

SELEÇÃO DE GENES CONSTITUTIVOS PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM OSSOS DE FRANGOS DE CORTE AOS 35 DIAS DE IDADE

Igor Ricardo Savoldi¹, Bruna Petry², Kamilla Bleil do Carmo¹, Caroline M. Marinho Marciano³, Adriana M. Guaratini Ibelli⁴, Jane de Oliveira Peixoto⁵ e Mônica Corrêa Ledur⁵

¹Graduando em Ciências Biológicas, Universidade do Contestado, Campus Concórdia, Estagiário da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPq/PIBIC, igorsavoldi154@hotmail.com.

²Mestranda em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina-UEDESC Chapecó.

³Graduanda em Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso-UFMT, Cuiabá, MT.

⁴Analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

⁵Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

Palavras-chave: genes de referência, necrose da cabeça do fêmur, qPCR

INTRODUÇÃO

Em estudos de expressão gênica, o método mais utilizado para avaliar o nível de expressão em genes candidatos é o da quantificação relativa realizada em equipamento de PCR em tempo real (qPCR). Este é aplicado a diferentes grupos: animais, humanos e plantas (1). Para isso, genes constitutivos, os quais apresentam pouca variação de expressão em relação a tratamentos ou problema que envolva o animal, são necessários para realização desta técnica (2). Para se obter um resultado confiável, a escolha de um bom gene constitutivo é essencial. No entanto, há um número limitado de trabalhos que investigam genes constitutivos em galinhas. Alguns genes, como *HPRT-1* e *HMBS* já foram descritos como sendo constitutivos estáveis em estudos utilizando o músculo peitoral maior em frangos de corte (3). Porém, ainda não foram identificados genes de referência relacionados ao tecido ósseo em frangos de corte. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi selecionar um gene constitutivo com menor variação de expressão para posteriormente validar a expressão de genes alvo relacionados à Necrose da Cabeça do Fêmur (NCF) em frangos comerciais machos aos 35 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas amostras da placa de crescimento do fêmur de frangos de corte machos de 35 dias de idade, sendo 10 normais e 10 afetados com NCF. O RNA total foi extraído utilizando Trizol (Invitrogen). Em seguida foi realizado o *clean-up* de RNA utilizando o mini kit RNeasy (Qiagen) seguindo recomendações do fabricante. A concentração foi avaliada em equipamento *BioDrop* e a integridade em gel de Agarose 1,5%. O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix*, seguindo recomendações do fabricante. Os *primers* para os genes constitutivos *HMBS* (*hydroxymethylbilane synthase*), *HPRT1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*), *RPLP1* (*ribosomal protein, large, P1*), *RPL4* (*ribosomal protein L4*), *RPL30* (*ribosomal protein L30*), *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) foram desenhados no programa *Primer-BLAST* (4) do NCBI. A análise de estabilidade dos genes constitutivos foi realizada com o programa *RefFinder* (5) que ordena os genes mais estáveis considerando os métodos *delta CT* comparativo, *BestKeeper*, *normFinder* e *Genorm*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação de bons genes constitutivos é essencial para a análise correta dos resultados de estudos que envolvam a expressão de genes alvo (3). Uma vez que são escassos os trabalhos que envolvam a identificação de genes referência para o tecido ósseo em frangos de corte, é indispensável que estes apresentem variação pequena na expressão independente do estado fisiológico do organismo (6). Neste trabalho, por meio da análise integrada (*Comprehensive Ranking*) de quatro métodos, identificou-se que os genes *RPL4* e *RPL30* apresentaram menor variação na sua expressão (Figura 1). Os resultados foram similares para todos os métodos testados. O gene *RPL4* já foi descrito como sendo um gene referência estável quando analisado em ovários de camundongos (7) e o *RPL30* em estudos com ovários de galinhas (8). Já o gene *HMBS*, previamente indicado como constitutivo para análises em tecido muscular, não se mostrou estável quando analisado no tecido ósseo de frangos aos 35 dias de idade, apresentando a maior variação entre os genes estudados. Porém, este foi o gene com menor variação no tecido ósseo de frangos de corte aos 42 dias (9), evidenciando que para diferentes idades o nível de expressão de determinados genes pode oscilar, indicando a necessidade de investigação para cada condição experimental.

CONCLUSÕES

Entre os seis genes constitutivos analisados, o *RPL4* e *RPL30* apresentaram menor variação de expressão entre frangos afetados ou não com NCF aos 35 dias de idade, indicando serem bons genes de referência para a normalização da expressão de genes alvo no tecido ósseo de aves.

REFERÊNCIAS

- MARCHESI, J. A. P; IBELLI, A. M. G; PALUDO, E; TAVERNARI, F. C; PEIXOTO, J. de O; LEDUR, M. C; Expressão do gene receptor da leptina (LEPR) em frangos de corte normais e afetados pela necrose da cabeça do fêmur. 8ª Jornada de Iniciação Científica-JINC; Concórdia, S.C; **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. 2014. p. 43-44;
- IBELLI, A. M. G; ANDRÉO, R; COUTINHO, L. L; GOUVEIA, J. J. S; NAKATA, L. C; OLIVEIRA, M. C. de S; SOUZA, J. R. T; ZAROS, L. G; REGITANO, L. C. de A; Seleção de genes constitutivos para estudos de expressão gênica em abomaso e linfonodo abomasal de bovinos. Disponível em < <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/48105>>; Acesso em 16. Ago.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.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> acesso em 18. Ago. 2016. Primer-BLAST NCBI; Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>> acesso em: 18. Ago. 2016.
- F XIE, P XIAO, D CHEN, XU L, B ZHANG. miRDeepFinder: a ferramenta de análise de miRNA de profunda sequenciamento de plantas pequenos RNAs. **Plant Molecular Biology** 80 (1), 75-84. 2012.
- KOZERA, B; RAPACZ, M; Reference genes in real-time PCR. **J Appl Genetics** 54: 391-406. 2013.
- YUANYUAN, S; QIN, S; RONGRONG, X; YUJING, G; CHENGBIN, P; JIANJUN, M; YANZHOU, Y; XIUYING, P; Reference gene selection for real-time quantitative PCR analysis on ovarian cryopreservation by vitrification in mice. **J Assist Reprod Genet**; 32:1277–1284, 2015.
- YANG, F; LEI, X; PALACIOS, A. R; TANG, C; YUE, H; Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in chicken embryo fibroblasts infected with avian leukosis virus subgroup J. **BMC Research Notes**, 6:402. 2013.
- PALUDO, E; IBELLI, A .M.G; PEIXOTO, J .O; TAVERNARI, F. F; ZANELLA, R; PANDOLFI, J. R. C; COUTINHO, L. L; LIMA-ROSA, C. A. V; LEDUR, M. C; RUNX2 Plays an Essential Role in the Manifestation of Femoral Head Necrosis in Broilers. In: WORD CONGRESS OF GENETCS LIVESTOCK PRODUCTION, 10. Vancouver. American Society of Animal Science, 2014.

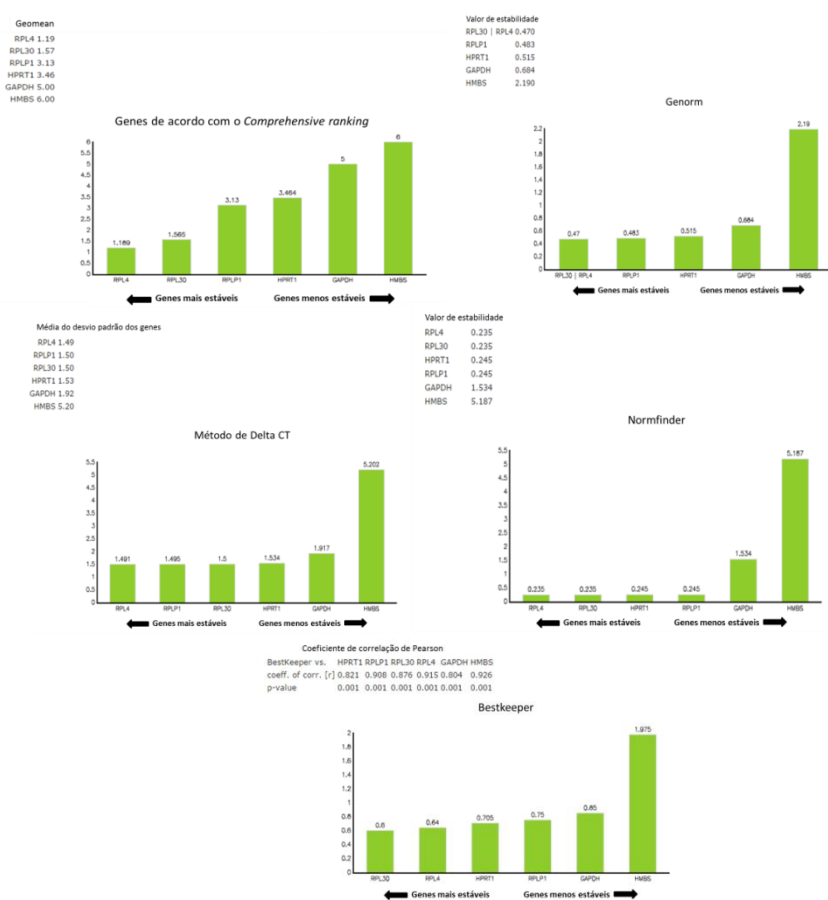


Figura 1. Resultado da classificação de seis genes constitutivos pela análise com o programa RefFinder utilizando-se os métodos *Comprehensive Ranking*, *comparativo delta CT*, *BestKeeper*, *normFinder* e *Genorm*.