzidas com 0,75 mM de IPTG. (B) Triplicatas induzidas com 1 mM de IPTG. (C) Triplicatas induzidas com 0,5 mM de IPTG.



Fonte: Elaboração própria.

Com base nas análises, conclui-se que a temperatura de incubação ideal é a de 37°C , pois proporciona o melhor desempenho para a produção de dsRNA comparada com a incubação a 30°C . Esta superioridade é evidenciada quando consideramos a interação com as concentrações de IPTG, sendo a produção drasticamente maximizada nas condições adequadas. A concentração mostrou-se um fator primordial na eficiência de produção. Os dados demonstram uma relação inversa, onde, concentrações mais baixas de IPTG resultam em maiores produções de dsRNA, em específico, a concentração de 0,5 mM de IPTG demonstrou-se superior às demais quando combinada com a incubação a 37°C , produzindo cerca de 4,11 vezes mais que a concentração de 1,0 mM e 5,31 vezes mais que a de 0,75 mM. Outro aspecto fundamental é a interação entre temperatura e tipo de meio de cultivo, enquanto a 37°C o meio TB apresenta melhor desempenho em baixas concentrações de IPTG, produzindo 1,96 vezes mais que o LB, a 30°C ocorre o contrário, com o meio LB sendo superior em todas as concentrações de IPTG, chegando a produzir 4,16 vezes mais que TB em algumas condições. A condição ideal para a produção de dsRNA seria, portanto, com

incubação a 37°C combinada com 0,5 mM de IPTG, proporcionando maiores rendimentos absolutos.

4.2 Integridade do dsRNA

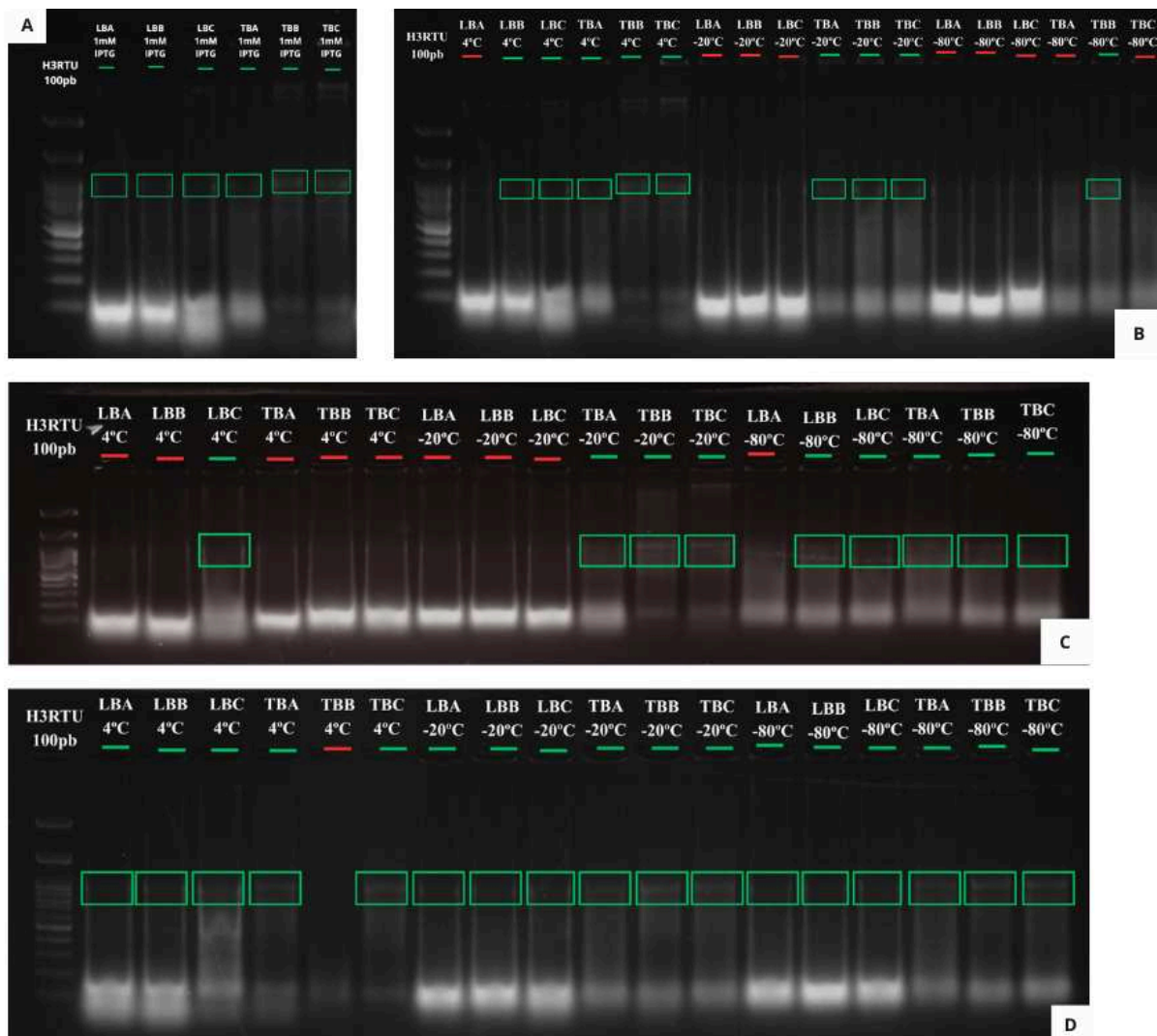
Para analisar a integridade do dsRNA ao longo do período experimental de 45 dias nas diferentes temperaturas de armazenamento, 4°C, -20°C e -80°C, foram realizados PCR's para confirmar a atividade do dsRNA durante os dias e concentrações de IPTG analisados. As amostras foram produzidas em triplicatas, tanto no meio LB quanto no meio TB, e foram categorizadas em três letras sendo A, B e C. No dia 0 de cada figura é apresentado as triplicatas e qual a concentração de IPTG utilizada, a partir do dia 15 as amostras são categorizadas pela temperatura de armazenamento, onde os traços e retângulos verdes representam que houve atividade de dsRNA, portanto se manteve íntegro, e os traços vermelhos indicam que não há atividade da molécula e que pode ter ocorrido a degradação.

Para o dsRNA produzido em meio LB e TB incubado a 37°C e induzido a 1mM foi observado que no dia 0 (Figura 7A), todas as amostras apresentaram dsRNA íntegro, confirmando uma produção inicial bem-sucedida. A ausência de bandas nas amostras de LB armazenadas a -20 °C e -80 °C no dia 15 (Figura 7B), em contraste com a preservação das amostras de TB nas mesmas temperaturas, sugere que o dsRNA produzido em meio LB pode ser mais suscetível a processos degradativos induzidos pelo congelamento. Esse fenômeno pode estar associado a diferenças na composição de sais, metabólitos residuais ou enzimas dos diferentes meios de cultura, que poderiam catalisar a quebra do RNA durante o ciclo de congelamento-descongelamento ou mesmo no estado congelado, um mecanismo facilitado pela presença de íons metálicos (HARRIS et al., 2009; MÜLLER, 2010). Estudos como o de Fabre et al. (2014) destacam que a estabilidade de RNA em longo prazo nem sempre é garantida em temperaturas ultra baixas, dependendo criticamente da formulação e dos contaminantes presentes.

A recuperação de sinal nos dias posteriores, 30 (Figura 7C) e 45 (Figura 7D), especialmente para amostras LB em -80 °C, pode indicar uma heterogeneidade na degradação ou a presença de formas agregadas do dsRNA que, em determinadas condições podem ter migrado de forma atípica inicialmente, sendo posteriormente liberadas ou "recuperadas" na análise. Contudo, a interpretação mais cautelosa é que essa aparente recuperação pode ser um artefato da técnica, como variações na carga do gel ou na eficiência de coloração, reforçando a necessidade de técnicas complementares, como espectrofotometria ou análise em

bioanalizador, para quantificar a degradação de forma mais precisa (FERREIRA et al., 2018; ROSA et al., 2024).

Figura 7 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 37°C com 1mM de IPTG.



Gel de agarose 2%; Marcador 100pb H3RTU GeneDireX; Destaque em verde: dsRNA ainda com atividade; Destaque em vermelho: dsRNA sem atividade. Fonte: Elaboração própria.

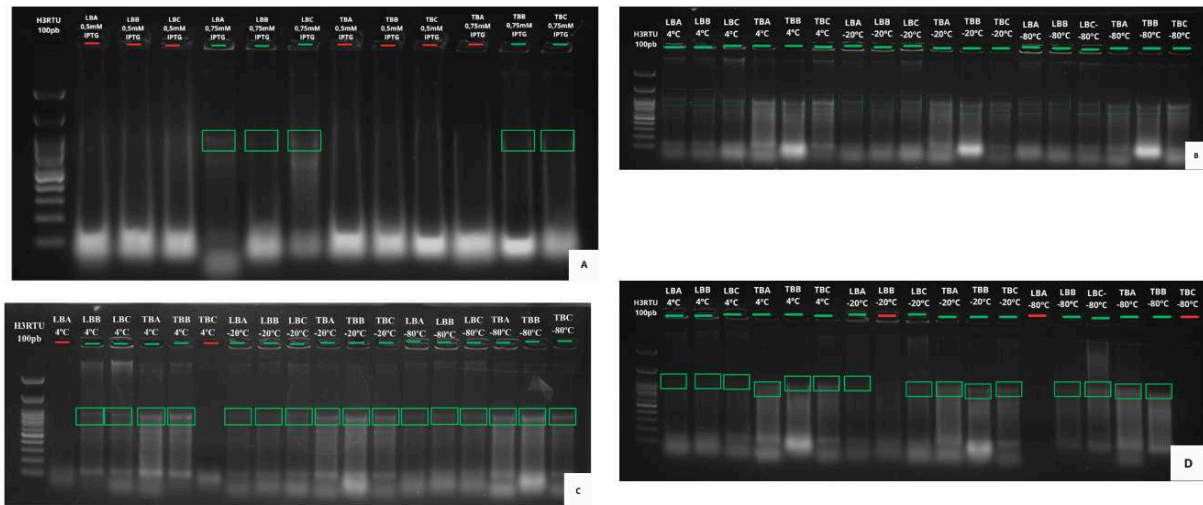
A baixa intensidade das bandas já no dia 0 (Figura 8A) para as amostras induzidas com 0,75 mM de IPTG sugere que a produção inicial de dsRNA nessas condições pode ter sido naturalmente menor ou que o produto apresentou alguma degradação prévia à estocagem, um fator importante a ser considerado em protocolos de produção (ZHANG et al., 2017). No dia 15 (Figura 8B), a manutenção de bandas com média (LB) a alta (TB)

intensidade em todas as temperaturas indica uma estabilidade inicial satisfatória, com o meio TB novamente demonstrando um potencial de preservação superior, mesmo com uma produção inicial aparentemente mais baixa. Esse resultado está em linha com estudos que indicam que a estabilidade do RNA não é uma função simples da temperatura, mas também da matriz química na qual ele está inserido (FABRE et al., 2014; KORNIENKO et al., 2024).

O padrão observado no dia 30 (Figura 8C) é particularmente elucidativo. A ausência de bandas para LBA 4°C e TBC 4°C, juntamente com a degradação significativa de outras amostras LB a 4°C, corrobora a literatura que aponta a refrigeração (4°C) como uma condição subótima para armazenamento de RNA a médio prazo, devido principalmente ao risco de atividade residual de RNases e à hidrólise (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A resiliência superior da maioria das amostras de TB, especialmente as mantidas a -20°C e -80°C, reforça a hipótese de que os componentes do meio Terrific Broth podem conferir um efeito estabilizador ou inibir contaminantes degradativos. Este achado é relevante para aplicações práticas que buscam protocolos de estocagem robustos (BAI et al., 2022).

O aparente "ressurgimento" de banda em algumas amostras no dia 45 (Figura 8D), como LBA 4°C e TBC 4°C, é um fenômeno que demanda cautela na interpretação. Em vez de indicar uma recuperação do dsRNA, é mais plausível que isso represente um artefato técnico, como heterogeneidade na amostra, presença de agregados que migram diferentemente, ou variações na eficiência de coloração e captura de imagem do gel (ROSA et al., 2024). Portanto, este resultado destaca a limitação do uso exclusivo da eletroforese em gel de agarose para avaliar degradação quantitativa, sendo recomendável o uso de técnicas complementares, como espectrofotometria para verificar o índice de pureza (RIN) ou sistemas microfluídicos (FERREIRA et al., 2018).

Figura 8 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 37°C com 0.75 mM de IPTG.



Gel de agarose 2%; Marcador 100pb H3RTU GeneDireX; Destaque em verde: dsRNA ainda com atividade; Destaque em vermelho: dsRNA sem atividade. Fonte: Elaboração própria

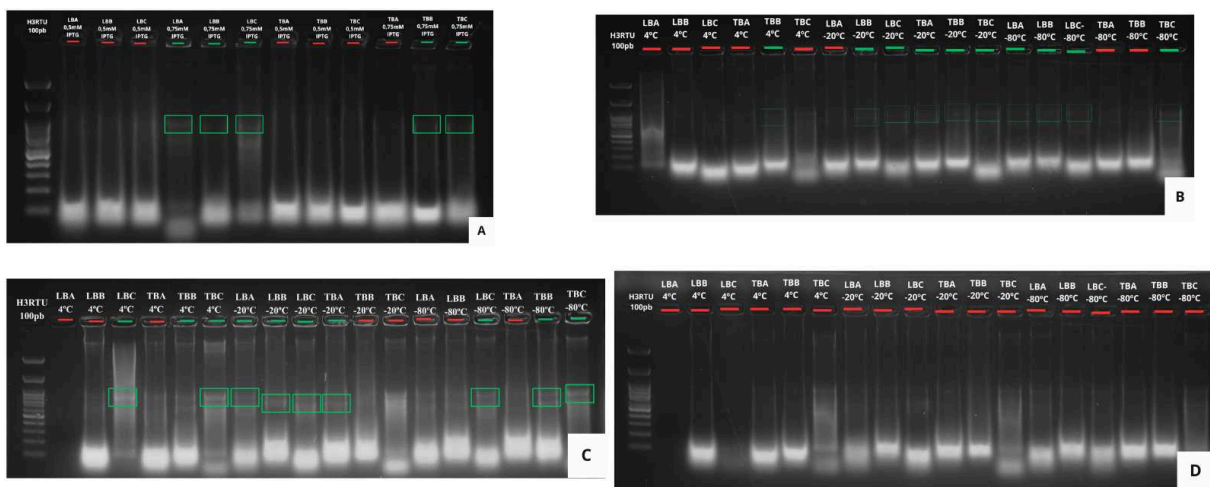
A ausência de bandas evidentes já no dia 0 (Figura 9A) indica que a produção inicial de dsRNA sob essa condição de indução foi insuficiente para detecção confiável por eletroforese em gel. Este resultado era esperado, uma vez que concentrações subótimas de IPTG podem resultar em uma expressão gênica muito baixa, insuficiente para acumular dsRNA em quantidades detectáveis pelo método analítico empregado (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

O padrão observado nos dias subsequentes (15, 30 e 45) corrobora a hipótese de que, quando produzido em quantidades vestigiais, o dsRNA é extremamente suscetível à degradação completa, independentemente da temperatura de armazenamento ou do meio de cultura. No dia 15 (Figura 9B), a detecção apenas de bandas de baixa intensidade ou a ausência total delas, especialmente para todas as amostras armazenadas a 4°C, demonstra uma degradação rápida. Este fenômeno está alinhado com a literatura, que descreve a refrigeração como a condição menos efetiva para preservação de RNA a médio prazo, devido principalmente à atividade contínua de ribonucleases e aos processos de hidrólise, que são significativamente mais lentos em temperaturas negativas (LEMIRE et al., 2016; LIN et al., 2020). A presença de algumas bandas fracas em temperaturas de -20°C e -80°C sugere que o congelamento retardou, mas não impediu, o processo degradativo.

A progressão para o dia 30 (Figura 9C), com um aumento no número de amostras sem banda detectável, e a degradação completa observada no dia 45 (Figura 9D) para todas as

condições, são resultados consistentes. Eles demonstram que, abaixo de um limiar mínimo de concentração, o dsRNA não possui massa crítica suficiente para resistir às taxas basais de degradação química e enzimática ao longo do tempo, um desafio amplamente reconhecido para a aplicação prática de RNA (BAI et al., 2022; KORNIENKO et al., 2024). O fato de o meio TB não conferir uma vantagem clara de estabilidade neste cenário (em contraste com os resultados sob indução mais alta) reforça que a quantidade inicial do produto é um fator determinante primário para sua vida útil.

Figura 9 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 37°C com 0,5 mM de IPTG.



Gel de agarose 2%; Marcador 100pb H3RTU GeneDireX; Destaque em verde: dsRNA ainda com atividade; Destaque em vermelho: dsRNA sem atividade. Fonte: Elaboração própria

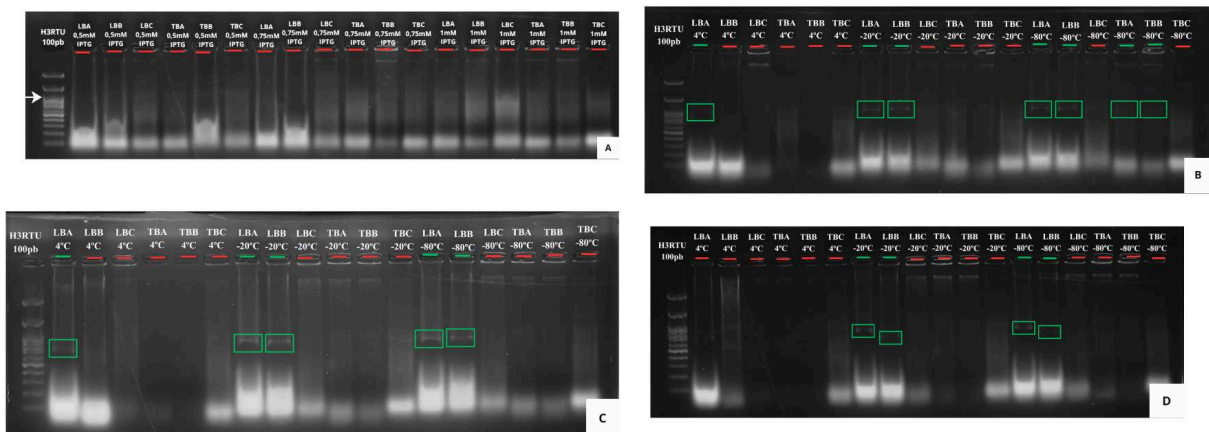
A análise de estabilidade para o dsRNA produzido a 30°C revela um padrão de preservação seletiva, fortemente associado ao meio de cultura de origem, mesmo quando a produção inicial foi baixa. Os resultados indicam que as condições de cultivo a 30°C, embora potencialmente favoráveis para a estabilidade de proteínas, não garantiram uma produção inicial elevada de dsRNA detectável, como observado pela baixa ou ausência de intensidade das bandas no dia 0 (Figura 10A) para todas as amostras induzidas com 1 mM de IPTG.

Contudo, os dados de dias 15, 30 e 45 revelam um fenômeno consistente e notável: as únicas amostras que mantiveram bandas detectáveis ao longo de todo o período foram LBA -20°C, LBB -20°C, LBA -80°C e LBB -80°C. Este resultado evidencia uma clara vantagem de estabilidade para o dsRNA produzido no meio LB sob estas condições específicas de temperatura de incubação (30°C) e armazenamento congelado (-20°C e -80°C). A degradação completa ou a não detecção nas amostras de TB, bem como nas amostras de LB armazenadas

a 4°C, sugere que a combinação do meio LB com a temperatura de produção mais baixa pode ter gerado um produto com menos contaminantes prejudiciais (como RNAses ou íons metálicos catalíticos) ou em uma conformação mais estável, viabilizando sua preservação apenas sob congelamento.

A ausência de bandas no dia 45 para a amostra LBA 4°C, que antes apresentava baixa intensidade, corrobora amplamente a literatura. O armazenamento a 4°C é amplamente reconhecido como inadequado para preservação de RNA a médio e longo prazo, sendo recomendado apenas para soluções de RNA que serão utilizadas em poucos dias (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; FABRE et al., 2014). Por outro lado, a manutenção da integridade nas amostras LB congeladas por 45 dias está alinhada com estudos que apontam a temperatura igual ou inferior a -20°C como essencial para inativar enzimas degradativas e minimizar a hidrólise do RNA (BAI et al., 2022; HENEGHAN et al., 2021). A redução da intensidade da banda de "média" para "baixa" entre os dias 30 e 45 nas amostras LB congeladas indica uma degradação lenta, porém progressiva, mesmo nas condições consideradas ótimas, um processo esperado e documentado (KORNIENKO et al., 2024).

Figura 10 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 30°C com 1mM de IPTG.



Gel de agarose 2%; Marcador 100pb H3RTU GeneDireX; Destaque em verde: dsRNA ainda com atividade; Destaque em vermelho: dsRNA sem atividade. Fonte: Elaboração própria

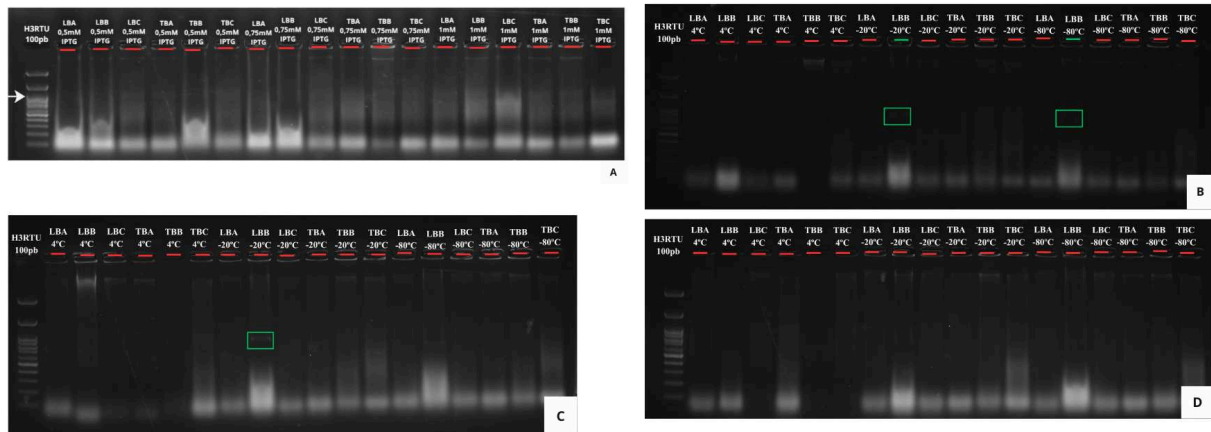
A análise de estabilidade para o dsRNA produzido a 30°C e induzido com 0,75 mM de IPTG demonstra um cenário de produção inicial extremamente baixa, seguida de uma degradação completa acelerada. A ausência total de bandas no dia 0 (Figura 11A) confirma

que a concentração do indutor foi insuficiente para gerar uma quantidade de dsRNA detectável pelo método de eletroforese em gel empregado, um indicativo direto de que a expressão do gene alvo foi mínima sob essas condições (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A detecção de bandas de baixa intensidade apenas nas amostras LBB -20°C e LBB -80°C no dia 15 (Figura 11B) sugere que, mesmo em quantidades vestigiais, o dsRNA produzido no meio LB pode apresentar uma estabilidade marginal quando imediatamente submetido ao congelamento. No entanto, este sinal é transitório e inconsistente, como comprovado pela progressão dos resultados. No dia 30 (Figura 11C), apenas LBB -20°C mantém uma banda detectável, indicando que o armazenamento a -20°C pode ter sido ligeiramente mais eficaz para preservar essas quantidades mínimas do que a -80°C sob essas condições específicas. Este fenômeno, porém, não contraria a literatura, que em geral aponta o armazenamento em ultrafreezer (-80°C) como superior, pois pequenas variações na formação de cristais de gelo ou na composição da amostra podem influenciar a estabilidade de moléculas em concentrações tão baixas (HENEGHAN et al., 2021).

A degradação completa observada no dia 45 (Figura 11D) em todas as amostras era um resultado esperado. Quando a produção inicial está abaixo do limiar de detecção, qualquer degradação, mesmo que lenta, leva rapidamente à perda total do sinal. Este achado é consistente com o princípio de que a estabilidade de longo prazo do RNA é diretamente proporcional à sua concentração inicial e à pureza da preparação (BAI et al., 2022; KORNIENKO et al., 2024). A ausência de qualquer sinal para amostras de TB em todos os tempos analisados reforça que, nesta condição de baixa indução, o meio de cultura não foi capaz de sustentar uma produção mínima recuperável.

Figura 11 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 30°C com 0,75 mM de IPTG.



Gel de agarose 2%; Marcador 100pb H3RTU GeneDireX; Destaque em verde: dsRNA ainda com atividade; Destaque em vermelho: dsRNA sem atividade. Fonte: Elaboração própria

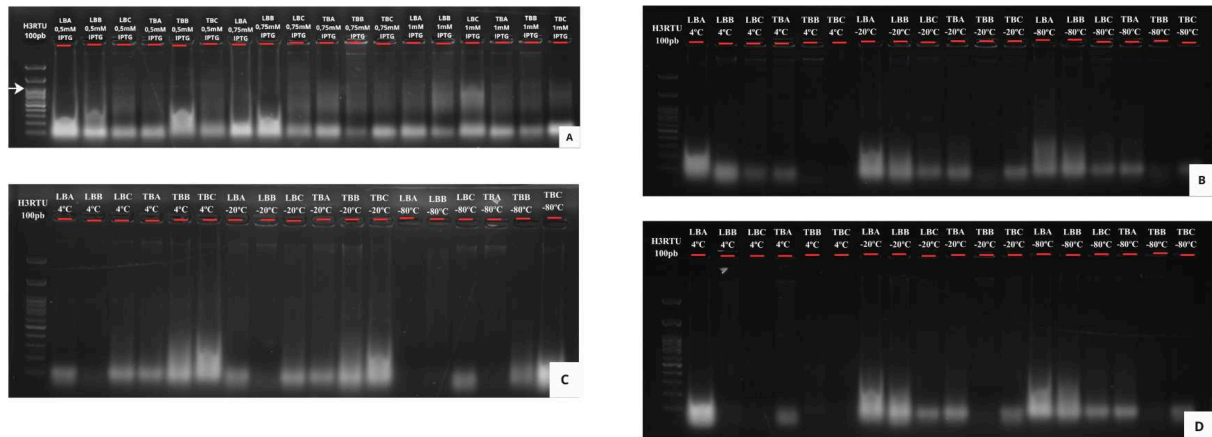
A produção inicial marginal, evidenciada pelas bandas de baixa ou nenhuma intensidade no dia 0 (Figura 12A), já indica uma expressão gênica insuficiente para acumular dsRNA em quantidades adequadas para manipulação e armazenamento (ZHANG et al., 2017). Este resultado era esperado, pois concentrações subótimas de indutor frequentemente não ativam suficientemente os promotores dependentes, resultando em uma baixa transcrição do gene alvo.

A detecção de bandas de baixa intensidade apenas nas amostras LBA -20°C e LBB -20°C no dia 15 (Figura 12B) sugere que, em quantidades vestigiais, o congelamento imediato a -20°C pode oferecer uma breve janela de preservação para o dsRNA produzido no meio LB. No entanto, a ausência total de bandas nas mesmas condições no dia 30 (Figura 12C) e dia 45 (Figura 12D) demonstra que essa preservação foi apenas temporária. Este padrão de degradação completa em até 30 dias está plenamente alinhado com a literatura, que destaca que amostras de RNA com baixa concentração são extremamente susceptíveis à degradação por contaminantes, como íons metálicos que catalisam a hidrólise (MÜLLER, 2010), ou por atividade residual de RNases, mesmo em temperaturas negativas (BAI et al., 2022). A refrigeração a 4°C mostrou-se ineficaz desde o primeiro ponto temporal, um resultado consistente com seu conhecido potencial limitado para preservação de ácidos nucleicos (FABRE et al., 2014).

A completa ausência de sinal para todas as amostras de TB, inclusive nas temperaturas negativas, reforça que, quando a produção é muito baixa, diferenças na

composição do meio de cultura podem não ser suficientes para conferir estabilidade detectável. Este resultado ressalta que os benefícios de estabilização atribuídos a um meio de cultura mais complexo, como o TB, são dependentes da existência de uma massa crítica de dsRNA para interagir e se proteger.

Figura 12 – dsRNA produzido em triplicatas nos meios de cultura LB(Luria-Bertani) e TB(Terrific Broth) incubadas a 30°C com 0,5 mM de IPTG.



Gel de agarose 2%; Marcador 100pb H3RTU GeneDireX; Destaque em verde: dsRNA ainda com atividade; Destaque em vermelho: dsRNA sem atividade. Fonte: Elaboração própria

5. CONCLUSÃO

A condição que maximizou o rendimento absoluto de dsRNA foi a incubação a 37°C combinada com 0,5 mM de IPTG e o meio de cultura TB, superando significativamente as outras concentrações testadas. Em contraste, quando a incubação foi realizada a 30°C, o meio LB apresentou uma produção maior que o TB. Portanto, para o objetivo de máxima produção no momento da extração, o protocolo ideal consiste em 37°C, 0,5 mM de IPTG e meio TB. Cabe ressaltar que, apesar de ter gerado a maior quantidade, essa condição (0,5 mM) também levou a uma degradação mais acelerada do dsRNA durante o armazenamento, o que pode inviabilizá-la para aplicações que demandem estabilidade.

Para a manutenção da integridade do dsRNA durante o armazenamento, os parâmetros ideais diferem. A combinação que assegurou maior estabilidade ao longo de 45 dias foi a produção em meio TB com 1,0 mM de IPTG e incubação a 37°C, seguida de armazenamento a -80°C. Esta condição produziu moléculas com maior resistência à degradação temporal, sendo a única que manteve bandas intensas após o período, enquanto as amostras induzidas com IPTG a 0,5 mM e 0,75 mM mostraram estabilidade

significativamente reduzida. As temperaturas de -20°C e 4°C aceleraram a degradação em todas as condições.

A escolha do protocolo deve, portanto, ser guiada pelo objetivo principal: se rendimento máximo imediato (para uso rápido), adota-se 37°C com 0,5 mM de IPTG em meio TB; se estabilidade prolongada para armazenamento e uso posterior, opta-se por 37°C com 1,0 mM de IPTG em meio TB, com armazenamento obrigatório a -80°C. Este estudo possui a limitação de não avaliar a funcionalidade biológica (ex.: atividade de silenciamento) do dsRNA produzido sob as diferentes condições. Sugere-se, para trabalhos futuros, a realização de testes *ex situ* para verificar se o dsRNA gerado no protocolo de alta estabilidade mantém sua eficácia biológica, complementando assim a análise de integridade física.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENAIM, L. et al. Topical sprays of dsRNA chitosan nanoparticles for pest control. *ACS Nano*, v. 17, n. 5, p. 4891-4902, 2023.

ADAMS, D. et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *New England Journal of Medicine*, v. 379, n. 1, p. 11-21, 2018.

BACHMAN, P. M. et al. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Transgenic Research*, v. 22, n. 6, p. 1207-1222, 2013.

BAI, G. et al. Stability and functionality of dsRNA during long-term storage. *RNA Biology*, v. 19, n. 1, p. 1055-1064, 2022.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BAUM, J. A. et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, 2007.

BERNSTEIN, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, v. 409, n. 6818, p. 363-366, 2001.

BONFIM, K. et al. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, n. 6, p. 717-726, 2007.

BOUTROS, M.; AHRINGER, J. The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nature Reviews Genetics*, v. 9, n. 7, p. 554-566, 2008.

CHRISTIAENS, O. et al. RNA interference: a promising biopesticide strategy against the African sweet potato weevil *Cylas brunneus*. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 19756, 2020.

DIETZL, G. et al. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, v. 448, n. 7150, p. 151-156, 2007.

DING, S. W.; VOINNET, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, v. 130, n. 3, p. 413-426, 2007.

FABRE, A. L. et al. An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. *European Journal of Human Genetics*, v. 22, n. 3, p. 379-385, 2014.

FERREIRA, R. et al. Improved RNA purity and integrity measurements using the Agilent 4200 TapeStation system. *Agilent Technologies Application Note*, 2018.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FRASER, R. S. S. et al. The A-form architecture of dsRNA and its recognition by proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. 18, p. 10681-10695, 2022.

HARRIS, M. E. et al. Metal ion catalysis of RNA cleavage. *Annual Review of Biochemistry*, v. 78, p. 449-470, 2009.

HENEGHAN, A. F. et al. The effect of relative humidity on the stability of RNA dried on surfaces. *Biologicals*, v. 72, p. 1-7, 2021.

HERMAN, R. A. et al. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiology*, v. 132, n. 1, p. 36-43, 2003.

HUR, S. Double-stranded RNA sensors and modulators in innate immunity. *Annual Review of Immunology*, v. 37, p. 349-375, 2019.

IDRIS, A. et al. A SARS-CoV-2 targeted siRNA-nanoparticle therapy for COVID-19. *Molecular Therapy*, v. 29, n. 7, p. 2219-2226, 2021.

KORNIENKO, A. et al. Environmental stability of RNA and its implications for biosensing and biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 42, n. 1, p. 78-92, 2024.

LEMIRE, I. et al. Alkaline hydrolysis of RNA. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 44, p. 23035-23045, 2016.

LIN, K. et al. Humidity effects on the stability of RNA molecules. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 11508, 2020.

LIU, G. et al. Enhanced cellulase production in *Trichoderma reesei* by RNAi-mediated silencing of negative regulators. *Biotechnology for Biofuels*, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2021.

MACRAE, I. J. et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*, v. 311, n. 5758, p. 195-198, 2006.

MOLBERT, A. et al. Acid hydrolysis of RNA under chaotic conditions. *RNA*, v. 10, n. 10, p. 1526-1531, 2004.

MÜLLER, J. Metal ion binding to RNA. *Metallomics*, v. 2, n. 5, p. 318-327, 2010.

NOORAEI, S. et al. RNAi-based therapeutic applications for genetic disorders and viral infections: a review. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, v. 25, p. 547-558, 2021.

PALLI, S. R. RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Current Opinion in Insect Science*, v. 6, p. 1-8, 2014.

PIRES, C. V. et al. RNAi-based technologies for plant protection against pests and pathogens. *Pest Management Science*, v. 79, n. 3, p. 933-943, 2023.

ROSA, C. et al. Evaluation of dsRNA stability after storage using spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. *Journal of Biotechnology*, v. 380, p. 1-9, 2024.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHNETTLER, E. et al. Advances in RNA interference: mechanisms and applications. *Annual Review of Virology*, v. 1, p. 51-73, 2014.

SCHNEIDER, W. M. et al. Genome-scale identification of SARS-CoV-2 and pan-coronavirus host factor networks. *Cell*, v. 184, n. 1, p. 120-132, 2021.

SILVA, R. R. et al. UV-induced damage to RNA: mechanisms and consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 210, p. 45-58, 2024.

SONG, J. J. et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, v. 305, n. 5689, p. 1434-1437, 2004.

STEFAN, R. et al. The role of metal ions in RNA biochemistry. In: GESTELAND, R. F. et al. (Ed.). *The RNA World*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. p. 287-319.

TERENIUS, O. et al. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, v. 57, n. 2, p. 231-245, 2011.

TURNER, D. H.; MATHEWS, D. H. NNDB: the nearest neighbor parameter database for predicting stability of nucleic acid secondary structure. *Nucleic Acids Research*, v. 38, suppl_1, p. D280-D282, 2010.

VERDEL, A. et al. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, v. 303, n. 5658, p. 672-676, 2004.

WILSON, R. C.; DOUDNA, J. A. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual Review of Biophysics*, v. 42, p. 217-239, 2013.

XIE, S. et al. Engineering yeast for biodiesel production using RNAi. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, n. 6, p. 1234-1241, 2015.

ZAMORE, P. D. et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, v. 101, n. 1, p. 25-33, 2000.

ZHANG, J. et al. Production of double-stranded RNA for interference with TMV infection utilizing a bacterial prokaryotic expression system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 14, p. 5871-5882, 2017.

ZORDE KHVALEVSKY, E. et al. Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 51, p. 20723-20728, 2013.