

GENES REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE

Ágata Vendruscolo¹, Débora Ester Petry Marcelino², Jane de Oliveira Peixoto³,
Fernando De Castro Tavernari³, Adriana Mércia Guaratini Ibelli⁴, Mônica Corrêa Ledur³

¹Graduanda em Medicina Veterinária pelo Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, bolsista
CNPq/PIBIC na Embrapa Suínos e Aves, agatavendruscolo@hotmail.com

²Graduanda em Engenharia Agrônoma pela FACC-Faculdade Concórdia, Campus Concórdia, bolsista
CNPq/PIBIC na Embrapa Suínos e aves

³Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

⁴Analista da Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: expressão gênica, estabilidade, qPCR

INTRODUÇÃO

A utilização de genes de referência faz-se essencial para a realização da quantificação relativa em análises de expressão gênica, já que estes são usados como normalizadores de dados de expressão, influenciando diretamente o sucesso da acurácia da análise. Entretanto, a estabilidade dos genes pode variar de acordo com o projeto experimental que esteja sendo realizado (1-3). Dessa forma, é primordial avaliar a confiabilidade dos genes endógenos antes do seu uso (1). A análise de expressão gênica permite evidenciar os processos biológicos relacionados a inúmeras condições nos organismos vivos (1). Assim, a técnica de PCR quantitativa (qPCR) é usada por ser rápida e sensível para gerar análises de expressão gênica em diversas amostras diferentes para um número limitado de genes (1). Desse modo, para que haja resultados confiáveis, é preciso usar genes de referência adequados como controles internos para se obter uma correta normalização, etapa fundamental para a avaliação da expressão relativa (2). Para que todo esse processo funcione é de grande importância o uso de genes de referências estáveis, pois garantem a normalização dos níveis de entrada de RNA entre as amostras, impedindo erros na quantificação (1). Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade de 9 genes referência no íleo de frangos de corte aos 21 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho, utilizaram-se 45 frangos de corte de uma linhagem comercial com 21 dias de idade. As amostras de íleo foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para análise de expressão gênica. A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), seguido de purificação em coluna de sílica (Qiagen), de acordo com as recomendações dos fabricantes. A concentração do RNA foi adquirida por meio de espectrofotômetro (BioDrop) e em gel de Agarose (1%) para a verificação da integridade. Amostras com razão 260/280nm e acima de 1,8 foram escolhidas para as análises subsequentes. Em seguida foi realizada a síntese de cDNA utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Para a avaliação da estabilidade, os genes referência candidatos escolhidos foram: Beta-microglobulina, *GAPDH*, *HMBS*, *HPRT1*, *MRPS30*, *RPL30*, *RPL4*, *RPL5* e *RPLP1* (1). Após, as amostras foram submetidas à técnica de PCR quantitativa (qPCR), realizada em equipamento QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems), com reações contendo: Mastermix na concentração 1X (GoTaq® qPCR Master Mix 2x, Promega), 0,16 µM de cada primer F e R, 2 µL de cDNA na diluição 1:10 e água ultrapura para completar 15 µL de reação total. As reações de qPCR foram feitas em duplicatas e os valores de Ct (*cycle threshold*) foram obtidos e submetidos a análises de estabilidade utilizando os programas Normfinder, Genorm e BestKeeper, disponíveis na ferramenta endoGenes (<https://hanielcedraz.shinyapps.io/endoGenes/>). Ao final da análise do endoGenes, um ranking geral foi obtido utilizando o pacote Rankagreg do R, considerando os níveis de estabilidade de cada gene para todos os programas anteriormente analisados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de genes referência estáveis é necessária para que uma análise confiável de expressão gênica seja possível (4). Neste trabalho, foram avaliados genes que de acordo com a literatura já foram recomendados como genes normalizadores em outras espécies e tecidos (5). De acordo com os resultados obtidos, os genes *MRPS30* e *RPL30* foram os mais estáveis nos programas Bestkeeper e Normfinder e os genes *RPL30* e *RPL5* foram considerados os mais estáveis no programa Genorm. Já os genes *HPRT1* e *Beta-microglobulina* foram os menos estáveis em todos os programas utilizados (Tabela 1). De acordo com a análise conjunta realizada com o Rankagreg, os genes *RPL5* e *RPL30* (Figura 1) apresentaram menor variação de expressão no íleo de frangos de corte. Estudos de avaliação de genes referência em aves são escassos, no entanto, alguns destes genes aqui avaliados já foram recomendados para utilização como referência em ossos e músculo (1,4,5). Além disso, não há trabalhos evidenciando a estabilidade da expressão destes genes no íleo. Portanto, com este trabalho foi possível identificar genes que podem ser utilizados como referência em estudos de expressão gênica no íleo de frangos de corte.

CONCLUSÕES

Os genes referência *RPL30* e *RPL5* foram os mais estáveis na avaliação do tecido do íleo das aves, podendo ser utilizados como normalizadores em análises da expressão gênica nesse tecido.

REFERÊNCIAS

- HUL, L. M.; IBELLI, A. M. G.; PEIXOTO, J. O.; SOUZA, M. R.; SAVOLDI, I. R.; MARCELINO, D. E. P.; TREMEA, M.; LEDUR, M. C. Reference genes for proximal femoral epiphysiolysis expression studies in broilers cartilage. **Plos One**, v. 15, n. 8, 2020.
- JULIAN, G. S.; OLIVEIRA, R. W.; TUFIK, S.; CHAGAS, J. R. Analysis of the stability of housekeeping gene expression in the left cardiac ventricle of rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n. 3, p. 211-214, 2016.
- SOUSA, F. C. B.; **Seleção de genes de referência para normalização da expressão gênica em tecidos de codornas**. Universidade Federal do Piauí. Bom Jesus- PI, 2016.
- NASCIMENTO, C. S.; BARBOSA, L. T.; BRITO, C.; FERNANDES, R. P. M.; MANN, R. S.; PINTO, A. G.; OLIVEIRA, H. C.; DODSON, M. V.; GUIMARÃES, S. E. F.; DUARTE, M. S; Identification of Suitable Reference Genes for Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays on Pectoralis major Muscle in Chicken (*Gallus gallus*). **Plos One** 10(5). 2015.
- KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v. 54, n. 4, p. 391-406, 2013.

Tabela 1. Classificação de acordo com os softwares *Bestkeeper* (Valores de desvio padrão (DP)), Genorm (valor M) e Normfinder (valor S) e ranking geral utilizando o pacote Rankaggreg para os nove genes avaliados neste trabalho.

Genes	Bestkeeper		Genorm		Normfinder		Ranking Geral
	Valor de DP	Ranking	Valor M	Ranking	Valor S	Ranking	
<i>RPL30</i>	0.191	2	0.16	1	0.17	2	1
<i>RPL5</i>	0.204	5	0.16	1	0.2	4	2
<i>MRPS30</i>	0.162	1	0.23	2	0.12	1	3
<i>RPLP1</i>	0.192	3	0.25	3	0.19	3	4
<i>RPL4</i>	0.203	4	0.26	4	0.19	5	5
<i>GAPDH</i>	0.237	6	0.29	5	0.28	6	6
<i>HMBS</i>	0.282	7	0.29	6	0.29	7	7
<i>HPRT1</i>	0.323	8	0.41	7	0.71	8	8
<i>B.micro</i>	1.127	9	0.68	8	1.59	9	9

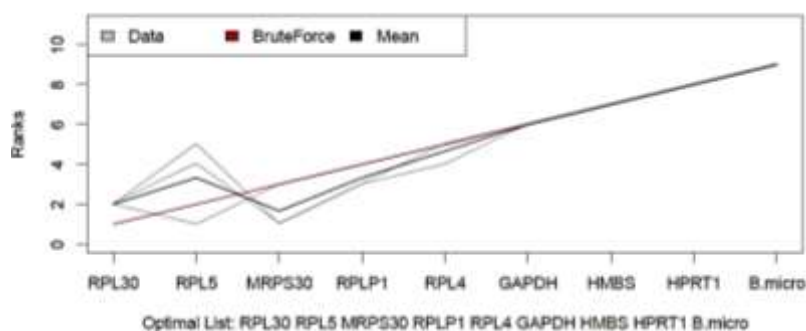


Figura 1. Resultado da classificação geral de nove genes constitutivos pela análise com o pacote Rankaggreg, disponível na ferramenta endoGenes.